(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292293 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.20

(22) Дата подачи заявки
2021.02.10

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(54) АНТИ-CD137 АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ЛЕЧЕНИИ РАКА

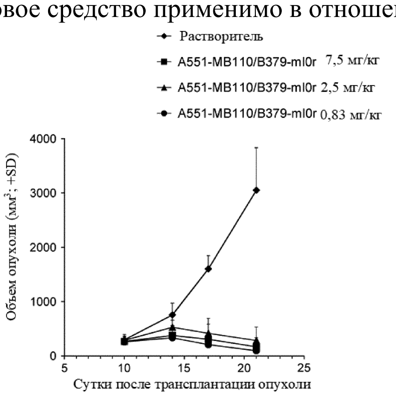
(31) **2020-021275; 2020-140489**
(32) **2020.02.12; 2020.08.21**
(33) **JP**
(86) **PCT/JP2021/004871**
(87) **WO 2021/162020 2021.08.19**

(71) Заявитель:
ЧУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ КАЙСЯ (JP)

(72) Изобретатель:
Сакурай Мика (JP), Нарита Ёсинори (SG), Танигути Кэндзи, Миками Хирофуми, Хорикава Саюри, Утикава Рё, Оно Нацуки, Хамада Коки (JP)

(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В изобретении описывают решение проблемы, а именно получение противоракового средства, которое активирует иммунные клетки, обладает цитотоксической активностью или противоопухолевой активностью, слабо воздействует на неопухолевые здоровые ткани, а также вызывает незначительные побочные эффекты; также описывают комбинированную терапию, в которой применяют указанное противораковое средство вместе с другими противораковыми агентами, и фармацевтическую композицию для применения в комбинированной терапии. Предусматривают противораковое средство, комбинированную терапию с применением противоракового средства вместе с другими противораковыми средствами и фармацевтическую композицию для применения в комбинированной терапии. Такое противораковое средство включает анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению в качестве активного ингридиента, где связывающая активность анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы варьирует в зависимости от разнообразия соединений (например, низкомолекулярных соединений) на тканях-мишенях. В результате противораковое средство активирует иммунные клетки, цитотоксическую активность или противоопухолевую активность, а также незначительно воздействует на неопухолевые здоровые ткани и вызывает незначительные побочные эффекты. Предположительно противораковое средство применимо в отношении различных типов рака.



202292293 A1

202292293 A1

АНТИ-CD137 АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ЛЕЧЕНИИ РАКА

Область техники

Настоящее изобретение относится к анти-CD137 антигенсвязывающим молекулам и способам их применения.

Предшествующий уровень техники

Рак является смертельно опасным заболеванием, которое трудно полностью вылечить, за исключением некоторых случаев. Результаты основного метода лечения, заключающегося в применении химиотерапевтических средств, нельзя признать удовлетворительными. Было высказано предположение, что не только гетерогенность самих раковых клеток, но и микроокружение опухоли играют важную роль в качестве фактора, затрудняющего лечение рака (NPL 1). Недавно было показано, что неоперабельная злокачественная меланома и другие подобные заболевания потенциально излечимы анти-CTLA-4 антителом, которое подавляет иммуносупрессивную функцию CTLA-4 и тем самым способствует активации T-клеток (NPL 2). В 2011 году моноклональное антитело против CTLA-4 человека (ипилимумаб) было одобрено Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) как первое в мире иммуноактивирующее антитело. Кроме того, сообщалось, что ингибирующие антитела против PD-1 и PD-L1, других отличных от CTLA-4 молекул иммунных контрольных точек, обладают терапевтическим действием (NPL 3) и одобрены FDA.

Известно, что T-клетки, которые играют важную роль в опухолевом иммунитете, активируются двумя сигналами: 1) связыванием рецептора T-клеток (TCR) с антигенным пептидом, представленным молекулами класса I главного комплекса гистосовместимости (MHC), и активацией TCR;

и 2) связыванием костимулирующей молекулы на поверхности T-клеток с ее лигандами на антигенпрезентирующих клетках и активацией костимулирующей молекулы. Кроме того, активацию костимулирующих молекул, принадлежащих к надсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF, tumor necrosis factor receptor superfamily), включая CD137 (4-1BB), на поверхности Т-клеток, оценивают как важную функцию для активации Т-клеток (NPL 4).

К надсемейству TNFRSF относят CD137, CD40, OX40, RANK, GITR и подобные молекулы. Установлено, что CD137 экспрессируется не только на поверхности Т-клеток, но также и на поверхности других иммунных клеток, таких как дендритные клетки (ДК), В-клетки, клетки-киллеры (NK), макрофаги и нейтрофилы (NPL 5).

Агонистические антитела против CD137 уже продемонстрировали противоопухолевый эффект на модели мышей, и было показано, что это является результатом активации CD8-положительных Т-клеток и клеток NK в экспериментах на модели мышей (NPL 6). Однако побочные эффекты, обусловленные неспецифической гепатотоксичностью агонистического антитела против CD137, стали клиническими и неклиническими проблемами, препятствуя требуемому прогрессу при разработке лекарств (NPL 7, NPL 8). Предполагают, что побочные эффекты вызваны в основном активацией иммунных клеток в неопухолевых, неиммунных тканях, таких как печень, что включает связывание антитела с рецептором Fcγ через константную область антитела (NPL 9). С другой стороны, показано, что для того, чтобы агонистические антитела, входящие в надсемейство антител против TNF рецепторов, проявляли агонистическую активность *in vivo,* антитело должно быть перекрестно связано клетками, экспрессирующими рецептор Fcγ (клетками, экспрессирующими FcγRII) (NPL 10). То есть связывание агонистического антитела против CD137 с рецептором Fcγ вовлечено как в лекарственную эффективность противоопухолевого действия антитела, так и в его побочные эффекты, такие как гепатотоксичность. Таким образом, увеличение связывания между антителом и рецептором Fcγ предположительно повысит эффективность лекарственного средства, но также может усилить гепатотоксические побочные эффекты, а уменьшение связывания между антителом и рецептором Fcγ может уменьшить побочные эффекты, но также понизить эффективность лекарственного средства. До сих пор не было сообщений об агонистических антителах против CD137, эффективность и побочные эффекты которых были бы разделены. Более того, противоопухолевый эффект агонистического антитела против CD137 никоим образом не является сильным клиническим средством, и желательно дальнейшее повышение эффективности лекарственного средства наряду с предотвращением токсичности. Соответственно, желательно разработать новое лекарственное средство, которое способно вызывать противоопухолевые иммунные ответы при одновременном уменьшении побочных эффектов.

Когда терапевтическое антитело вводят в живой организм, желательно, чтобы его антиген-мишень экспрессировался специфически только в месте поражения. Однако во многих случаях тот же антиген экспрессируется также в непораженных участках, то есть в нормальных тканях, и это может быть причиной побочных эффектов, нежелательных с точки зрения лечения. Например, хотя антитела против опухолевых антигенов могут проявлять цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и т.д., они также могут повреждать нормальные клетки, если тот же антиген экспрессируется в нормальных клетках. Чтобы решить вышеупомянутые проблемы, основное внимание было уделено явлению, при котором определенные соединения в изобилии присутствуют в тканях-мишенях (например, в опухолевых тканях), и разработана технология поиска антигенсвязывающих молекул с различной антигенсвязывающей активностью в зависимости от концентрации таких соединений (например, PTL 1).

В последние годы клинически доказана эффективность иммунотерапевтических агентов, представленных ингибиторами, нацеленными на молекулы иммунных контрольных точек, такие как CTLA-4, PD-1 и PD-L1. Однако эти препараты эффективны не для всех пациентов, и необходимо дальнейшее повышение эффективности препаратов. Что касается комбинированного применения иммунотерапевтических средств, было подтверждено, что комбинированное применение ниволумаба и ипилимумаба повышает эффективность лекарственного средства при меланоме по сравнению с применением только ипилимумаба (непатентный документ 11).

Цитируемые источники

Патентная литература

[PTL 1] WO2013/180200

Непатентная литература

[NPL 1] Hanahan, *Cell*, 144, 2011, 646-674

[NPL 2] Prieto, *Clin Cancer Res*. 18, 2012, 2039-2047

[NPL 3] Hamid, *Expert Opin. Biol. Ther*., 6, 2013, 847-861

[NPL 4] Summers, *Nat Rev Immunol*, 12, 2012, 339-351

[NPL 5] Vinay, *Cellular & Molecular Immunology*, 8, 2011, 281-284

[NPL 6] Houot, *Blood*, 114, 2009, 3431-3438

[NPL 7] Ascierto, *Semin Oncol*, 37, 2010, 508-516

[NPL 8] Dubrot, *Cancer Immunol Immunother*, 59, 2010, 1223-1233

[NPL 9] Schabowsky, *Vaccine*, 28, 2009, 512-522

[NPL 10] Li, *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(48), 2013, 19501-19506

[NPL 11] N Eng J Med (2015) vol.373, p.23-34

Краткое описание изобретения

Техническая проблема

Настоящее изобретение относится к противоопухолевым средствам, содержащим анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу, и к комбинированной терапии с другим противораковым средством.

Решение проблемы

Чтобы получить анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы, которые активируют иммуноциты, обладают цитотоксической или противоопухолевой активностью и при этом проявляют пониженное действие на неопухолевые ткани, такие как нормальные ткани, имеют меньше побочных эффектов, а также, чтобы разработать способы их применения, в настоящем изобретении получают анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы, характеризующиеся тем, что их активность связывания с CD137 варьирует в зависимости от различных соединений (например, низкомолекулярных соединений) в тканях-мишенях (например, в опухолевых тканях). Настоящее изобретение также предусматривает комбинированную терапию с использованием такого противоракового средства, включающего анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу и другое противораковое средство.

Конкретно в настоящем изобретении предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы, способы их применения, фармацевтические составы и тому подобное, что описано в приведенных ниже примерах.

[1]

Противораковое средство, содержащее в качестве активного ингредиента анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу, содержащую любую комбинацию HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, выбранных из пунктов (а)-(н), представленных ниже:

(а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, HVR- L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(б) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, HVR- L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(в) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, HVR- L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(г) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, HVR- L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(д) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

8, HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, HVR- L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(е) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, HVR- L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28;

(ж) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, HVR- L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29;

(з) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, HVR- L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(и) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, HVR- L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(к) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, HVR- L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(л) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, HVR- L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(м) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, HVR- L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; а также

(н) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, HVR- L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

[1.1]

Противораковое средство, содержащее в качестве активного ингредиента анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу, содержащую:

(а) VH, которая по меньшей мере на 95% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 43-53; или

(б) VL, которая по меньшей мере на 95% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 54-60.

[1.2]

Противораковое средство, содержащее анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу, содержащую любую комбинацию VH и VL, выбранную из пунктов (а)-(н), приведенных ниже:

(а) VH, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54;

(б) VH, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 55;

(в) VH, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 55;

(г) VH, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54;

(д) VH, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54;

(е) VH, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 56;

(ж) VH, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 49, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 57;

(з) VH, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 58;

(и) VH, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 59;

(к) VH, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 60;

(л) VH, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 52, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 60;

(м) VH, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 59; а также (н) VH, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54.

[2]

Противораковое средство, содержащее анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу, содержащую любую комбинацию VH и VL, выбранную из пунктов (а)-(н), приведенных ниже:

(а) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54;

(б) VH, содержащуюя аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;

(в) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;

(г) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54;

(д) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54;

(е) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

(ж) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57;

(з) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

(и) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59;

(к) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60;

(л) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60;

(м) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59; а также

(н) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54.

[2.1]

Противораковое средство по любому из п.п. [1]-[2], отличающееся тем, что анти-CD137 антигенсвязывающая молекула обладает CD137-связывающей активностью, зависящей от низкомолекулярного соединения.

[2.2]

Противораковое средство, содержащее анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу, которая обладает активностью связывания CD137, зависящей от низкомолекулярного соединения, причем анти-CD137 антигенсвязывающая молекула конкурирует с антигенсвязывающей молекулой по любому из п.п. [1]-[2.1] за связывание с CD137 в присутствии 10 мкМ или более, 50 мкМ или более, 100 мкМ или более, 150 мкМ или более, 200 мкМ или более или 250 мкМ или более низкомолекулярного соединения.

[2.3]

Противораковое средство, содержащее анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу, которая обладает активностью связывания CD137, зависящей от низкомолекулярного соединения, причем анти-CD137 антигенсвязывающая молекула связывается с тем же эпитопом CD137, который связан с антигенсвязывающей молекулой по любому из п.п. [1]-[2.1] в присутствии 10 мкМ или более, 50 мкМ или более, 100 мкМ или более, 150 мкМ или более, 200 мкМ или более или 250 мкМ или более низкомолекулярного соединения.

[2.4]

Противораковое средство по любому из п.п. [2.1]-[2.3], где низкомолекулярное соединение представляет собой аденозинсодержащее соединение.

[2.5]

Противораковое средство по любому из п.п. [2.1]-[2.4], где низкомолекулярным соединением является АТФ.

[2.6]

Противораковое средство по любому из п.п. [1]-[3.4], отличающееся тем, что анти-CD137 антигенсвязывающая молекула представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[3]

Противораковое средство по любому из п.п. [1]–[2.6], отличающееся тем, что анти-CD137 антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело человека, гуманизированное антитело или химерное антитело или антигенсвязывающий фрагмент любого из них.

[3.1]

Противораковое средство по любому из п.п. [1]-[3], отличающееся тем, что анти-CD137 антигенсвязывающая молекула представляет собой полноразмерное антитело IgG1.

[3.2]

Противораковое средство по любому из п.п. [1]–[3.1], отличающееся тем, что анти-CD137 антигенсвязывающая молекула содержит измененный Fc-участок, в котором изменена по меньшей мере одна аминокислота, при этом измененный Fc-участок обладает повышенной активностью связывания с FcγRIIb по сравнению с исходным Fc-участком, в котором нет измененной аминокислоты.

[3.3]

Противораковое средство по п. [3.2], в котором по меньшей мере одно изменение аминокислоты представляет собой по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из G236N, H268D и A330K, в соответствии с нумерацией EC.

[3.4]

Противораковое средство по п.п. [3.2] или [3.3], в котором по меньшей мере одно изменение аминокислоты представляет собой комбинацию аминокислотных замен G236N/H268D/A330K в соответствии с нумерацией EC.

[3.5]

Противораковое средство по любому из п.п. [1]–[3.4], отличающееся тем, что анти-CD137 антигенсвязывающая молекула содержит измененный Fc-участок, в котором изменена по меньшей мере одна аминокислота, причем анти-CD137 антигенсвязывающая молекула имеет повышенную изоэлектрическую точку (pI) по сравнению с исходной анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой, содержащей исходную Fc-область, не содержащую изменение аминокислоты.

[3.6]

Противораковое средство по [3.5], в котором по меньшей мере одно аминокислотное изменение представляет собой по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из Q311R, P343R и D413K в соответствии с нумерацией EC.

[3.7]

Противораковое средство по п.п. [3.5] или [3.6], в котором по меньшей мере одно аминокислотное изменение представляет собой (i) аминокислотную замену P343R, (ii) комбинацию аминокислотных замен Q311R/P343R или (iii) комбинацию аминокислот кислотных замен Q311R/D413K, согласно нумерации EC.

[4]

Противораковое средство по любому из п.п. [1]–[3.7], отличающееся тем, что анти-CD137 антигенсвязывающая молекула содержит измененную Fc-область, причем измененная Fc-область содержит любую комбинацию аминокислотных изменений, выбранных из следующих, в соответствии с нумерацией EC:

L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K;
K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K;
L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/P343R/D413K;
L234Y/P238D/V264I/A330K/P343R/D413K;
L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/P343R/D413K;
L234Y/G237D/P238D/A330K/P343R/D413K;
L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R/P343R;
L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/Q311R/P343R;
L234Y/P238D/V264I/A330K/Q311R/P343R;
L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/Q311R/P343R;
L234Y/G237D/P238D/A330K/Q311R/P343R;
L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R;
K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R;
L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/D413K;
K214R/G236N/H268D/A330K/P343R;
K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R;
K214R/G236N/H268D/A330K/D413K;
K214R/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K;
K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K;
K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R;

K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R;
K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R;
K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R;
K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K;
K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K; и
K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R.

[4.1]

Противораковое средство по любому из п.п. [3.2]-[4], отличающееся тем, что измененная Fc-область получена из Fc-области IgG1 человека.

[4.2]

Противораковое средство по любому из п.п. [3.2]-[4.1], отличающееся тем, что измененная Fc-область дополнительно содержит делецию в положениях 446 и 447 в соответствии с нумерацией EC.

[4.3]

Противораковое средство по любому из п.п. [1]–[4.2], отличающееся тем, что анти-CD137 антигенсвязывающая молекула содержит константную область тяжелой цепи, содержащую любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 64–85.

[5]

Противораковое средство, содержащее анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу, которая содержит любую комбинацию VH, VL, CH и CL, выбранную из п.п. (i)-(xxxviii), представленных ниже:

(i) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(ii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(iii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(iv) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(v) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(vi) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(vii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(viii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(ix) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(x) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xi) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, VL,

содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xiii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xiv) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xv) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xvi) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xvii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xviii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xix) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xx) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxi) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxiii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxiv) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxv) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxvi) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxvii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxviii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxix) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, VL,

содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxx) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxxi) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxxii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxxiii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxxiv) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxxv) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxxvi) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxxvii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; а также (xxxviii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63.

[6]

Противораковое средство по любому из п.п. [1]-[5], которое следует вводить онкологическому пациенту, имеющему (i) солидный рак, инфильтрированный одной или несколькими клетками, выбранными из B-клеток, дендритных клеток, природных клеток-киллеров, макрофагов и $CD8^+$ T-клеток и/или (ii) солидный рак, инфильтрированный регуляторной T-клеткой (Treg) или $CD4^+$ T-клеткой.

[6.1]

Противораковое средство по любому из п.п. [1]-[6], которое следует вводить онкологическому больному с солидной опухолью, инфильтрированной $CD8^+$ T-клетками.

[7]

Противораковое средство по любому из п.п. [1]–[6.1], которое следует вводить пациенту с раком, резистентным к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа.

[8]

Противораковое средство по любому из п.п. [1]-[7], которое следует вводить онкологическому пациенту с одним или несколькими видами рака, выбранными из группы, состоящей из рака желудка, рака головы и шеи, рака пищевода, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака яичников, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака почки, рака кожи, опухоли мышц, рака поджелудочной железы, рака простаты, рака семенников, рака матки, холангиокарциномы, карциномы из клеток Меркеля, рака мочевого пузыря, рака щитовидной железы, шванномы, рака надпочечников, рака анального канала, опухоли центральной нервной системы, опухоли нейроэндокринной ткани, рака полового члена, опухоли плевры, опухоли слюнной железы, рака вульвы, тимомы, лимфомы, миелоидного лейкоза и детского рака.

[8.1]

Противораковое средство по любому из п.п. [1]-[8], которое следует вводить онкологическому пациенту с одним или несколькими видами рака, выбранными из группы, состоящей из рака желудка, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака молочной железы, рака кожи, лимфомы и миелоидного лейкоза.

[9]

Противораковое средство по любому из п.п. [1]-[5] для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противораковым средством.

[9.1]

Противораковое средство по п. [9], отличающееся тем, что противораковое средство вводят одновременно с другим противораковым средством.

[9.2]

Противораковое средство по п. [9], отличающееся тем, что противораковое средство вводят до или после введения другого противоракового средства.

[10]

Противораковое средство по любому из п.п. [9]-[9.2], где другое противораковое средство представляет собой по меньшей мере одно противораковое средство, выбранное из химиотерапевтического средства, активирующего Т-клетки агониста, ингибитора контрольной точки иммунного ответа, перенаправляющей Т-клетки антигенсвязывающей молекулы, антифиброзного агента и ингибитора ангиогенеза.

[10.1]

Противораковое средство по [10], где другое противораковое средство представляет собой химиотерапевтическое средство.

[10.2]

Противораковое средство по [10] или [10.1], где другое противораковое средство представляет собой по меньшей мере одно химиотерапевтическое средство, выбранное из антиметаболитов, растительных алкалоидов и соединений платины.

[10.3]

Противораковое средство по п. [10], где другое противораковое средство представляет собой Т-клетки активирующий агонист.

[10.4]

Противораковое средство по п.п. [10] или [10.3], где другое противораковое средство представляет собой анти-TNFRSF агонистическое антитело.

[11]

Противораковое средство по п. [10], где другое противораковое средство представляет собой ингибитор контрольной точки иммунного ответа.

[12]

Противораковое средство по п.п. [10] или [11], где другое противораковое средство представляет собой по меньшей мере один ингибитор контрольной точки иммунного ответа, выбранный из анти-PD1 антитела, анти-PDL1 антитела, анти-TIGIT антитела, анти-TIM3 антитела и анти-LAG3 антитела.

[12.1]

Противораковое средство по любому из п.п. [10], [11] и [12], где другое противораковое средство представляет собой анти-PD1 антитело и/или анти-TIGIT антитело.

[12.2]

Противораковое средство по любому из п.п. [9]-[12.1], которое следует вводить пациенту с раком, резистентным к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа.

[12.3]

Противораковое средство по п. [12.2], где рак, резистентный к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа, представляет собой рак с мутацией генов JAK1, JAK2 и/или B2M.

[13]

Противораковое средство по п. [10], где другое противораковое средство представляет перенаправляющую Т-клетки антигенсвязывающую молекулу.

13.1]

Противораковое средство по п.п. [10] или [13], где другое противораковое средство представляет собой мультиспецифическое антитело, обладающее связывающей активностью с CD3 и раковым антигеном.

[13.2]

Противораковое средство по п. [13.1], где мультиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело.

[14]

Противораковый агент по любому из п.п. [9]-[9.2], где другой противораковый агент представляет собой агент, который истощает и/или инактивирует одну или несколько клеток, выбранных из регуляторных Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток, В-клеток, NK-клеток и макрофагов.

[15]

Противораковое средство по любому из п.п. [9]-[14], которое следует вводить онкологическому пациенту, страдающему одним или несколькими видами рака, выбранными из группы, состоящей из рака желудка, рака головы и шеи, рака пищевода, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака яичников, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака почки, рака кожи, опухоли мышц, рака поджелудочной железы, рака простаты, рака семенников, рака матки, холангиокарциномы, карциномы из клеток Меркеля, рака мочевого пузыря, рака щитовидной железы, шванномы, рака надпочечников, рака анального канала, опухоли центральной нервной системы, опухоли нейроэндокринной ткани, рака полового члена, опухоли плевры, опухоли слюнной железы, рака вульвы, тимомы, лимфомы, миелоидного лейкоза и детского рака.

[15.1]

Противораковое средство по любому из п.п. [9]-[15], которое следует вводить онкологическому пациенту с одним или несколькими видами рака, выбранными из группы, состоящей из рака желудка, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака молочной железы, рака кожи, лимфомы и миелоидного лейкоза.

[16]

Противораковое средство по любому из п.п. [1]-[5], предназначенное для применения в комбинированной терапии по меньшей мере с одним другим противораковым средством для усиления активации Т-клеток в опухолевой ткани индивидуума.

[16.1]

Противораковое средство по п. [16], отличающееся тем, что при повышении в опухолевой ткани уровня экспрессии по меньшей мере одного гена, выбранного из CD8b1, Gzmb, Prf1 и Ifng, делают вывод, что активация Т-клеток в опухолевой ткани была повышена.

[17]

Противораковое средство по любому из п.п. [1]-[5], предназначенное для применения в комбинированной терапии по меньшей мере с одним другим противораковым средством для стимуляции пролиферации $CD8^+$ Т-клеток в опухолевой ткани индивида.

[17.1]

Противораковое средство по любому из п.п. [16]-[17], которое характеризуется тем, что его вводят одновременно с другим противораковым средством.

[17.2]

Противораковое средство по любому из п.п. [16]-[17], которое характеризуется тем, что его вводят до или после введения другого противоракового средства.

[17.3]

Противораковое средство по любому из п.п. [16]-[17.2], где другое противораковое средство представляет собой по меньшей мере одно противораковое средство, выбранное из химиотерапевтического средства, Т-клетки активирующего агониста, ингибитора контрольной точки иммунного ответа, перенаправляющей Т-клетки антигенсвязывающей молекулы, антифиброзного агента и ингибитора ангиогенеза.

[17.4]

Противораковый агент по любому из п.п. [16]-[17.2], где другой противораковый агент представляет собой агент, который истощает и/или инактивирует одну или несколько клеток, выбранных из регуляторных Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток, В-клеток, NK-клеток и макрофагов.

[18]

Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая комбинацию анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы по любому из п.п. [1]-[5] и по меньшей мере одного другого противоракового агента.

[18.1]

Фармацевтическая композиция по п. [18], отличающаяся тем, что анти-CD137 антигенсвязывающая молекула используется для введения пациенту одновременно с другим противораковым средством.

[18.2]

Фармацевтическая композиция по п. [18], отличающаяся тем, что анти-CD137 антигенсвязывающая молекула используется для введения пациенту до или после введения другого противоракового агента.

[19]

Фармацевтическая композиция по любому из п.п. [18]-[18.2], отличающаяся тем, что другой противораковый агент представляет собой по меньшей мере один противораковый агент, выбранный из химиотерапевтического агента, Т-клетки активирующего агониста, ингибитора контрольной точки иммунного ответа, перенаправляющей Т-клетки антигенсвязывающей молекулы, антифиброзного агента и ингибитора ангиогенеза.

[19.1]

Фармацевтическая композиция по п. [19], в которой другое противораковое средство представляет собой химиотерапевтическое средство.

[19.2]

Фармацевтическая композиция по п.п. [19] или [19.1], где другое противораковое средство представляет собой по меньшей мере одно химиотерапевтическое средство, выбранное из антиметаболитов, растительных алкалоидов и соединений платины.

[19.3]

Фармацевтическая композиция по п. [19], где другой противораковый агент представляет собой Т-клетки активирующий агонист.

[19.4]

Фармацевтическая композиция по п.п. [19] или [19.3], где другой противораковый агент представляет собой анти-TNFRSF агонистическое антитело.

[20]

Фармацевтическая композиция по п. [19], отличающаяся тем, что другой противораковый агент представляет собой ингибитор контрольной точки иммунного ответа.

[21]

Фармацевтическая композиция по п.п. [19] или [20], отличающаяся тем, что другое противораковое средство представляет собой по меньшей мере один ингибитор контрольной точки иммунного ответа, выбранный из анти-PD1 антитела, анти-PDL1 антитела, анти-TIGIT антитела, анти-TIM3 антитела и анти-LAG3 антитела.

[21.1]

Фармацевтическая композиция по любому из п.п. [19], [20] и [21], отличающаяся тем, что другой противораковый агент представляет собой анти-PDL1 антитело и/или анти-TIGIT антитело.

[21.2]

Фармацевтическая композиция по любому из п.п. [18]-[21.1], предназначенная для лечения рака, резистентного к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа.

[21.3]

Фармацевтическая композиция по п. [21.2], в которой рак, резистентный к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа, представляет собой рак с мутацией генов JAK1, JAK2 и/или B2M.

[22]

Фармацевтическая композиция по п. [19], где другой противораковый агент представляет собой перенаправляющую T-клетки антигенсвязывающую молекулу.

[22.1]

Фармацевтическая композиция по п.п. [19] или [22], где другой противораковый агент представляет собой мультиспецифическое антитело, обладающее активностью связывания с CD3 и раковым антигеном.

[22.2]

Фармацевтическая композиция по п. [22.1], где мультиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело.

[23]

Фармацевтическая композиция по любому из п.п. [18]-[18.2], отличающаяся тем, что другой противораковый агент, который истощает и/или инактивирует одну или несколько клеток, выбранных из регуляторных T-клеток, $CD4^+$ T-клеток, B-клеток, NK-клеток и макрофагов.

[24]

Фармацевтическая композиция по любому из п.п. [18]-[23], отличающаяся тем, что рак представляет собой один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, рака головы и шеи, рака пищевода, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака яичников, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака почки, рака кожи, опухоли мышц, рака поджелудочной железы, рака простаты, рака семенников, рака матки, холангиокарциномы, карциномы из клеток Меркеля, рака мочевого пузыря, рака щитовидной железы, шванномы, рака надпочечников, рака анального канала, опухоли центральной нервной системы, опухоли нейроэндокринной ткани, рака полового члена, опухоли плевры, опухоли слюнной железы, рака вульвы, тимомы, лимфомы, миелоидного лейкоза и детского рака.

[24.1]

Фармацевтическая композиция по любому из п.п. [18]-[24], отличающаяся тем, что рак представляет собой один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака молочной железы, рака кожи, лимфомы и миелоидного лейкоза.

[25]

Комбинация анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы по любому из п.п. [1]-[5] и по меньшей мере одного другого противоракового средства для лечения рака.

[25.1]

Комбинация по п. [25], в которой анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу используют для введения пациенту одновременно с другим противораковым средством.

[25.2]

Комбинация по п. [25], в которой анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу используют для введения пациенту до или после введения другого противоракового агента.

[26]

Комбинация по любому из п.п. [25]-[25.2], где другой противораковый агент представляет собой по меньшей мере один противораковый агент, выбранный из химиотерапевтического агента, Т-клетки активирующего агониста, ингибитора контрольной точки иммунного ответа, перенаправляющей Т-клетки антигенсвязывающей молекулы, антифиброзного агента и ингибитора ангиогенеза.

[26.1]

Комбинация п. [26], в которой другое противораковое средство представляет собой химиотерапевтическое средство.

[26.2]

Комбинация по п.п. [26] или [26.1], где другой противораковый агент представляет собой по меньшей мере один химиотерапевтический агент, выбранный из антиметаболитов, растительных алкалоидов и соединений платины.

[26.3]

Комбинация по п. [26], где другой противораковый агент представляет собой Т-клетки активирующего агониста.

[26.4]

Комбинация по п.п. [26] или [26.3], где другой противораковый агент представляет собой анти-TNFRSF агонистическое антитело.

[27]

Комбинация по п. [26], где другой противораковый агент представляет собой ингибитор контрольной точки иммунного ответа.

[28]

Комбинация по п.п. [26] или [27], где другой противораковый агент представляет собой по меньшей мере один ингибитор контрольной точки иммунного ответа, выбранный из анти-PD1 антитела, анти-PDL1 антитела, анти-TIGIT антитела, анти-TIM3 антитела и анти-LAG3 антитела.

[28.1]

Комбинация по любому из п.п. [26], [27] и [28], где другой противораковый агент представляет собой анти-PDL1 антитело и/или анти-TIGIT антитело.

[28.2]

Комбинация по любому из п.п. [25]–[28.1], предназначенная для лечения рака, резистентного к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа.

[28.3]

Комбинация по п. [28.2], отличающаяся тем, что рак, резистентный к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа, представляет собой рак, имеющий генную в генах JAK1, JAK2 и/или B2M.

[29]

Комбинация по п. [26], где другой противораковый агент представляет собой перенаправляющую Т-клетки антигенсвязывающую молекулу.

[29.1]

Комбинация по п.п. [26] или [29], где другой противораковый агент представляет собой мультиспецифическое антитело, обладающее активностью связывания с CD3 и раковым антигеном.

[29.2]

Комбинация по п. [29.1], где мультиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело.

[30]

Комбинация по любому из п.п. [25]-[25.2], где другой противораковый агент представляет собой агент, который истощает и/или инактивирует одну или несколько клеток, выбранных из регуляторных Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток, В-клеток, NK-клеток и макрофагов.

[31]

Комбинация по любому из п.п. [25]-[30], где рак представляет собой один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, рака головы и шеи, рака пищевода, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака яичников, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака почки, рака кожи, опухоли мышц, рака поджелудочной железы, рака простаты, рака семенников, рака матки, холангиокарциномы, карциномы из клеток Меркеля, рака мочевого пузыря, рака щитовидной железы, шванномы, рака надпочечников, рака анального канала, опухоли центральной нервной системы, опухоли нейроэндокринной ткани, рака полового члена, опухоли плевры, опухоли слюнной железы, рака вульвы, тимомы, лимфомы, миелоидного лейкоза и детского рака.

[31.1]

Комбинация по любому из п.п. [25]-[31], где рак представляет собой один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака молочной железы, рака кожи, лимфомы, и миелоидного лейкоза.

[32]

Применение комбинации анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы по любому из п.п. [1]-[5] и по меньшей мере одного другого противоракового средства в качестве противоракового средства.

[32.1]

Применение по п. [32], где анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу используют для введения пациенту одновременно с другим противораковым средством.

[32.2]

Применение по п. [32], где анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу используют для введения пациенту до или после введения другого противоракового агента.

[33]

Применение по любому из п.п. [32]-[32.2], где другое противораковое средство представляет собой по меньшей мере одно противораковое средство, выбранное из химиотерапевтического агента, Т-клетки активирующего агониста, ингибитора контрольной точки иммунного ответа, перенаправляющей Т-клетки антигенсвязывающей молекулы, антифиброзного агента и ингибитора ангиогенеза.

[33.1]

Применение по п. [33], где другое противораковое средство представляет собой химиотерапевтическое средство.

[33.2]

Применение по п.п. [33] или [33.1], где другое противораковое средство представляет собой по меньшей мере одно химиотерапевтическое средство, выбранное из антиметаболитов, растительных алкалоидов и соединений платины.

[33.3]

Применение по п. [33], где другой противораковый агент представляет собой Т-клетки активирующий агонист.

[33.4]

Применение по п.п. [33] или [33.3], где другой противораковый агент представляет собой анти-TNFRSF агонистическое антитело.

[34]

Применение по п. [33], где другой противораковый агент представляет собой ингибитор контрольной точки иммунного ответа.

[35]

Применение по п.п. [33] или [34], где другое противораковое средство представляет собой по меньшей мере один ингибитор контрольной точки иммунного ответа, выбранный из анти-PD1 антитела, анти-PDL1 антитела, анти-TIGIT антитела, анти-TIM3 антитела и анти-LAG3 антитела.

[35.1]

Комбинация по любому из п.п. [33], [34] и [35], где другой противораковый агент представляет собой анти-PDL1 антитело и/или анти-TIGIT антитело.

[35.2]

Применение по любому из п.п. [32]–[35.1], которое предназначено для лечения рака, резистентного к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа.

[35.3]

Применение по п. [35.2], где рак, резистентный к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа, представляет собой рак, имеющий мутацию в генах JAK1, JAK2 и/или B2M.

[36]

Применение по п. [33], где другой противораковый агент представляет собой перенаправляющую Т-клетки антигенсвязывающую молекулу.

[36.1]

Применение по п.п. [33] или [36], где другой противораковый агент представляет собой мультиспецифическое антитело, обладающее активностью связывания с CD3 и раковым антигеном.

[36.2]

Применение по п. [36.1], где мультиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело.

[37]

Применение по любому из п.п. [32]-[32.2], где другой противораковый агент представляет собой агент, который истощает и/или инактивирует одну или несколько клеток, выбранных из регуляторных Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток, В-клеток, NK-клеток и макрофагов.

[38]

Применение по любому из п.п. [32]-[37], где рак представляет собой один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, рака головы и шеи, рака пищевода, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака яичников, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака почки, рака кожи, опухоли мышц, рака поджелудочной железы, рака простаты, рака семенников, рака матки, холангиокарциномы, карциномы из клеток Меркеля, рака мочевого пузыря, рака щитовидной железы, шванномы, рака надпочечников, рака анального канала, опухоли центральной нервной системы, опухоли нейроэндокринной ткани, рака полового члена, опухоли плевры, опухоли слюнной железы, рака вульвы, тимомы, лимфомы, миелоидного лейкоза и детского рака.

[38.1]

Применение по любому из п.п. [32]-[38], где рак представляет собой один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака молочной железы, рака кожи, лимфомы, и миелоидного лейкоза.

[39]

Набор для лечения рака, включающий:

(1) фармацевтическую композицию, содержащую анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу по любому из п.п. [1]-[5] в качестве активного ингредиента; а также

(2) листок-вкладыш или этикетку, инструктирующие о введении по меньшей мере одного другого противоракового агента до, одновременно или после введения фармацевтической композиции.

[39.1]

Набор по п. [39], отличающийся тем, что фармацевтическая композиция находится в контейнере.

[39.2]

Набор по любому из п.п. [39]-[39.2], отличающийся тем, что фармацевтическую композицию, содержащую анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу в качестве активного ингредиента, применяют для введения пациенту одновременно с другим противораковым средством.

[39.3]

Набор по любому из п.п. [39] или [39.1], отличающийся тем, что фармацевтическую композицию, анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу в качестве активного ингредиента, применяют для введения пациенту до или после введения другого противоракового средства.

[40]

Набор по любому из пп. [39]-[39.2], отличающийся тем, что другой противораковый агент представляет собой по меньшей мере один противораковый агент, выбранный из химиотерапевтического агента, Т-клетки активирующего агониста, ингибитора контрольной точки иммунного ответа, перенаправляющей Т-клетки антигенсвязывающей молекулы, антифиброзного агента и ингибитора ангиогенеза.

[40.1]

Набор по п. [40], в котором другим противораковым средством является химиотерапевтическое средство.

[40.2]

Набор по п.п. [40] или [40.1], в котором другое противораковое средство представляет собой по меньшей мере одно химиотерапевтическое средство, выбранное из антиметаболитов, растительных алкалоидов и соединений платины.

[40,3]

Набор по п. [40], в котором другое противораковое средство представляет собой Т-клетки активирующий агонист.

[40,4]

Набор по п.п. [40] или [40.3], где другой противораковый агент представляет собой анти-TNFRSF агонистическое антитело.

[41]

Набор по п. [40], в котором противораковое средство представляет собой ингибитор контрольной точки иммунного ответа.

[42]

Набор по п.п. [40] или [41], где противораковое средство представляет собой по меньшей мере один ингибитор контрольной точки иммунного ответа, выбранный из анти-PD1 антитела, анти-PDL1 антитела, анти-TIGIT антитела, анти-TIM3 антитела и анти-LAG3 антитела.

[42.1]

Набор по любому из п.п. [40], [41] и [42], отличающийся тем, что противораковое средство представляет собой , анти-PDL1 антитело и/или анти-TIGIT антитело.

[42.2]

Набор по любому из п.п. [39]-[42.1], предназначенный для лечения рака, резистентного к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа.

[42.3]

Набор по п. [42.2], в котором рак, резистентный к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа, представляет собой рак, имеющий мутацию в генах JAK1, JAK2 и/или B2M.

[43]

Набор по п. [40], в котором противораковое средство представляет собой перенаправляющую Т-клетки антигенсвязывающую молекулу.

[43.1]

Набор по п.п. [40] или [43], где противораковое средство представляет собой мультиспецифическое антитело, обладающее активностью связывания с CD3 и раковым антигеном.

[43.2]

Набор по п. [43.1], где мультиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело.

[44]

Набор по любому из п.п. [39]-[39.2], отличающийся тем, что другой противораковый агент представляет собой агент, который истощает и/или инактивирует одну или несколько клеток, выбранных из регуляторных Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток, В-клеток, NK-клеток и макрофагов.

[45]

Набор по любому из п.п. [39]-[44], отличающийся тем, что рак представляет собой один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, рака головы и шеи, рака пищевода, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака яичников, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака почки, рака кожи, опухоли мышц, рака поджелудочной железы, рака простаты, рака семенников, рака матки, холангиокарциномы, карциномы из клеток Меркеля, рака мочевого пузыря, рака щитовидной железы, шванномы, рака надпочечников, рака анального канала, опухоли центральной нервной системы, опухоли нейроэндокринной ткани, рака полового члена, опухоли плевры, опухоли слюнной железы, рака вульвы, тимомы, лимфомы, миелоидного лейкоза и детского рака.

[45.1]

Набор по любому из п.п. [39]-[44], отличающийся тем, что рак представляет собой один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака молочной железы, рака кожи, лимфомы и миелоидного лейкоза.

[46]

Способ лечения рака, включающий введение анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы по любому из п.п. [1]-[5] пациенту, имеющему (i) солидный рак, инфильтрированный одной или несколькими клетками, выбранными из B-клеток, дендритных клеток, природных клеток-киллеров, макрофагов и $CD8^+$ T-клеток и/или (ii) солидный рак, инфильтрированный регуляторной T-клеткой (Treg) или $CD4^+$ T-клеткой.

[46.1]

Способ по п. [46], где пациентом является пациент с солидным раком, инфильтрированным $CD8^+$ T-клетками.

[47]

Способ по п.п. [46] или [46.1], где у пациента рак, резистентный к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа.

[48]

Способ по любому из п.п. [46]-[47], отличающийся тем, что у пациента имеется один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, рака головы и шеи, рака пищевода, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака яичников, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака почки, рака кожи, опухоли мышц, рака поджелудочной железы, рака простаты, рака семенников, рака матки, холангиокарциномы, карциномы из клеток Меркеля, рака мочевого пузыря, рака щитовидной железы, шванномы, рака надпочечников, рака анального канала, опухоли центральной нервной системы, опухоли нейроэндокринной ткани, рака полового члена, опухоли плевры, опухоли слюнной железы, рака вульвы, тимомы, лимфомы, миелоидного лейкоза и детского рака.

[48.1]

Способ по любому из п.п. [46]-[48], отличающийся тем, что пациентом является пациент с одним или несколькими видами рака, выбранными из группы, состоящей из рака желудка, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака молочной железы, рака кожи, лимфомы и миелоидного лейкоза.

[49]

Способ лечения рака, который включает введение анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы по любому из п.п. [1]-[5] пациенту в комбинации по меньшей мере с одним другим противораковым средством.

[49.1]

Способ по п. [49], отличающийся тем, что анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу вводят пациенту одновременно с другим противораковым средством.

[49.2]

Способ по п. [49], отличающийся тем, что анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу вводят пациенту до или после введения другого противоракового средства.

[50]

Способ по любому из п.п. [49]-[49.2], отличающийся тем, что другое противораковое средство представляет собой по меньшей мере одно противораковое средство, выбранное из химиотерапевтического средства, Т-клетки активирующего агониста, ингибитора контрольной точки иммунного ответа, перенаправляющей Т-клетки антигенсвязывающей молекулы, антифиброзного агента и ингибитора ангиогенеза.

[50.1]

Способ по п. [50], в котором другое противораковое средство представляет собой химиотерапевтическое средство.

[50.2]

Способ по п.п. [50] или [50.1], где другой противораковый агент представляет собой по меньшей мере один химиотерапевтический агент, выбранный из антиметаболитов, растительных алкалоидов и соединений платины.

[50.3]

Способ по п. [50], где другой противораковый агент представляет собой Т-клетки активирующий агонист.

[50.4]

Способ по п.п. [50] или [50.3], где другой противораковый агент представляет собой анти-TNFRSF агонистическое антитело.

[51]

Способ по п. [50], где другой противораковый агент представляет собой ингибитор контрольной точки иммунного ответа.

[52]

Способ по п.п. [50] или [51], где другой противораковый агент представляет собой по меньшей мере один ингибитор контрольной точки иммунного ответа, выбранный из анти-PD1 антитела, анти-PDL1 антитела, анти-TIGIT антитела, анти-TIM3 антитела и анти-LAG3 антитела.

[52.1]

Способ по любому из п.п. [50], [51] и [52], отличающийся тем, что другой противораковый агент представляет собой анти-PDL1антитело и/или анти-TIGIT.

[52.2]

Способ по любому из п.п. [49]-[52.1] для лечения рака, резистентного к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа.

[52.3]

Способ по п. [52.2], где рак, резистентный к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа, представляет собой рак, имеющий мутацию в генах JAK1, JAK2 и/или B2M.

[53]

Способ по п. [50], где другой противораковый агент представляет собой перенаправляющую Т-клетки антигенсвязывающую молекулу.

[53.1]

Способ по п.п. [50] или [53], где другой противораковый агент представляет собой мультиспецифическое антитело, обладающее активностью связывания с CD3 и раковым антигеном.

[53.2]

Способ по п. [53.1], где мультиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело.

[54]

Способ по любому из п.п. [49]-[49.2], отличающийся тем, что другой противораковый агент представляет собой агент, который истощает и/или инактивирует одну или несколько клеток, выбранных из регуляторных Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток, В-клеток, NK-клеток и макрофагов.

[55]

Способ по любому из п.п. [49]-[54], отличающийся тем, что рак представляет собой один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, рака головы и шеи, рака пищевода, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака яичников, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака почки, рака кожи, опухоли мышц, рака поджелудочной железы, рака простаты, рака семенников, рака матки, холангиокарциномы, карциномы из клеток Меркеля, рака мочевого пузыря, рака щитовидной железы, шванномы, рака надпочечников, рака анального канала, опухоли центральной нервной системы, опухоли нейроэндокринной ткани, рака полового члена, опухоли плевры, опухоли слюнной железы, рака вульвы, тимомы, лимфомы, миелоидного лейкоза и детского рака.

[55.1]

Способ по любому из п.п. [49]-[55], отличающийся тем, что рак представляет собой один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака молочной железы, рака кожи, лимфомы и миелоидного лейкоза.

[56]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по любому из п.п. [1]-[5], которая предназначена для лечения:

(i) солидного рака, инфильтрированного одной или несколькими клетками, выбранными из В-клеток, дендритных клеток, природных клеток-киллеров, макрофагов и $CD8^+$ Т-клеток и/или

(ii) солидного рака, инфильтрированного регуляторными Т-клетками (Treg) или CD4+ Т-клетками.

[56.1]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по п. [56], где рак представляет собой солидный рак, инфильтрированный $CD8^+$ Т-клетками.

[57]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по п.п. [56] или [56.1], где рак представляет собой рак, резистентный к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа.

[58]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по любому из п.п. [56]-[57], где рак представляет собой один или более видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, рака головы и шеи, рака пищевода, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака яичников, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака почки, рака кожи, опухоли мышц, рака поджелудочной железы, рака простаты, рака семенников, рака матки, холангиокарциномы, карциномы из клеток Меркеля, рака мочевого пузыря, рака щитовидной железы, шванномы, рака надпочечников, рака анального канала, опухоли центральной нервной системы, опухоли нейроэндокринной ткани, рака полового члена, опухоли плевры, опухоли слюнной железы, рака вульвы, тимомы, лимфомы, миелоидного лейкоза и детского рака.

[58.1]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по любому из п.п. [56]-[58], где рак представляет собой один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака молочной железы, рака кожи, лимфомы и миелоидного лейкоза.

[59]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по любому из п.п. [1]–[5], которая предназначена для лечения рака в комбинации по меньшей мере с одним другим противораковым средством.

[59.1]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по п. [59], где лечение отличается введением анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы одновременно с другим противораковым средством.

[59.2]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по п. [59], где лечение характеризуется введением анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы до или после введения другого противоракового агента.

[60]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по любому из п.п. [59]-[59.2], где другое противораковое средство представляет собой по меньшей мере одно противораковое средство, выбранное из химиотерапевтического средства, Т-клетки активирующего агониста, ингибитора контрольной точки иммунного ответа, перенаправляющей Т-клетки антигенсвязывающей молекулы, антифиброзного агента и ингибитора ангиогенеза.

[60.1]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по п. [60], где другим противораковым средством является химиотерапевтическое средство.

[60.2]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по п.п. [60] или [60.1], где другой противораковый агент представляет собой по меньшей мере один химиотерапевтический агент, выбранный из антиметаболитов, растительных алкалоидов и соединений платины.

[60.3]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по п. [60], где другой противораковый агент представляет собой Т-клетки активирующий агонист.

[60.4]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по п.п. [60] или [60.3], где другой противораковый агент представляет собой анти-TNFRSF агонистическое антитело.

[61]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по п. [60], где другой противораковый агент представляет собой ингибитор контрольной точки иммунного ответа.

[62]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по п.п. [60] или [61], где другой противораковый агент представляет собой по меньшей мере один ингибитор контрольной точки иммунного ответа, выбранный из анти-PD1 антитела, анти-PDL1 антитела, анти-TIGIT антитела, анти-TIM3 антитела и анти-LAG3 антитела.

[62.1]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по любому из п.п. [60], [61] и [62], где другое противораковое средство представляет собой анти-PDL1 антитело и/или анти-TIGIT антитело.

[62.2]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по любому из п.п. [59]–[62.1], которая предназначена для лечения рака, резистентного к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа.

[62.3]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по п. [62.2], где рак, резистентный к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа, представляет собой рак, имеющий мутацию в генах JAK1, JAK2 и/или B2M.

[63]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по п. [60], где другой противораковый агент представляет собой перенаправляющую T-клетки антигенсвязывающую молекулу.

[63.1]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по п.п. [60] или [63], где другой противораковый агент представляет собой мультиспецифическое антитело, обладающее активностью связывания с CD3 и раковым антигеном.

[63.2]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по п. [63.1], где мультиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело.

[64]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по любому из п.п. [59]-[59.2], где другой противораковый агент представляет собой агент, который истощает и/или инактивирует одну или несколько клеток, выбранных из регуляторных T-клеток, $CD4^+$ T-клеток, B-клеток, NK-клеток и макрофагов.

[65]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по любому из п.п. [59]-[64], где рак представляет собой один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, рака головы и шеи, рака пищевода, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака яичников, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака почки, рака кожи, опухоли мышц, рака поджелудочной железы, рака простаты, рака семенников, рака матки, холангиокарциномы, карциномы из клеток Меркеля, рака мочевого пузыря, рака щитовидной железы, шванномы, рака надпочечников, рака анального канала, опухоли центральной нервной системы, опухоли нейроэндокринной ткани, рака полового члена, опухоли плевры, опухоли слюнной железы, рака вульвы, тимомы, лимфомы, миелоидного лейкоза и детского рака.

[65.1]

Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по любому из п.п. [59]-[65], где рак представляет собой один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака молочной железы, рака кожи, лимфомы и миелоидного лейкоза.

[66]

Применение анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы по любому из п.п. [1]-[5] для получения лекарственного средства для лечения рака, где рак является

(i) солидным раком, инфильтрированным одной или несколькими клетками, выбранными из из B-клеток, дендритных клеток, природных клеток-киллеров, макрофагов и $CD8^+$ T-клеток, и/или

(ii) солидным раком, инфильтрированным регуляторными T-клетками (Treg) или CD4+ T-клетками.

[66.1]

Применение по п. [66], где рак представляет собой солидный рак, инфильтрированный $CD8^+$ T-клетками.

[67]

Применение по п.п. [66] или [66.1], где рак представляет собой рак, резистентный к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа.

[68]

Применение по любому из п.п. [66]-[67], где рак представляет собой один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, рака головы и шеи, рака пищевода, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака яичников, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака почки, рака кожи, опухоли мышц, рака поджелудочной железы, рака простаты, рака семенников, рака матки, холангиокарциномы, карциномы из клеток Меркеля, рака мочевого пузыря, рака щитовидной железы, шванномы, рака надпочечников, рака анального канала, опухоли центральной нервной системы, опухоли нейроэндокринной ткани, рака полового члена, опухоли плевры, опухоли слюнной железы, рака вульвы, тимомы, лимфомы, миелоидного лейкоза и детского рака.

[68.1]

Применение по любому из п.п. [66]-[68], где рак представляет собой один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака молочной железы, рака кожи, лимфомы и миелоидного лейкоза.

[69]

Применение анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы по любому из п.п. [1]-[5] для получения лекарственного средства для лечения рака, при этом лекарственное средство характеризуется использованием в комбинации по меньшей мере с одним другим противораковым средством.

[69.1]

Применение по п. [69], отличающееся тем, что лекарственное средство вводят одновременно с другим противораковым средством.

[69.2]

Применение по п. [69], отличающееся тем, что лекарственное средство вводят до или после введения другого противоракового средства.

[70]

Применение по любому из п.п. [69]-[69.2], где другое противораковое средство представляет собой по меньшей мере одно противораковое средство, выбранное из химиотерапевтического средства, Т-клетки активирующего агониста, ингибитора контрольной точки иммунного ответа, перенаправляющей Т-клетки антигенсвязывающей молекулы, антифиброзного агента и ингибитора ангиогенеза.

[70.1]

Применение по п. [70], где другое противораковое средство представляет собой химиотерапевтическое средство.

[70.2]

Применение по п.п. [70] или [70.1], где другое противораковое средство представляет собой по меньшей мере одно химиотерапевтическое средство, выбранное из антиметаболитов, растительных алкалоидов и соединений платины.

[70.3]

Применение по п. [70], где другой противораковый агент представляет собой Т-клетки активирующий агонист.

[70.4]

Применение по п.п. [70] или [70.3], где другой противораковый агент представляет собой анти-TNFRSF агонистическое антитело.

[71]

Применение по п. [70], где другой противораковый агент представляет собой ингибитор контрольной точки иммунного ответа.

[72]

Применение по п.п. [70] или [71], где другое противораковое средство представляет собой по меньшей мере один ингибитор контрольной точки иммунного ответа, выбранный из анти-PD1 антитела, анти-PDL1 антитела, анти-TIGIT антитела, анти-TIM3 антитела и анти-LAG3 антитела.

[72.1]

Применение по любому из п.п. [70], [71] и [72], где другое противораковое средство представляет собой анти-PDL1 антитело и/или анти-TIGIT антитело.

[72.2]

Применение по любому из п.п. [69]-[72.1] для лечения рака, резистентного к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа.

[72.3]

Применение по п. [72.2], где рак, резистентный к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа, представляет собой рак, имеющий мутацию в генах JAK1, JAK2 и/или B2M.

[73]

Применение по п. [70], где другой противораковый агент представляет собой перенаправляющую Т-клетки антигенсвязывающую молекулу.

[73.1]

Применение по п.п. [70] или [73], где другой противораковый агент представляет собой мультиспецифическое антитело, обладающее активностью связывания с CD3 и раковым антигеном.

[73.2]

Применение по п. [73.1], где мультиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело.

[74]

Применение по любому из п.п. [69]-[69.2], где другой противораковый агент представляет собой агент, который истощает и/или инактивирует одну или несколько клеток, выбранных из регуляторных Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток, В-клеток, NK-клеток и макрофагов.

[75]

Применение по любому из п.п. [69]-[74], где рак представляет собой один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, рака головы и шеи, рака пищевода, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака яичников, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака почки, рака кожи, опухоли мышц, рака поджелудочной железы, рака простаты, рака семенников, рака матки, холангиокарциномы, карциномы из клеток Меркеля, рака мочевого пузыря, рака щитовидной железы, шванномы, рака надпочечников, рака анального канала, опухоли центральной нервной системы, опухоли нейроэндокринной ткани, рака полового члена, опухоли плевры, опухоли слюнной железы, рака вульвы, тимомы, лимфомы, миелоидного лейкоза и детского рака.

[75.1]

Применение по любому из п.п. [69]-[75], где рак представляет собой один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака молочной железы, рака кожи, лимфомы и миелоидного лейкоза.

Краткое описание фигур

Фигура 1. Противоопухолевый эффект A551-MB110/B379-ml0r в модели мыши, трансплантированной клетками LLC1/OVA/GPC3 клона C5.

Каждая точка показывает среднее значение объема опухоли одной группы (n = 7).

Фигура 2. Уровень экспрессии гена в образце опухоли при введении A551-MB110/B379-ml0r в модель мыши, трансплантированной клетками LLC1/OVA/GPC3 клона C5.

Фигура 2A показывает уровень экспрессии CD8b1; фигура 2Б показывает уровень экспрессии Gzmb; фигура 2В показывает уровень экспрессии Prf1; фигура 2Гпоказывает уровень экспрессии Ifng

Фигура 3. Степень активации $CD8^{+}$ Т-клеток в опухолевой ткани при введении A551-MB110/B379-ml0r в модели мыши, трансплантированной клетками LLC1/OVA/GPC3 клона C5.

Фигура 3A показывает долю OVA тетрамер$^{+}$ Т-клеток среди $CD8^{+}$ Т-клеток. На фигуре 3Б показана доля гранзим B^{+} Т-клеток среди $CD8^{+}$ Т-клеток. На фигуре 3В показана доля PD-1^{+} Т-клеток среди $CD8^{+}$ Т-клеток. На фигуре 3Г показана доля KLRG-1^{+} Т-клеток среди $CD8^{+}$ Т-клеток. На фигуре 3Д показана доля $ICOS^{+}$ Т-клеток среди $CD8^{+}$ Т-клеток.

Фигура 4. Противоопухолевый эффект A551-MB110/B379-ml0r в модели мыши, трансплантированной клетками E.G7-OVA.

Фигура 4A. Изменение объема опухоли у каждой мыши в группе, в которой животным вводили разбавитель. На фигуре 4Б показано изменение объема опухоли у каждой мыши в группе введения A551-MB110/B379-ml0r (2,5 мг/кг).

Фигура 5. Противоопухолевый эффект A375-mIgG1/B167-ml0r в модели мыши, трансплантированной клетками E.G7-OVA.

Фигура 5A. Изменение объема опухоли у каждой мыши в группе, в которой животным вводили разбавитель. На фигуре 5Б показано изменение объема опухоли у каждой мыши в группе введения A375-mIgG1/B167-ml0r (2,5 мг/кг).

Фигура 6. Противоопухолевый эффект A551-MB110/B379-ml0r в модели мыши, трансплантированной клетками C1498.

Фигура 6A. Изменение объема опухоли у каждой мыши в группе, в которой животным вводили разбавитель. На фигуре 6Б показано изменение объема опухоли у каждой мыши в группе введения A551-MB110/B379-ml0r (2,5 мг/кг).

Фигура 7. Противоопухолевый эффект A551-MB110/B379-ml0r в модели мыши, трансплантированной клетками Hepa1-6/hGPC3.

Фигура 7A. Изменение объема опухоли у каждой мыши в группе, в которой животным вводили разбавитель. На фигуре 7Б показано изменение объема опухоли у каждой мыши в группе введения A551-MB110/B379-ml0r (2,5 мг/кг).

Фигура 8. Противоопухолевый эффект A375-mIgG1/B167-ml0r в модели мыши, трансплантированной клетками Hepa1-6/hGPC3.

Фигура 8А. Изменение объема опухоли у каждой мыши в группе, в которой животным вводили разбавитель. На фигуре 8Б показано изменение объема опухоли у каждой мыши в группе введения A375-mIgG1/B167-ml0r (7,5 мг/кг).

Фигура 9. Влияние истощения (удаления) различных иммунных клеток ($CD4^+$ Т-клеток, $CD8^+$ Т-клеток, В-клеток, NK-клеток, гранулоцитов, макрофагов) на противоопухолевый эффект A551-MB110/B379-ml0r в модели мыши, трансплантированной клетками LLC1/OVA/GPC3 клона C5.

Фигура 10. Противоопухолевый эффект A551-MB110/B379-ml0r, anti-mouse PD-L1 антитела и их комбинации в модели мыши, трансплантированной клетками MC38.

Каждая точка показывает среднее значение объема опухоли в одной группе (n = 6).

Фигура 11. Противоопухолевый эффект (изменение массы тела) A551-MB110/B379-ml0r, anti-mouse PD-L1 антитела или их комбинации в модели мыши, трансплантированной клетками MC38.

Фигура 11А. Изменение массы тела каждой мыши в группе, в которой животным вводили разбавитель. На фигуре 11Б показано изменение массы тела каждой мыши в группе, в которой вводили A551-MB110/B379-ml0r. На фигуре 11В показано изменение массы тела каждой мыши в группе, в которой вводили anti-mouse PD-L1 антитело. На фигуре 11В показано изменение массы тела каждой мыши в группе, в которой вводили комбинацию A551-MB110/B379-ml0r и anti-mouse PD-L1 антитела. На фигуре 11Г показано изменение массы тела каждой мыши в группе, в которой вводили комбинацию A551-MB110/B379-ml0r и антитела.

Фигура 12. Изменения в экспрессии различных генов, связанных с иммунитетом, при введении A551-MB110/B379-ml0r, anti-mouse PD-L1 антитела или их комбинации модели мыши, трансплантированной клетками MC38, до и после введения каждого антитела или их комбинации.

Фигура 13. Степень экспрессии CD8 в опухолевой ткани модели мыши, трансплантированной клетками MC38, путем введения A551-MB110/B379-ml0r, anti-mouse PD-L1 антитела или их комбинации.

Фигура 13А показывает степень экспрессии CD8 в опухолевой ткани в группе, в которой вводили разбавитель; фигура 13Б показывает то же самое для группы, в которой вводили A551-MB110/B379-ml0r; фигура 13В показывает то же самое для группы, в которой вводили anti-mouse PD-L1 антитело; фигура 13Г показывает то же самое для группы, в которой вводили комбинацию A551-MB110/B379-ml0r и anti-mouse PD-L1 антитела.

Фигура 14. Степень экспрессии PD-L1 в опухолевой ткани путем введения A551-MB110/B379-ml0r, anti-mouse PD-L1 антитела или их комбинации в модель мыши, трансплантированной клетками MC38.

Фигура 14А показывает степень экспрессии PD-L1 в опухолевой ткани в группе, в которой вводили разбавитель; фигура 14Б показывает то же самое для группы, в которой вводили A551-MB110/B379-ml0r; фигура 13В показывает то же самое для группы, в которой вводили anti-mouse PD-L1 антитело; фигура 14Г показывает то же самое для группы, в которой вводили комбинацию A551-MB110/B379-ml0r и anti-mouse PD-L1 антитела.

Фигура 15. Степень маркеров функции печени, обнаруженных с помощью анализа крови вследствие введения A551-MB110/B379-ml0r, anti-mouse PD-L1 или их комбинации в модель мыши, трансплантированной клетками MC38.

На верхнем рисунке показывают ALT (ЕД/л), на нижнем рисунке – AST (ЕД/л).

Фигура 16. Степень увеличения числа $CD8^+$ Т-клеток в опухолевой ткани вследствие введения A551-MB110/B379-ml0r, anti-mouse PD-L1 антитела или их комбинации в модель мыши, трансплантированной клетками MC38.

Фигура 17. Противоопухолевый эффект A551-MB110/B379-ml0r, anti-mouse PD-L1 антитела или их комбинации в модели мыши, трансплантированной клетками LLC1/OVA/GPC3 клона C5.

Каждая точка показывает среднее значение объема опухоли в одной группе (n = 5).

Фигура 18. Противоопухолевый эффект A375-mIgG1/B167-ml0r, anti-mouse PD-L1 антитела или их комбинации в модели мыши, трансплантированной клетками C1498.

Каждая точка показывает среднее значение объема опухоли в одной группе (n = 5).

Фигура 19. Противоопухолевый эффект A375-mIgG1/B167-ml0r, anti-mouse PD-L1 антитела или их комбинации в модели мыши, трансплантированной клетками AE17.

Каждая точка показывает среднее значение объема опухоли в одной группе (n = 5).

Фигура 20. Противоопухолевый эффект A551-MB110/B379-ml0r, anti-hGPC3-mCD3 антитела или их комбинации в модели мыши, трансплантированной LLC1/hGPC3.

Каждая точка показывает среднее значение объема опухоли в одной группе (n = 5).

Фигура 21. Уровень экспрессии гена в образце опухоли вследствие введения A551-MB110/B379-ml0r, анти-hGPC3-mCD3 антитела или их комбинации в модель мыши, трансплантированной LLC1/hGPC3.

Фигура 21А показывает уровень экспрессии CD3e; фигура 21Б показывает уровень экспрессии CD8b1; фигура 21В показывает уровень экспрессии Gzmb; фигура 21Г показывает уровень экспрессии Prf1; фигура 21Д показывает уровень экспрессии Ifng, соответственно.

Фигура 22. Диаграмма, показывающая агонистическую активность различных анти-CD137 антител, исследованных с применением клеток Jurkat в присутствии или в отсутствие АТФ.

Ось X показывает концентрацию антитела (мкг/мл), ось Y показывает относительные световые единицы.

Фигура 23. Диаграмма, показывающая агонистическую активность различных анти-CD137 антител, исследованных с применением клеток Jurkat в присутствии или в отсутствие АДФ.

Ось X показывает концентрацию антитела (мкг/мл), ось Y показывает относительные световые единицы.

Фигура 24. Диаграмма, показывающая агонистическую активность различных анти-CD137 антител, исследованных с применением Т-клеток человека в присутствии или в отсутствие АДФ-бета-S (ADPбетаS).

Фигура 25. Диаграмма, показывающая агонистическую активность dBBAT119-P253/dBBAT119L-LamLib (анти-CD137 антитело, переключаемое низкомолекулярным соединением) или NS1-P253 (непереключаемое анти-CD137 антитело) исследованных с применением Т-клеток человека в присутствии или в отсутствие АДФ-бета-S.

Ось X показывает концентрацию антитела (мкг/мл), ось Y показывает количество выработанного IFN-γ (нг/мл).

Фигура 26. Диаграмма, показывающая АТФ-зависящую антигенсвязывающую активность различных анти-CD137 антител (переключаемое анти-CD137 антитело с улучшенной связывающей активностью), исследованную методом фагового иммуноферментного анализа (ELISA).

Ось Y показывает соотношение поглощения S/N (сигнал/шум) в присутствии/в отсутствие АТФ, а ось X показывает соотношение S/N в присутствии/в отсутствие антигена.

Фигура 27. Диаграмма, показывающая связывающую активность различных вариантов анти-CD137 антитела (dBAT119H-P253/dBAT119L-LamLib) с CD137 человека в присутствии или в отсутствие АТФ.

Верхний ряд показывает связывающую активность с CD137 человека в отсутствие АТФ, а нижний ряд показывает связывающую активность с CD137 человека в присутствии АТФ.

Фигура 28. Диаграмма, показывающая агонистическую активность dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib, dBBATk119H024-P253/dBBATk119L020-LamLib, IC17HdK-hIgG1/IC17L-k0 (контроль) или NS1-P253 (непереключаемого анти-CD137 антитела), используя Т-клетки человека в присутствии или в отсутствие АДФ-бета-S.

Фигура 28А показывает результаты тестирования в отсутствие АДФ-бета-S; фигура 7Б показывает результаты тестирования в присутствии АДФ-бета-S.

Ось X показывает концентрацию антитела (мкг/мл), ось Y показывает количество выработанного IFN-γ (нг/мл).

Фигура 29. Диаграмма, показывающая агонистическую активность различных переключаемых анти-CD137 антител, протестированных с использованием анализа репортерного гена 4-1BB Jurkat в присутствии или в отсутствие АТФ.

Фигура 29А показывает результаты тестирования в отсутствие АТФ; фигура 29Б показывает результаты тестирования в присутствии АТФ.

Фигура 30. Диаграмма, показывающая усиление агонистической активности различных анти-CD137 переключаемых антител в присутствии АТФ за счет увеличения связывающей активности константных областей тяжелой цепи с рецепторами Fcγ, протестированных с использованием мононуклеарных клеток периферической крови.

Фигура 30А показывает агонистическую активность, определенную с использованием количества выработанного IL-2 в качестве показателя; фигура 30Б показывает агонистическую активность, определенную с использованием количества выработанного IFN-β в качестве показателя.

Фигура 31. Диаграмма, показывающая усиление агонистической активности различных анти-CD137 переключаемых антител в присутствии АТФ за счет увеличения связывающей активности константных областей тяжелой цепи с рецепторами Fcγ или увеличения pI константных областей тяжелой цепи, по результатам анализа с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека.

Фигура 31А показывает агонистическую активность, определенную с использованием количества выработанного IL-2 в качестве показателя; фигура 31Б показывает агонистическую активность, определенную с использованием количества выработанного IFN-γ в качестве показателя.

Фигура 32. Диаграмма, показывающая усиление агонистической активности различных переключаемых анти-CD137 антител в присутствии или в отсутствие АТФ за счет увеличения связывающей активности константных областей тяжелой цепи с рецепторами Fcγ, определенную с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека.

Фигура 32А показывает агонистическую активность, определенную с использованием количества выработанного IL-2 в качестве показателя; фигура 32Б показывает агонистическую активность, определенную с использованием количества выработанного IFN-γ в качестве показателя.

Фигура 33. Диаграмма, показывающая усиление агонистической активности различных переключаемых анти-CD137 антител в присутствии или в отсутствие АТФ за счет повышения связывающей активности константных областей тяжелой цепи с рецепторами Fcγ, определенную с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека.

Фигура 33А показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IL-2 в качестве показателя; фигура 33Б показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IFN-γ в качестве показателя.

Фигура 34. Диаграмма, показывающая усиление агонистической активности различных переключаемых анти-CD137 антител в присутствии или в отсутствие АТФ за счет повышения связывающей активности константных областей тяжелой цепи с рецепторами Fcγ, определенное с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека.

Фигура 34А показывает агонистическая активность, определенную по количеству выработанного IL-2 в качестве показателя; фигура 34Б показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IFN-γ в качестве показателя.

Фигура 35. Диаграмма, показывающая усиление агонистической активности различных переключаемых анти-CD137 антител в присутствии или в отсутствие АТФ за счет увеличения связывающей активности константных областей тяжелой цепи с рецепторами Fcγ, по результатам исследования с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека.

Фигура 35А показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IL-2 в качестве показателя; фигура 35Б показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IFN-γ в качестве показателя.

Фигура 36. Диаграмма, показывающая усиление агонистической активности различных переключаемых анти-CD137 антител в присутствии или в отсутствие АТФ за счет увеличения связывающей активности константных областей тяжелой цепи с рецепторами Fcγ, по результатам исследования с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека.

Фигура 36А показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IL-2 в качестве показателя; фигура 36Б показывает агонистическую активность, определенную с применением количества выработанного IFN-γ в качестве показателя.

Фигура 37. Диаграмма, показывающая усиление агонистической активности различных переключаемых анти-CD137 антител в присутствии или в отсутствие

АТФ за счет повышения величины pI константных областей тяжелой цепи, определенное с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека.

Фигура 37А показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IL-2 в качестве показателя; фигура 37Б показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IFN-γ в качестве показателя.

Фигура 38. Диаграмма, показывающая усиление агонистической активности различных переключаемых анти-CD137 антител в присутствии или в отсутствие АТФ за счет повышения величины pI константных областей тяжелой цепи, определенной с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека.

Фигура 38А показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IL-2 в качестве показателя; фигура 38Б показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IFN-γ в качестве показателя.

Фигура 39. Диаграмма, показывающая усиление агонистической активности различных переключаемых анти-CD137 антител в присутствии или в отсутствие АТФ за счет повышения величины pI константных областей тяжелой цепи, определенное с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека.

Фигура 39А показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IL-2 в качестве показателя; фигура 39Б показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IFN-γ в качестве показателя.

Фигура 40. Диаграмма, показывающая усиление агонистической активности различных переключаемых анти-CD137 антител в присутствии или в отсутствие АТФ за счет повышения величины pI константных областей тяжелой цепи, определенное с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека.

Фигура 40А показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IL-2 в качестве показателя; фигура 40Б показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IFN-γ в качестве показателя.

Фигура 41. Диаграмма, показывающая усиление агонистической активности различных переключаемых анти-CD137 антител в присутствии или в отсутствие АТФ за счет повышения величины pI константных областей тяжелой цепи, определенное с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека.

Фигура 41А показывает агонистическую активность, определенная по количеству выработанного IL-2 в качестве показателя; фигура 41Б показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IFN-γ в качестве показателя.

Фигура 42. Диаграмма, показывающая усиление агонистической активности различных переключаемых анти-CD137 антител в присутствии или в отсутствие АТФ за счет повышения величины pI константных областей тяжелой цепи, определенное с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека.

Фигура 42А показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IL-2 в качестве показателя; фигура 42Б показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IFN-γ в качестве показателя.

Фигура 43. Диаграмма, показывающая усиление агонистической активности различных переключаемых анти-CD137 антител в присутствии или в отсутствие АТФ за счет повышения величины pI константных областей тяжелой цепи, определенное с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека.

Фигура 43А показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IL-2 в качестве показателя; фигура 43Б показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IFN-γ в качестве показателя.

Фигура 44. Диаграмма, показывающая усиление агонистической активности различных переключаемых анти-CD137 антител в присутствии или в отсутствие АТФ за счет увеличения связывающей активности константных областей тяжелой цепи с рецепторами Fcγ, по результатам исследования с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека.

Фигура 44А показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IL-2 в качестве показателя; фигура 44Б показывает агонистическую активность, определенную по количеству выработанного IFN-γ в качестве показателя.

Фигура 45. Диаграмма, показывающая концентрацию в плазме различных переключаемых и непереключаемых анти-CD137 антител, тестируемых с использованием мышей с нокином CD137 человека.

Все Fc от mIgG1.

Фигура 46. Диаграмма, показывающая концентрацию в плазме различных переключаемых и непереключаемых анти-CD137 антител, исследованных с использованием мышей с нокином CD137 человека.

Все Fc от MB110.

Фигура 47. Диаграмма, показывающая концентрацию в плазме различных переключаемых и непереключаемых анти-CD137 антител, проанализированных с использованием мышей с нокином CD137 человека.

Все Fc от MB492.

Фигура 48. Диаграмма, показывающая противоопухолевый эффект A375-mIgG1/B167-ml0r на модели мышей, трансплантированных клетками MC38.

Каждая точка показывает среднее значение объема опухоли для группы (n = 5).

Фигура 49. Диаграмма, показывающая массу органов модели мыши, трансплантированной клетками MC38 после введения антител (NO1-mIgG1 или A375-mIgG1/B167-ml0r).

Фигура 49А показывает массу лимфоузла; фигура 28Б показывает массу селезенки.

Фигура 50. Диаграмма, показывающая степень активации Т-клеток в лимфоузлах модели мыши, трансплантированной клетками MC38 после введения антител NO1-mIgG1 или A375-mIgG1/B167-ml0r.

Фигура 50А показывает процент PD-1-положительных Т-клеток среди CD8-положительных Т-клеток; фигура 50Б показывает процент ICOS-положительных Т-клеток среди $CD8^+$ Т-клеток; фигура 50В показывает процент гранзим B-положительных Т-клеток среди $CD8^+$ Т-клеток.

Фигура 51. Диаграмма, показывающая степень активации Т-клеток в селезенке модели мыши, трансплантированной клеточной линией МС38, после введения NO1-mIgG1 или A375-mIgG1/B167-ml0r.

Фигура 51А показывает процент PD-1-положительных Т-клеток среди CD8-положительных Т-клеток; фигура 51Б показывает процент ICOS-положительных Т-клеток среди CD8-положительных Т-клеток; фигура 51В показывает процент гранзим B-положительных Т-клеток среди CD8-положительных Т-клеток.

Фигура 52. Диаграмма, показывающая степень активации Т-клеток в печени модели мыши, трансплантированной клеточной линией МС38, после введения NO1-mIgG1 или A375-mIgG1/B167-ml0r.

Фигура 52А показывает процент PD-1-положительных Т-клеток среди CD8-положительных Т-клеток, фигура 52Б показывает процент гранзим B-положительных Т-клеток среди CD8-положительных Т-клеток.

Фигура 53. Диаграмма, показывающая противоопухолевый эффект A356-MB110/B040-ml0r в модели мыши, трансплантированный клеточной линией МС38.

Каждая точка показывает среднее значение объема опухоли для группы (n = 5).

Фигура 54. Диаграмма, показывающая массу органов в модели мыши, трансплантированной клеточной линией МС38 после введения NS2-MB110 или A356-MB110/B040-ml0r.

Фигура 54А показывает массу лимфоузла, а фигура 54Б показывает массу селезенки.

Фигура 55. Диаграмма, показывающая степень активации Т-клеток в печени модели мыши, трансплантированной клеточной линией МС38, после введения NS2-MB110 или A356-MB110/B040-ml0r.

Фигура 55А показывает процент PD-1-положительных Т-клеток среди CD8-положительных Т-клеток, фигура 55Б показывает процент ICOS-положительных Т-клеток среди CD8-положительных Т-клеток.

Фигура 56. Диаграмма, показывающая противоопухолевый эффект A372-mIgG1/B040-ml0r в модели мыши, трансплантированной клеточной линией МС38.

Каждая точка показывает среднее значение объема опухоли для группы (n = 5).

Фигура 57. Количество клеток лимфатического узла (фигура 57А) и масса селезенки (фигура Б) в модели мыши, трансплантированной клеточной линией MC38, после введения A372-mIgG1/B040-ml0r.

Фигура 58. Диаграмма, показывающая степень активации Т-клеток в печени модели мыши, трансплантированной клеточной линией MC38, после введения A372-mIgG1/B040-ml0r (процент гранзим B-положительных Т-клеток среди CD8-положительных Т-клеток).

Фигура 59. Диаграмма, показывающая противоопухолевый эффект A372-MB110/B040-ml0r в модели мыши, трансплантированной клеточной линией MC38.

Каждая точка показывает среднее значение объема опухоли для группы (n = 5).

Фигура 60. Диаграмма, показывающая массу органов модели мыши, трансплантированной клетками MC38, после введения NS2-MB110 или A372-MB110/B040-ml0r.

Фигура 60А показывает массу лимфоузла; фигура 60Б показывает массу селезенки.

Фигура 61. Диаграмма, показывающая степень активации Т-клеток в печени модели мыши, трансплантированной клеточной линией MC38, после введения NS2-MB110 или A372-MB110/B040-ml0r (процент PD-1-положительных Т-клеток среди CD8-положительных Т-клеток).

Фигура 62. Диаграмма, показывающая противоопухолевый эффект A372-MB110/B040-ml0r в модели мыши, трансплантированной клеточной линией MC38.

Каждая точка показывает среднее значение объема опухоли для группы (n = 5).

Фигура 63. Диаграмма, показывающая количество клеток лимфатического узла и массу органа селезенки в модели мыши, трансплантированной клеточной линией MC38, после введения NS1-MB492 или A372-MB492/B040-ml0r.

Фигура 63А показывает количество клеток лимфоузла, фигура 63Б показывает массу селезенки.

Фигура 64. Диаграмма, показывающая степень активации Т-клеток в печени модели мыши, трансплантированной клеточной линией MC38, после введения

NS1-MB492 или A372-MB492/B040-ml0r (процент гранзим В-положительных Т-клеток среди CD8-положительных Т-клеток).

Фигура 65. Диаграмма, показывающая противоопухолевый эффект A486-MB492/B167-ml0r или A488-MB492/B226-ml0r в модели мыши, трансплантированной клеточной линией MC38.

Каждая точка показывает среднее значение объема опухоли для группы (n = 5).

Фигура 66. Диаграмма, показывающая количество клеток в лимфоузле и массу селезенки в модели мыши, трансплантированной клеточной линией MC38, после введения NS1-MB492, A486-MB492/B167-ml0r или A488-MB492/B226-ml0r.

Фигура 66A показывает количество клеток в лимфоузле, фигура 66Б показывает массу селезенки.

Фигура 67. Диаграмма, показывающая уровень инфильтрации эффекторных клеток в печени модели мыши, трансплантированной клеточной линией MC38, после введения NS1-MB492, A486-MB492/B167-ml0r или A488-MB492/B226-ml0r (процент CD3-положительных и CD8-положительных Т-клеток среди CD45-положительных Т-клеток).

Фигура 68. Диаграмма, показывающая противоопухолевый эффект A489-MB492/B223-ml0r в модели мыши, трансплантированной клеточной линией MC38.

Каждая точка показывает среднее значение объема опухоли для группы (n = 5).

Фигура 69. Диаграмма, показывающая количество клеток лимфатического узла и количество клеток во фракции лимфоцитов селезенки в модели мыши, трансплантированной клеточной линией MC38, после введения NS1-MB492 или A489-MB492/B223-ml0r.

Фигура 69A показывает количество клеток лимфатического узла; фигура 69Б показывает количество клеток во фракции лимфоцитов селезенки.

Фигура 70. Диаграмма, показывающая степень активации Т-клеток в печени мышиной модели, трансплантированной клеточной линией MC38, после введения NS1-MB492 или A489-MB492/B223-ml0r (процент CD8-положительных Т-клеток среди CD45-положительных Т-клеток).

Фигура 71. Диаграмма, показывающая противоопухолевый эффект A548-mIgG1/B256-ml0r и A551-mIgG1/B256-ml0r в модели мыши, трансплантированной клеточной линией MC38.

Фигура 71A показывает противоопухолевый эффект A548-mIgG1/B256-ml0r; фигура 71Б показывает противоопухолевый эффект A551-mIgG1/B256-ml0r.

Фигура 72. Диаграмма, показывающая массу органов в модели мыши, трансплантированной клеточной линией MC38, после введения NS1-mIgG1, A548-mIgG1/B256-ml0r или A551-mIgG1/B256-ml0r.

Фигура 72A показывает массу лимфоузла, фигура 72Б показывает массу селезенки.

Фигура 73. Диаграмма, показывающая степень активации T-клеток в печени мышиной модели, трансплантированной клеточной линией MC38, после введения NS1-mIgG1, A548-mIgG1/B256-ml0r или A551-mIgG1/B256-ml0r.

Фигура 73A показывает процент PD-1-положительных T-клеток среди CD8-положительных T-клеток, фигура 52Б показывает процент гранзим B-положительных клеток среди CD8-положительных T-клеток.

Фигура 74. Диаграмма, показывающая противоопухолевый эффект A551-MB110/B379-ml0r в модели мыши, трансплантированной клеточной линией MC38.

Фигура 75. Диаграмма, показывающая массу органов в модели мыши, трансплантированной клеточной линией MC38 после введения NS1-mIgG1 или A551-MB110/B379-ml0r.

Фигура 75A показывает массу лимфатического узла; фигура 75Б показывает массу селезенки.

Фигура 76. Диаграмма, показывающая степень активации T-клеток в селезенке мышиной модели, трансплантированной клеточной линией MC38, после введения NS1-mIgG1 или A551-MB110/B379-ml0r.

Фигура 76A показывает процент PD-1-положительныхT-клеток среди CD8-положительных T-клеток; фигура 76Б показывает процент ICOS-положительных T-клеток среди CD8-положительных T-клеток; фигура 76B показывает процент гранзим B-положительных T-клеток среди CD8-положительных T-клеток.

Фигура 77. Диаграмма, показывающая степень активации Т-клеток в печени мышиной модели, трансплантированной клеточной линией MC38, после введения NS1-mIgG1 или A551-MB110/B379-ml0r.

Фигура 77А показывает процент PD-1-положительных Т-клеток среди CD8-положительных Т-клеток; фигура 77В показывает процент ICOS-положительных Т-клеток среди CD8-положительных Т-клеток; фигура 77Б показывает процент гранзим В-положительных Т-клеток среди CD8-положительных Т-клеток.

Фигура 78. Диаграмма, показывающая агонистическую активность различных анти-CD137 антител, используя клетки 4-1BB Jurkat в присутствии или в отсутствие низкомолекулярного соединения (АТФ или АДФ).

Ось X показывает концентрацию антитела (мкг/мл), а ось Y показывает относительные световые единицы.

Фигура 79. Диаграмма, показывающая агонистическую активность различных переключаемых анти-CD137 антител, протестированных с использованием анализа репортерного гена 4-1BB Jurkat в присутствии АТФ.

Фигура 80. Диаграмма, показывающая сравнение в плазме показателей кинетики для каждого из анти-CD137 переключаемых антител A375-SCF041aPh/B167-Lamlib и A375-MY201aPh/B167-Lamlib. Вертикальная ось графика показывает концентрацию каждого антитела в плазме.

Фигура 81. Диаграмма, показывающая противоопухолевый эффект каждого из A375/B167-SCF041aPh и A375/B167-MY201aPh в модели мыши, полученной путем трансплантации линии клеток LLC1/OVA/GPC3 мышам hCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90.

Каждая точка показывает среднюю величину объемов опухолей в группе (n=5).

Фигура 82. Количество клеток $CD8^+$ в опухолевой ткани после введения A551-MB110/B379-ml0r, anti-mouse PD-L1антитела или их комбинации в модель мышей, трансплантированных клетками MC38.

Фигура 83. Количество клеток $PD\text{-}L1^+$ в опухолевой ткани после введения A551-MB110/B379-ml0r, anti-mouse PD-L1 антитела или их комбинации в модель мышей, трансплантированных клетками MC38.

Фигура 84. Количество клеток со средней или высокой экспрессией PD-L1 в опухолевой ткани после введения A551-MB110/B379-ml0r, anti-mouse PD-L1 антитела или их комбинации в модель мышей, трансплантированных клетками MC38.

Фигура 85. Эффект подавления роста опухоли в модели мышей, трансплантированных клетками MC38, путем введения A551-MB110/B379-ml0r («Sta-MB»), UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») или anti-mouse PD-L1 антитела по отдельности или путем комбинированного введения A551-MB110/B379-ml0r («Sta-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab»), или комбинированного введения UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab»).

Фигура 86. Степень колебания параметров крови (концентрация лейкоцитов, концентрация тромбоцитов и концентрация лимфоцитов) в модели мышей, в которых трансплантировали клетки MC38, после введения A551-MB110/B379-ml0r («Sta-MB»), UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») или anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab») по отдельности, или комбинированным введением A551-MB110/B379-ml0r («Sta- MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab»), или комбинированным введением UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab").

Фигура 87. Масса органа селезенки и дренирующих опухоль лимфатических узлов (DLN) в модели мышей, трансплантированных клетками MC38, после введения A551-MB110/B379-ml0r («Sta-MB»), UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») или anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab») по отдельности, или комбинированным введением A551-MB110/B379-ml0r («Sta-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab»), или комбинированным введением UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab»).

Фигура 88. Степень экспрессии KLRG-1, ICOS, PD-1, LAG-3 в $CD8^+$ T-клетках и доля $Foxp3^+$ регуляторных T-клеток среди $CD4^+$ T-клеток в селезенке в модели мышей, трансплантированных клетками MC38, после введения A551-MB110/B379-ml0r («Sta-MB»), UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») или anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab») по отдельности, или комбинированного введения A551-MB110/B379-ml0r («Sta-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab»), или комбинированного введения UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab»).

Фигура 89. Доля $CD8^+$ T-клеток, положительных по каждому маркеру активации, среди $CD45^+$ лейкоцитов и доля положительных по $Foxp3^+$

регуляторных Т-клеток среди $CD45^+$ лейкоцитов в селезенке модели мышей, трансплантированных клетками MC38, после введения A551-MB110/B379-ml0r («Sta-MB»), UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») или anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab») по отдельности, или комбинированного введения A551-MB110/B379-ml0r («Sta-MB») и anti-mouse PD-L1антитела («PD-L1-Ab»), или комбинированного введения UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») и anti-mouse PD-L1антитела («PD-L1-Ab»).

Фигура 90. Экспрессия KLRG-1, ICOS, PD-1 и LAG-3 в $CD8^+$ Т-клетках и доля $Foxp3^+$ регуляторных Т-клеток среди $CD4^+$ Т-клеток в дренирующих опухоль лимфатических узлах (DLN) в модели мышей, трансплантированных клетками MC38, после введения A551-MB110/B379-ml0r («Sta-MB»), UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») или anti-mouse PD-L1 антитела («PD -L1-Ab») по отдельности, или комбинированного введения A551-MB110/B379-ml0r («Sta-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab»), или комбинированного введения UreH- MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab»).

Фигура 91. Абсолютное количество $CD8^+$ Т-клеток, положительных по каждому маркеру активации, и абсолютное количество $Foxp3^+$ регуляторных Т-клеток среди $CD4^+$ Т-клеток в дренирующих опухоль лимфатических узлах (DLN) в модели мышей, трансплантированных клетками MC38, после введения A551-MB110/B379-ml0r («Sta-MB»), UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») или anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab») по отдельности, или комбинированного введения A551 -MB110/B379-ml0r («Sta-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab»), или комбинированного введения UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab»).

Фигура 92. Экспрессия KLRG-1, ICOS, PD-1 и LAG-3 в $CD8^+$ Т-клетках и доля $Foxp3^+$ регуляторных Т-клеток среди $CD4^+$ Т-клеток в печени в модели мышей, трансплантированных клетками MC38, после введения A551-MB110/B379-ml0r («Sta-MB»), UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») или anti-mouse PD-L1 антитела PD-L1 («PD-L1-Ab») по отдельности, или комбинированного введения A551 -MB110/B379-ml0r («Sta-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab»), или комбинированного введения UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab»).

Фигура 93. Доля $CD8^+$ Т-клеток, положительных по каждому маркеру активации, среди $CD45^+$ лейкоцитов и доля положительных по $Foxp3^+$ регуляторных Т-клеток среди $CD45^+$ лейкоцитов в печени в модели мышей, трансплантированных клетками MC38, после введения A551-MB110/B379-ml0r (« Sta-MB»), UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») или anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab») по отдельности, или комбинированного введения A551-MB110/B379-ml0r («Sta-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab»), или комбинированного введения UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab»).

Фигура 94. Степень связывания Alexa488-меченого A551-MB110/B379-ml0r, Alexa488-меченого IC17HdK-MB110/IC17L-mk (отрицательный контроль) и непереключаемого анти-CD137 антитела Alexa488-меченого UreH-MB110/UreL-mk1 (положительный контроль) к фракции лимфоцитов в опухоли, селезенке и печени в модели мышей, трансплантированных клетками MC38, по данным анализа методом жидкостной цитометрии (FCM).

Фигура 95. Тепловая карта группы генов, которые показывают изменение экспрессии, связанное с внеклеточным АТФ, в различных тканях нормальных органов и различных опухолевых тканях.

Фигура 96. Степень экспрессии CD73 в различных линиях раковых клеток при анализе методом жидкостной цитометрии (FCM).

Фигура 97. Степень экспрессии CD39 и CD73 в раковых клетках, $CD4^+$ Т-клетках, $CD8^+$ Т-клетках и не Т-клетках мышей, трансплантированных LLC1/OVA/GPC3 клоном C5 клеточной линии, по данным анализа методом жидкостной цитометрии (FCM).

Что касается экспрессии CD39 и CD73, то опухолевые клетки, $CD4^+$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки и не Т-клетки тестировали по 5 раз с использованием разных образцов и рассчитывали среднее значение.

Фигура 98. Репрезентативная оценка, показывающая степень экспрессии CD39 и CD73 в опухолевых клетках, $CD4^+$ Т-клетках, $CD8^+$ Т-клетках и не Т-клетках мышей, трансплантированных LLC1/OVA/GPC3 клоном C5 клеточной линии, по данным анализа методом жидкостной цитометрии (FCM).

Фигура 99. Степень экспрессии CD39 и CD73 в раковых клетках, $CD4^+$ Т-клетках, $CD8^+$ Т-клетках и не Т-клетках мышей, трансплантированных клеточной линией MC38, по данным анализа методом жидкостной цитометрии (FCM).

Что касается экспрессии CD39 и CD73, то опухолевые клетки, $CD4^+$ T-клетки, $CD8^+$ T-клетки и не T-клетки тестировали по 5 раз с использованием разных образцов и рассчитывали среднее значение.

Фигура 100. Репрезентативная оценка, показывающая степень экспрессии CD39 и CD73 в опухолевых клетках, $CD4^+$ T-клетках, $CD8^+$ T-клетках и не T-клетках мышей, трансплантированных клеточной линией MC38, по данным анализа методом жидкостной цитометрии (FCM).

Фигура 101. Противоопухолевый эффект в модели мышей, трансплантированных клетками LLC1/OVA, путем введения A551-MB110/B379-ml0r («Sta-MB»), UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») или anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab») по отдельности, или комбинированным введением A551-MB110/B379-ml0r («Sta-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1 -Ab»), или комбинированным введением UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab»).

Фигура 102. Степень экспрессии KLRG-1, ICOS и PD-1 в $CD8^+$ T-клетках в дренирующих опухоль лимфатических узлах (DLN) в модели мышей, трансплантированных клетками LLC1/OVA, после введения A551-MB110/B379-ml0r («Sta-MB»), UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») или anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab») по отдельности, или комбинированного введения A551-MB110/B379- ml0r («Sta-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab»), или комбинированного введения UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab»).

Фигура 103. Абсолютное количество $CD8^+$ T-клеток, положительных по каждому маркеру активации, в дренирующих опухоль лимфатических узлах (DLN) в модели мышей, трансплантированных клетками LLC1/OVA, после введения A551-MB110/B379-ml0r («Sta-MB»), UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») или anti-mouse PD-L1 антитела PD-L1 («PD-L1-Ab») по отдельности, или комбинированного введения A551 -MB110/B379-ml0r («Sta-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab»), или комбинированного введения UreH-MB110/UreL-mk1 («Ure-MB») и anti-mouse PD-L1 антитела («PD-L1-Ab»).

Фигура 104. Эффект подавления роста опухоли в модели мышей, трансплантированных клетками LLC1/OVA, путем введения только A551-MB110/B379-ml0r («Sta-MB»).

Фигура 105. Эффект подавления роста опухоли при введении переключаемого анти-CD137 антитела A551-MB110/B379-ml0r или анти-TIGIT-антитела по отдельности или в комбинации переключаемого анти-CD137 антитела A551-MB110/B379-ml0r и анти-TIGIT антитела в модели мышей, трансплантированных клеточной линией мышей AML C1498.

Фигура 106. Противоопухолевый эффект переключаемого анти-CD137 антитела A551-MB110/B379-ml0r в модели мышей, трансплантированных MC38-hGPC3#G64 B2M KO клоном 5 клеточной линии.

<u>Варианты осуществления настоящего изобретения</u>

<u>I. Определения</u>

Понятие «связывающая активность» относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между одним или несколькими сайтами связывания молекулы (например, антитела) и их связывающим партнером (например, антигеном). В настоящем изобретении «связывающая активность» строго не ограничивается взаимодействием 1:1 между представителями связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Например, если представители связывающейся пары отражают одновалентное взаимодействие 1:1, связывающую активность в частности называют внутренним связывающим сродством (аффинностью). Если член связывающейся пары способен как к одновалентному связыванию, так и к поливалентному связыванию, активность связывания является суммой каждой силы связывания. Связывающая активность молекулы X в отношении ее партнера Y обычно может быть представлена константой диссоциации (KD) или «связывающим количеством исследуемого соединения на единицу количества лиганда» (ниже может называться «связывающее количество»). Специалистам очевидно, что, как правило, более низкое значение константы диссоциации (KD) означает более высокую связывающую активность, а более высокое значение «количества связывания аналита на единицу количества лиганда» или «количества связывания» означает более высокую активность связывания. Связывающую активность можно измерить обычными методами, известными в данной области, включая описанные в настоящем изобретении. Конкретные иллюстрации и примеры вариантов осуществления настоящего изобретения для измерения связывающей активности описаны ниже.

Понятие антигенсвязывающей молекулы или антитела с «созревшей связывающей активностью» или антигенсвязывающей молекулы или антитела с «повышенной (усиленной) связывающей активностью» относится к антителу с одним или несколькими изменениями в одной или нескольких гипервариабельных областях (HVR) по сравнению к исходной антигенсвязывающей молекулой или родительским антителом, которые не несут таких изменений; такие соединения приобретают улучшенную связывающую активность антигенсвязывающей молекулы или антитела в отношении антигена.

Термины «анти-CD137 антигенсвязывающая молекула против» или «анти-CD137-антитело» и «антигенсвязывающая молекула, которая связывается с CD137» или «антитело, которое связывается с CD137» относятся к антигенсвязывающей молекуле или антителу, которые способны связываться с CD137 с достаточной связывающей активностью, в соответствии с чем антигенсвязывающая молекула или антитело может использоваться в качестве диагностического и/или терапевтического агента для нацеливания на CD137. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антитело связывается с эпитопом CD137, который консервативен среди CD137 разных видов.

Понятие анти-CD137 антигенсвязывающей активности или анти-CD137 антитела, «обладающего CD137 связывающей активностью, зависящей от низкомолекулярного соединения», означает антигенсвязывающую молекулу или антитело, показывающее повышенную связывающую активность с CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения по сравнению со связывающей активностью с CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения «наличие низкомолекулярного соединения» относится к условию, при котором низкомолекулярное соединение присутствует в концентрации 10 мкМ или более, 50 мкМ или более, 100 мкМ или более, 150 мкМ или более, 200 мкМ или более или 250 мкМ или более. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения степень связывающей активности анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела с неродственным, белком, не являющимся CD137, в присутствии низкомолекулярного соединения составляет примерно менее 10%

связывания антигенсвязывающей молекулы или антитела с CD137 по данным измерения, например, с помощью радиоиммуноанализа (RIA, radioimmunoassay) или поверхностного плазмонного резонанса (SPR, surface plasmon resonance). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в присутствии низкомолекулярного соединения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело имеет константу диссоциации (KD) 1 мкМ или менее, 100 нМ или менее, 10 нМ или менее, 1 нМ или менее, 0,1 нМ или менее, 0,01 нМ или менее, или 0,001 нМ или менее (например, 10^{-6} М или менее, 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М или менее, 10^{-9} М или менее, 10^{-10} М или менее, например, от 10^{-6} М до 10^{-10} М, от 10^{-7} М до 10^{-9} М, например, от 10^{-7} М до 10^{-8} М).

В настоящем изобретении термин «антигенсвязывающая молекула» используют в самом широком смысле и он относится к молекуле, которая специфически связывается с антигенной детерминантой. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело, фрагмент антитела или производное антитела.

В контексте настоящего изобретения понятие «агонистическая антигенсвязывающая молекула» или «агонистическое антитело» в контексте настоящего изобретения представляет собой антигенсвязывающую молекулу или антитело, которые значительно индуцируют или усиливают биологическую активность антигена, с которым они связываются (например, CD137 и CD3).

Следовательно, если антигеном является, например, CD137, такая антигенсвязывающая молекула или антитело, обладающее агонистическим действием, называется «агонистической антигенсвязывающей молекулой CD137» или «агонистическим антителом CD137», соответственно.

В контексте настоящего изобретения понятие «антитело» используют в самом широком смысле и оно охватывает различные структуры антител, включая, но ими не ограничиваясь, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, если они проявляют необходимую антигенсвязывающую активность.

В контексте настоящего изобретения понятие «фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая включает часть интактного антитела, связывающую антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но ими перечень не ограничивают, Fv, Fab, Fab ', Fab’-SH, F(ab')2; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv); и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

«Антигенсвязывающая молекула, которая связывается с тем же эпитопом» или «антитело, которое связывается с тем же эпитопом», что и контрольная антигенсвязывающая молекула или контрольное антитело, относится к антителу или антигенсвязывающей молекуле, которые блокируют связывание контрольного антитела или контрольной антигенсвязывающей молекулы со своим антигеном в конкурентном анализе на 50% или более, и, наоборот, контрольное антитело блокирует связывание антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или более. Пример конкурентного анализа приводят в настоящем изобретении. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения в случае, если контрольная антигенсвязывающая молекула или контрольное антитело проявляет антигенсвязывающую активность в зависимости от низкомолекулярного соединения, конкурентный анализ проводят в присутствии низкомолекулярного соединения.

Понятие «химерное» антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи происходит из определенного источника или вида, в то время как остальная часть тяжелой и/или легкой цепи происходит из другого источника или вида.

Понятие «класс» антитела определяется типом константного домена или константной области, которой обладает его тяжелая цепь. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть далее разделены на подклассы (изотипы), например, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 и IgA_2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю, соответственно.

Понятие «эффекторные функции» относятся к тем биологическим активностям, приписываемым области Fc антитела, которые варьируют в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (CDC, complement dependent cytotoxicity); связывание с рецептором Fc; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity); фагоцитоз; понижающую регуляцию рецепторов на клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток); и активацию В-клеток.

Понятие «цитотоксичность» относится к активности, которая ингибирует или препятствует клеточной функции и/или вызывает гибель или разрушение клеток. Цитотоксичность может представлять собой, например, активность антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), активность комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) и цитотоксичность, обусловленную Т-клетками; также может быть цитотоксичность, вызванная цитотоксическими агентами (например, радиоизотопами и химиотерапевтическими агентами), такими как иммуноконъюгаты.

В контексте настоящего изобретения понятие «Fc-область» используют для определения С-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит, по меньшей мере, часть константной области. Понятие включает Fc-области с нативной последовательностью и варианты Fc-области. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения Fc-область тяжелой цепи IgG человека располагается от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако С-концевой лизин (Lys447) или глицин-лизин (остатки 446-447) Fc-области могут присутствовать или их может не быть. Если в настоящем изобретении не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области соответствует системе нумерации ЕС, также называемой индексом ЕС, как описано в книге Kabat с соавт., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5е изд., изд-во Национальные институты здравоохранения, Бетесда, Мэриленд, 1991.

Понятие «вариант Fc-области» в настоящем изобретении включает аминокислотную последовательность, которая отличается от нативной последовательности Fc-области по меньшей мере одной модификацией аминокислоты, предпочтительно одной или несколькими аминокислотными заменами. Предпочтительно вариант Fc-области имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с нативной последовательностью Fc-области или с Fc-областью исходного полипептида, например, от примерно одной до примерно десяти аминокислотных замен, и предпочтительно от примерно одной до примерно пяти аминокислотных замен в нативной последовательности Fc-области или в Fc-области исходного полипептида. В настоящем изобретении вариант Fc-области предпочтительно может быть гомологичным примерно на 80% нативной последовательности Fc-области и/или Fc-области исходного полипептида, и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно на 90%, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 95%.

В настоящем изобретении аминокислотные изменения или замены в Fc-области или константной области могут быть представлены комбинацией аминокислот, выраженной по системе нумерации EC. Например, S424N обозначает замену в положении 424 по нумерации EC серина (Ser) на аспарагин (Asn). EC424N означает замену в положении 424 по нумерации EC от аминокислоты (любого типа) на аспарагин (Asn).

В настоящем изобретении понятие «антитело, содержащее Fc-область» означает антитело, которое содержит Fc-область. C-концевой лизин (остаток 447 по системе нумерации EC) или C-концевой глицин-лизин (остатки 446-447) Fc-области можно удалить, например, во время очистки антитела или рекомбинантной инженерии нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело. Соответственно, композиция, содержащая антитело, имеющее Fc-область в соответствии с настоящим изобретением, может содержать антитело с G446-K447, с G446 и без K447, со всеми удаленными G446-K447, или смесь трех типов антител, описанных выше.

В настоящем изобретении понятия «антитело полной длины», «интактное антитело» и «целое антитело» используют взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего структуру, по существу аналогичную структуре нативного антитела, или имеющего тяжелые цепи, которые содержат Fc-область или вариант Fc-области согласно описанию настоящего изобретения.

Понятие «антитело человека» представляет собой антитело, которое обладает аминокислотной последовательностью, соответствующей последовательности антитела, вырабатываемого организмом человека, или клеткой человека, или полученного от другого источника (не от человека), в котором используют репертуары антител человека или другие последовательности, кодирующие антитела человека. Это определение антитела человека специально исключает гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающие остатки, не относящиеся к антителу человека.

Понятие «каркасный участок (FR, framework)» относится к остаткам вариабельного домена, отличным от остатков гипервариабельной области

(HVR). FR вариабельного домена обычно состоит из четырех доменов FR: FR1, FR2, FR3 и FR4. Соответственно, последовательности HVR и FR обычно появляются в следующем порядке в VH (или VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

В настоящем изобретении понятие «акцепторная каркасная область человека» представляет собой каркас, содержащий аминокислотную последовательность каркасной области вариабельного домена легкой цепи (VL) или каркасной области вариабельного домена тяжелой цепи (VH), полученной из каркаса иммуноглобулина человека или консенсусной каркасной области человека согласно описанному ниже. Акцепторная каркасная область человека, «происходящая из» каркасной области иммуноглобулина человека или консенсусной каркасной области человека, может содержать такую же аминокислотную последовательность, или она может содержать изменения аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество изменений аминокислот равно 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее или 2 или менее. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения акцепторная каркасная область VL человека идентична последовательности каркасной области VL иммуноглобулина человека или последовательности консенсусной каркасной области человека.

В настоящем изобретении понятие ««консенсусная каркасная область человека» означает наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки при отборе последовательностей VL или VH каркасного участка иммуноглобулина человека. Как правило, выбор последовательностей VL или VH иммуноглобулина человека осуществляют из подгруппы последовательностей вариабельных доменов. Обычно подгруппа последовательностей является подгруппой, описанной в книге Kabat с соавт., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5е изд., изд-во NIH Publication 91-3242, 1991, тома 1-3, Бетесда, Мэриленд. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения для VL подгруппой является подгруппа каппа I, описанная в книге Kabat с соавт., *supra.* В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения для VH подгруппой является подгруппа III, описанная в книге Kabat с соавт., *supra.*

Понятие «гуманизированное» антитело относится к химерному антителу, содержащему аминокислотные остатки из HVR, не относящихся к человеку, и аминокислотные остатки из FR человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гуманизированное антитело может включать практически все из по меньшей мере одного, обычно двух вариабельных доменов, в которых все или практически все HVR (например, CDR) соответствуют таковым из антитела, не являющегося антителом человека, и все или практически все из FR соответствуют таковым антитела человека. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, полученной из антитела человека. «Гуманизированная форма» антитела, например, не являющегося антителом человека, относится к антителу, которое было гуманизировано.

Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL, соответственно) нативного антитела обычно имеют сходные структуры, причем каждый домен включает четыре консервативных каркасных области (FR) и три гипервариабельные области (HVR). (См., например, Kindt с соавт. *Kuby Immunology*, 6^{th} ed., изд-во W.H. Freeman and Co., 2007, с. 91). Одного домена VH или VL может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, могут быть выделены с использованием домена VH или VL из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов VL или VH, соответственно. См., например, Portolano с соавт., *J. Immunol.* 150, 1993, 880-887; Clarkson с соавт., *Nature* 352, 1991, 624-628.

Термин «гипервариабельная область» или «HVR (hypervariable region)» в контексте настоящего изобретения относится к каждой из областей вариабельного домена антитела, которые являются гипервариабельными по последовательности («области, определяющие комплементарность» или «CDR (complementarity determining regions)»), и/или образуют структурно определенные петли («гипервариабельные петли»), и/или содержат остатки, контактирующие с антигеном («контакты антигена»). Обычно антитела содержат шесть HVR: три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). Примеры HVR в данном документе включают:

(а) гипервариабельные петли, встречающиеся при аминокислотных остатках 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia, Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 1987, 901-917);

(б) CDR, несущие аминокислотные остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) (Kabat с соавт., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5е изд., изд-во Национальные институты здравоохранения, Бетесда, Мэриленд, 1991);

(в) контакты антигена по аминокислотным остаткам 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) и 93-101 (H3) (MacCallum с соавт., *J. Mol. Biol.*, 262, 1996, 732-745);

(г) комбинации (а), (б) и/или (в), включающие аминокислотные остатки HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) и 94-102 (H3).

Если не указано иное, остатки HVR и другие остатки в вариабельном домене (например, остатки FR) пронумерованы в настоящем изобретении согласно Kabat с соавт., *supra*. В настоящем изобретении остатки HVR или другие остатки в вариабельном домене (например, остатки FR) и аминокислотные изменения или замены таких остатков могут быть представлены в виде комбинации по системе нумерации Kabat. Например, N99 означает аспарагин (Asn) в позиции 99 по нумерации Kabat, а N99A означает замещение в позиции 99 по нумерации Kabat аспарагина (Asn) на аланин (Ala).

В настоящем изобретении понятие «иммуноконъюгат» представляет собой антитело, конъюгированное с одной или несколькими гетерологичными молекулами (молекулой), включая, но им не ограничиваясь, цитотоксический агент.

В настоящем изобретении понятие «цитотоксический агент» относится к веществу, которое ингибирует или препятствует проявлению клеточной функции и/или вызывает гибель или разрушение клеток. Цитотоксические агенты включают, но не ограничиваются ими, радиоактивные изотопы (например, ^{211}At, ^{131}I, ^{125}I, ^{90}Y, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{212}Bi, ^{32}P, ^{212}Pb и радиоактивные изотопы Lu); химиотерапевтические агенты или лекарства (например, метотрексат, адриамицин, алкалоиды барвинка (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубицин, мелфалан, митомицин C, хлорамбуцил, даунорубицин или другие интеркалирующие агенты); агенты, ингибирующие рост; ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты; антибиотики; токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты; и различные противоопухолевые или противораковые агенты, описанные ниже.

Понятие «выделенное» антитело – это антитело, которое было отделено от компонентов его естественного окружения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело очищают до более чем 95% или 99% чистоты, что определяют, например, электрофоретическим методом (например, SDS-PAGE, изоэлектрическим фокусированием (IEF), капиллярным электрофорезом) или хроматографией (например, ионообменной или обращенно-фазовой ВЭЖХ). Для обзора методов оценки чистоты антител см., например, публикацию Flatman с соавт., *J. Chromatogr. B* 848, 2007, 79-87.

Понятие «выделенная» нуклеиновая кислота относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была отделена от компонентов ее естественного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно содержат молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты присутствует вне хромосомы или имеет хромосомную локализацию, которая отличается от ее естественной хромосомной локализации.

В настоящем изобретении понятие «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной размножаться с другой нуклеиновой кислотой, с которой она связана. Понятие включает вектор как самореплицирующуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Некоторые векторы способны управлять экспрессией нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в настоящем изобретении «векторами экспрессии».

Понятие «кодированная нуклеиновая кислота, кодирующая анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу» относится к одной или более молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептид (полипептиды), составляющие антигенсвязывающую молекулу. Понятие «выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая анти-CD137 антитело» относится к одной или более молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим тяжелую и легкую цепи антитела (или их фрагменты), включая такую молекулу (молекулы) нуклеиновой кислоты в одном векторе или в отдельных векторах, и такую молекулу (молекулы) нуклеиновой кислоты, присутствующие в одном или нескольких местах локализации в клетке-хозяине.

Понятия «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые была введена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. К клеткам-хозяевам относятся «трансформанты» и «трансформированные клетки», которые включают первичную трансформированную клетку и потомство, полученное от нее, независимо от количества пассажей. Потомство может быть не полностью идентичным родительской клетке по содержанию нуклеиновой кислоты, но может содержать мутации. В настоящем изобретении к данным понятиям также относятся мутантные потомки, которые обладают той же функцией или биологической активностью, что и проверенные или отобранные среди первоначально трансформированных клеток.

В контексте настоящего изобретения понятие «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантных антител, например, содержащих встречающиеся в природе мутации или возникающие во время получения препарата моноклонального антитела, такие варианты обычно присутствуют в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело в препарате моноклональных антител направлено против одной детерминанты на антигене. Таким образом, определение «моноклональное» указывает на характер антитела, как полученного по существу из гомогенной популяции антител, и не должно толковаться как требующее получения антитела каким-либо конкретным методом. Например, моноклональные антитела, которые будут использоваться в соответствии с настоящим описанием, могут быть получены различными методами, включая, но ими не ограничиваясь, гибридомный метод, методы рекомбинантной ДНК, методы фагового дисплея и методы с использованием трансгенных животных, содержащих все или часть локусов иммуноглобулина человека, а также другие методы получения моноклональных антител, примеры применения которых описаны в настоящем изобретении.

Термин «голое антитело» относится к антителу, которое не конъюгировано с гетерологичным фрагментом (например, с цитотоксическим фрагментом) или с радиоактивной меткой. Голое антитело может присутствовать в фармацевтическом составе.

Понятие «нативные антитела» относится к природным молекулам иммуноглобулинов различной структуры. Например, нативные антитела IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины массой примерно 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей, связанных дисульфидной связью. От N- к C-концу каждая тяжелая цепь имеет вариабельную область (VH), также называемую вариабельным тяжелым доменом или вариабельным доменом тяжелой цепи, за которой следуют три константных домена (CH1, CH2 и CH3). Аналогично, от N- до C-конца каждая легкая цепь имеет вариабельную область (VL), также называемую вариабельным легким доменом или вариабельным доменом легкой цепи, за которой следует константный домен легкой цепи (CL). Легкая цепь антитела может быть отнесена к одному из двух типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ) на основе аминокислотной последовательности соответствующего константного домена.

Понятие «процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» по отношению к контрольной полипептидной последовательности определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в контрольной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание для определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными методами, которые известны специалистам в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN, Megalign (DNASTAR) или GENETYX (зарегистрированная торговая марка) (фирма Genetyx Co., Ltd.). Специалисты в данной области могут определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Компьютерная программа для сравнения последовательностей ALIGN-2 была разработана фирмой Genentech, Inc., а исходный код был подан вместе с пользовательской документацией в Бюро регистрации авторских прав США, Вашингтон, округ Колумбия, 20559, где он зарегистрирован под номером регистрации авторских прав US TXU510087. Программа ALIGN-2 находится в открытом доступе от фирмы Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, Калифорния, или может быть скомпилирована из исходного кода. Программа ALIGN-2 может быть скомпилирована для использования в операционной системе UNIX, включая цифровую операционную систему UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей задаются программой ALIGN-2 и не меняются. В ситуациях, когда ALIGN-2 используют для сравнения аминокислотных последовательностей, процент идентичности данной аминокислотной последовательности аминокислотной последовательности А с/против аминокислотной последовательности Б (которая альтернативно может быть сформулирована как данная аминокислота последовательность А, которая имеет или содержит определенный процент идентичности аминокислотной последовательности с данной аминокислотной последовательностью В, с ней или против нее) рассчитывают следующим образом:

100-кратная фракция X/Y

где X означает количество аминокислотных остатков, оцененных как идентичные совпадения программой выравнивания последовательностей ALIGN-2 при выравнивании А и Б этой программой, и где Y означает общее количество аминокислотных остатков в Б. Следует учитывать, что если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности Б, процент идентичности аминокислотной последовательности А к Б не будет равняться проценту идентичности аминокислотной последовательности Б к А. Если специально не указано иное, все значения процентов идентичности аминокислотной последовательности, используемые в настоящем изобретении, получены непосредственно по описанию в предшествующем абзаце, с использованием компьютерной программы ALIGN-2.

Понятие «фармацевтический состав» относится к препарату, который находится в такой форме, которая позволяет биологической активности содержащегося в нем активного ингредиента быть эффективной, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому состав будет введен.

Понятие «фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту фармацевтического состава, отличному от активного ингредиента, который нетоксичен для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но ими не ограничивается, буфер, наполнитель, стабилизатор или консервант.

Понятие «эффективное количество» агента, например фармацевтического состава, относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата.

Понятие «индивидуум» или «субъект» означает млекопитающее. Млекопитающие включают, но ими возможный перечень не ограничивают, домашних животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, людей и других приматов, таких как обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крысы). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения индивидом или субъектом является человек.

В настоящем изобретении термин «CD137» относится к любому природному CD137 от любого из позвоночных, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. Понятие охватывает необработанный CD137«полной длины», а также любую форму CD137, которая является результатом процессинга в клетке. Термин также включает встречающиеся в природе варианты CD137, например, варианты сплайсинга или аллельные варианты.

Аминокислотная последовательность примера CD137 полной длины человека показана в SEQ ID NO: 1 (контрольная последовательность NCBI: NP_001552.2), а пример аминокислотной последовательности примера внеклеточного участка CD137 человека показана в SEQ ID NO: 2. Аминокислотная последовательность типичного CD137 полной длины мыши показана в SEQ ID NO: 3 (контрольная последовательность NCBI: NP_035742.1), аминокислотная последовательность типичного внеклеточного участка CD137 мыши показана в SEQ ID NO: 4. Аминокислотная последовательность примера CD137 полной длины обезьяны показана в SEQ ID NO: 5 (контрольная последовательность NCBI: ABY47575.1), аминокислотная последовательность примера внеклеточного участка CD137 обезьяны показана в SEQ ID NO: 6.

CD137 является представителем семейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNF). Его также обозначают как представитель 9 надсемейства рецепторов фактора некроза (TNFRSF9, tumor necrosis factor receptor superfamily member 9), 4-1BB и ILA. В дополнение к экспрессии на активированных $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетках, CD137 экспрессируется в В-клетках, дендритных клетках, природный клетках-киллерах (NK) и NK-Т-клетках, макрофагах, моноцитах, нейтрофилах, $CD4^+$ $CD25^+$ регуляторных Т-клетках и эндотелиальных клетках сосудов. Экспрессия в опухолевых клетках также описана (Labiano с соавт. *Oncoimmunology*, 24, 2015, e1062967). Природный лиганд CD137, CD137L, представлен антигенпрезентирующими клетками, такими как В-клетки, моноциты/макрофаги и дендритные клетки (Watts с соавт., *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 2005, 23-68). Благодаря взаимодействию с лигандом, CD137 вызывает увеличение TCR-индуцированной пролиферации Т-клеток, выработку цитокинов, функциональное созревание, подавление апоптоза и длительное выживание $CD8^+$ Т-клеток (Nam с соавт., *Curr. Cancer Drug Targets*, 5, 2005, 357-363; Watts, с соавт., *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 2005, 23-68).

Термин «регуляторная Т-клетка» или «Treg-клетка» представляет собой Т-клетку, ответственную за супрессивную регуляцию (иммунную толерантность) иммунного ответа. В одном варианте осуществления регуляторные Т-клетки представляют собой $CD4^+$ и/или $CD25^+$ Т-клетки.

Термины «карцинома», «рак» и «злокачественный» относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом/пролиферацией клеток.

Термин «опухоль» относится ко всем неопластическим клеткам роста и пролиферации, злокачественным или доброкачественным, и ко всем предраковым и злокачественным клеткам и тканям. Термины «карцинома», «рак», «злокачественный», «нарушение пролиферации клеток», «пролиферативное расстройство» и «опухоль» не являются взаимоисключающими в контексте настоящего изобретения.

Понятия «нарушение пролиферации клеток» и «пролиферативное расстройство» относятся к нарушениям, которые связаны с некоторой степенью аномальной пролиферации клеток. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения нарушение пролиферации клеток представляет собой рак. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения пролиферативное расстройство является раком.

В контексте настоящего изобретения понятие «лечение» (и его грамматические вариации, такие как «лечить») относится к клиническому вмешательству в попытке изменить состояние индивида, и может проводиться либо для профилактики, либо в ходе происходящей клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают, но не ограничиваются ими, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или паллиативное улучшение болезненного состояния и ремиссия или улучшенный прогноз. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела по настоящему изобретению применяют для отсрочки развития заболевания или медленного прогрессирования заболевания.

II. Композиции и способы (анти-CD137 агонистические антигенсвязывающие молекулы)

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение частично основано на анти-CD137 агонистических антигенсвязывающих молекулах и на их применениях. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают антитела, которые связываются с CD137. Антитела в настоящем изобретении могут проявлять активирующее действие на иммунные клетки, цитотоксичность или противоопухолевую активность и, следовательно, полезны, например, для диагностики или лечения рака.

A. Типичные анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают выделенные антигенсвязывающие молекулы или антитела, которые связываются с CD137. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела

- обладают CD137-связывающей активностью, зависящей от низкомолекулярного соединения;

- связываются с внеклеточной областью CD137;

- образуют тройной комплекс вместе с низкомолекулярным соединением и CD137;

- связываются с происходящим от человека CD137 и с происходящим от обезьяны CD137;

- являются агонистами по отношению к активности CD137;

- проявляют агонистическую активность по отношению к CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения;

- обладают низкой агонистической активностью к CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения; и/или

- практически не проявляют агонистической активности по отношению к CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения.

Связывающая активность антигенсвязывающих молекул или антител

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения связывающая активность антигенсвязывающих молекул или антител по настоящему изобретению в присутствии низкомолекулярного соединения обладает константой диссоциации (KD) 1 мкМ или менее, 100 нМ или менее, 10 нМ или менее, 1 нМ или менее, 0,1 нМ или менее, 0,01 нМ или менее или 0,001 нМ или менее (например, 10^{-6} M или менее, 10^{-7} M или менее, 10^{-8} M или менее, 10^{-9} M или менее, 10^{-10} M или менее, например от 10^{-6} M до 10^{-10} M, от 10^{-7} M до 10^{-9} M, например от 10^{-7} M до 10^{-8} M).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающую активность антигенсвязывающих молекул или антител измеряют с помощью радиоиммуноанализа (RIA) с применением антигена с радиоактивной меткой и выражают в виде KD. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения осуществляют RIA с версией Fab исследуемого антитела и его антигена. Например, аффинность раствора Fab с антигеном измеряют путем уравновешивания Fab с минимальной концентрацией (^{125}I)-меченого антигена в присутствии серии титрований немеченого антигена с последующим улавливанием связанного антигена с помощью планшета, покрытого анти-Fab антителами (см., например, Chen с соавт., *J. Mol. Biol.* 293, 1999, 865-881). Чтобы установить условия для анализа MICROTITER (зарегистрированная торговая марка) многолуночные планшеты (фирма Thermo Scientific) в течение ночи покрывают 5 мкг/мл захватывающего анти-Fab антитела (фирма Cappel Labs) в 50 мМ карбонате натрия (pH 9,6) и затем блокируют 2% (масса/объем) раствором бычьего сывороточного альбумина в ФСБ в течение от двух до пяти часов при комнатной температуре (примерно 23℃). В планшете без адсорбента (фирма Nunc, номер в каталоге 269620), 100 пМ или 26 пМ [^{125}I]-антигена смешивают с серийными разведениями исследуемого фрагмента Fab (например, соответствует оценке анти-VEGF антитела, Fab-12, в публикации Presta с соавт., *Cancer Res.* 57, 1997, 4593-4599). Исследуемый Fab затем инкубируют в течение ночи; однако инкубирование может длиться дольше (например, примерно 65 ч), чтобы убедиться, что реакция равновесия достигнута. После этого смеси переносят в планшет с захватом для инкубации при комнатной температуре (например, в течение 1 ч). Затем раствор удаляют и планшет промывают восемь раз 0,1% полисорбатом 20 (TWEEN-20 (торговая марка)) в ФСБ. После того, как планшеты высохнут, добавляют 150 мкл/лунку сцинтиллятора (MICROSCINT-20™; фирма Packard) и излучение с планшетов подсчитывают на гамма-счетчике TOPCOUNT TM (фирма Packard) в течение десяти мин. Концентрации каждого Fab, которые проявляют показатели менее или равные 20% максимального связывания, выбирают для использования в анализах конкурентного связывания.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения для измерения связывающей активности антитела применяют методы захвата лиганда, например, используя BIACORE (зарегистрированная торговая марка) T200 или BIACORE (зарегистрированная торговая марка) 4000 (фирма GE Healthcare, Уппсала, Швеция), которые основаны на методах анализа поверхностного плазмонного резонанса в качестве принципа измерения. Контролирующее программное обеспечение BIACORE (зарегистрированная торговая марка) используют для работы устройств. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения используют набор для связывания аминов (фирма GE Healthcare, Уппсала, Швеция), руководствуясь инструкциями производителя, чтобы молекула для захвата лиганда, например, антитело против метки, антитело против IgG, белка A и т.д., фиксировалась на сенсорном чипе (фирма GE Healthcare, Уппсала, Швеция), покрытом карбоксиметилдекстраном. Захватывающую лиганд молекулу разбавляют 10 мМ раствором ацетата натрия при соответствующем pH и вводят с соответствующей скоростью потока в течение соответствующего времени инъекции. Измерения связывающей активности осуществляют с использованием буфера, содержащего 0,05% полисорбат 20 (другое название – Tween-20 (зарегистрированная торговая марка)), в качестве буфера для измерений при скорости потока 10-30 микролитров в минуту, при измерении температуру предпочтительно поддерживают на уровне 25° или 37°. Для измерения, проводимого с антигеном и/или Fc-рецептором, захваченным лиганд-связывающей молекулой в качестве лиганда, вводят инъекцией антиген и/или Fc-рецептор, чтобы позволить захватить их целевое количество, а затем вводят инъекцией серийное разведение антитела (исследуемого соединения), приготовленное с использованием буфера для измерения.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения результаты измерений анализируют с использованием программного обеспечения BIACORE (зарегистрированная торговая марка) Evaluation Software. Расчет параметров кинетики выполняется путем подбора сенсограмм ассоциации и диссоциации одновременно с использованием модели связывания 1: 1 и скорости ассоциации (kon или ka), скорости диссоциации (koff или kd) и константы равновесной диссоциации (KD) могут быть рассчитаны. При слабой связывающей активности, в частности, для случаев, когда диссоциация является быстрой и параметры кинетики трудно вычислить, модель стационарного состояния может использоваться для расчета константы равновесной диссоциации (KD). В качестве дополнительных параметров, касающихся связывающей активности, «количество связывающего исследуемого соединения на единицу количества лиганда» можно рассчитать путем деления связывающего количества исследуемого соединения (резонансная единица: RU (resonance unit)) в конкретной концентрации на количество захваченного лиганда.

<u>Связывающая активность, зависящая от низкомолекулярного соединения</u>

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело обладает зависимой от низкомолекулярных соединений CD137-связывающей активностью. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, не ограничивающего его области охвата, антигенсвязывающая молекула или анти-CD137 антитело имеет более высокую связывающую активность в отношении CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения по сравнению со связывающей активностью в отношении CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения. В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело обладает повышенной связывающей активностью с CD137 в присутствии высокой концентрации низкомолекулярного соединения по сравнению с CD137-связывающей активностью в присутствии низкомолекулярного соединения при низкой концентрации. В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения связывающая активность анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела в отношении CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения больше в 2 раза или более, в 3 раза или более, в 5 раз или более, в 10 раз или более, в 15 раз или более, в 20 раз или более, в 25 раз или более, в 30 раз или более, в 50 раз или более, в 100 раз или более, в 200 раз или более, в 300 раз или более, в 500 раз или более, кратно 1×10^3 или более, кратно 2×10^3 или более, кратно 3×10^3 или более, кратно 5×10^3 или более, кратно 1×10^4 или более, кратно 2×10^4 или более, кратно 3×10^4 или более, кратно 5×10^4 или более или кратно 1×10^5 или более по сравнению со связывающей активностью в отсутствие низкомолекулярного соединения. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения связывающая активность анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела в отношении CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения больше чем в 2 раза, больше чем в 3 раза, больше чем в 5 раз, больше чем в 10 раз, больше чем в 15 раз, больше чем в 20 раз, больше чем в 25 раз, больше чем в 30 раз, больше чем в 50 раз, больше чем в 100 раз, больше чем в 200 раз, больше чем в 300 раз, больше чем в 500 раз, больше чем в 1 × 103 раз, больше чем в 2×10^3 раз, больше чем в 3×10^3 раз, больше чем в 5×10^3 раз, больше чем в 1×10^4 раз, больше чем в 2×10^4 раз, больше чем в 3×10^4 раз, больше чем в 5×10^4 раз или больше чем в 1×10^5 раз по сравнению со связывающей активностью в отсутствие низкомолекулярного соединения.

Концентрация низкомолекулярного соединения может быть любой произвольной концентрацией при условии, что обнаруживается различие в связывающей активности анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения концентрация низкомолекулярного соединения «в присутствии низкомолекулярного соединения» и/или «в присутствии высокой концентрации низкомолекулярного соединения» составляет, например, 100 нМ или более, 500 нМ или более, 1 мкМ или более, 3 мкМ или более, 5 мкМ или более, 10 мкМ или более, 50 мкМ или более, 100 мкМ или более, 150 мкМ или более, 200 мкМ или более, 250 мкМ или более, 300 мкМ или более, 400 мкМ или более, 500 мкМ или более или 1 мМ или более. В другом варианте концентрация может быть определена как количество, достаточное для анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела, чтобы продемонстрировать максимальную связывающую активность. Кроме того, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения концентрация низкомолекулярного соединения «в присутствии низкой концентрации низкомолекулярного соединения» может составлять, например, 500 мкМ или менее, 250 мкМ или менее, 200 мкМ или менее, 150 мкМ или менее, 100 мкМ или менее, 50 мкМ или менее, 10 мкМ или менее, 1 мкМ или менее, 500 нМ или менее, 100 нМ или менее, 50 нМ или менее, или 10 нМ или 1 нМ или менее. Случай, когда концентрация низкомолекулярного соединения равна нулю, или реальная концентрация равна нулю, также может быть выбран в качестве варианта осуществления настоящего изобретения при низкой концентрации.

В настоящем изобретении термин «реальная концентрация равна нулю» означает, например, концентрацию, которая настолько мала, что ее нельзя обнаружить с помощью современных технологий, хотя низкомолекулярное соединение присутствует.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающая активность в отношении CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения в концентрации 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ или 250 мкМ больше в 2 раза или более, в 5 раз или более, в 10 раз или более, в 15 раз или более, в 16 раз или более, в 17 раз или более, в 18 раз или более, в 19 раз или более, в 20 раз или более, по сравнению со связывающей активностью в отношении CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающая активность анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела против CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения в концентрации 10 мкМ или более больше в 2 раза или более, в 5 раз или более, в 10 раз или более, в 15 раз или более, в 16 раз или более, в 17 раз или более, в 18 раз или более, в 19 раз или более, в 20 раз или более по сравнению со связывающей активностью в отношении CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения. В еще одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающая активность анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела против CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения в концентрации 100 мкМ или более больше в 2 раза или более, в 5 раз или более, в 10 раз или более, в 15 раз или более, в 16 раз или более, в 17 раз или более, в 18 раз или более, в 19 раз или более, в 20 раз или более по сравнению со связывающей активностью в отношении CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающая активность (KD) анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела в отношении CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения в количестве 10 мкМ или более является константой диссоциации (KD) равной 9×10^{-7} М или менее, 8×10^{-7} М или менее, 7×10^{-7} М или менее, 6×10^{-7} М или менее, 5×10^{-7} М или менее, или 4×10^{-7} М или менее, или, предпочтительно, константой диссоциации (KD) равной 5×10^{-7} М или менее. В другом варианте осуществления настоящего изобретения связывающая активность (KD) анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела в отношении CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения слишком большая, чтобы ее можно было подсчитать с помощью Biacore (слабая связывающая активность), или это константа диссоциации (KD) 1×10^{-7} М или более, 5×10^{-7} М или более, 7×10^{-7} М или более, 8×10^{-7} М или более, 9×10^{-7} М или более, 1×10^{-6} М или более, 2×10^{-6} М или более, 3×10^{-6} М или более, или 4×10^{-6} М или более, или предпочтительно, константа диссоциации (KD) 1×10^{-6} М или более. В другом варианте осуществления настоящего изобретения связывающая активность (KD) анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела в отношении CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения в количестве 100 мкМ или более составляет 9×10^{-7} М или менее, 8×10^{-7} М или менее, 7×10^{-7} М или менее, 6×10^{-7} М или менее, 5×10^{-7} М или менее, 4×10^{-7} М или менее, 3×10^{-7} М или менее, 2×10^{-7} М или менее, или 1×10^{-7} М или менее, или предпочтительно, константа диссоциации (KD) составляет 2×10^{-7} М или менее. В другом варианте осуществления настоящего изобретения связывающая активность (KD) анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела в отношении CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения слишком велика для расчета с помощью Biacore (слабая связывающая активность), или представляет собой константу диссоциации (KD) 1×10^{-7} M или более, 5×10^{-7} M или более, 7×10^{-7} M или более, 8×10^{-7} M или более, 9×10^{-7} M или более, 1×10^{-6} M или более, 2×10^{-6} M или более, 3×10^{-6} M или более, или 4×10^{-6} M или более, или предпочтительно, константа диссоциации (KD) 1×10^{-6} M или более.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающая активность (KD) анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела в отношении CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения в количестве 10 мкМ или более представляет собой константу диссоциации (KD) 8×10^{-8} M или менее, и связывающая активность (KD) по отношению к CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения слишком велика, чтобы ее можно было рассчитать с помощью Biacore (слабая связывающая активность). В другом варианте осуществления настоящего изобретения связывающая активность (KD) анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела в отношении CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения в количестве 100 мкМ представляет собой константу диссоциации (KD) 2×10^{-8} M или менее, и связывающая активность по отношению к CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения слишком велика, чтобы ее можно было рассчитать с помощью Biacore (слабая связывающая активность).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, у которого значение [связывающей активности (связывающей величины) по отношению к CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения в концентрации 10 мкМ или более]/[связывающую активность (связывающее количество) по отношению к CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения)] такое же или больше, чем значение для контрольной анти-CD137 антигенсвязывающую молекулы. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, у которого значение [связывающая активность (количество связывания) в отношении CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения при 100 мкМ или более]/[связывающая активность (количество связывания) в отношении CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения)] такое же или больше, чем значение контрольной анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы. В любом из приведенных выше вариантов осуществления настоящего изобретения контрольная анти-CD137 антигенсвязывающая молекула может быть выбрана из анти-CD137 антител, содержащих HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, имеющих такие же аминокислотные последовательности, что и HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 , HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, содержащиеся в A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 или A549/B167, описанных в табл. 37.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения контрольная анти-CD137 антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело, содержащее аминокислотные последовательности A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 или A549/B167, описанные в табл. 37 в качестве комбинации вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения контрольная антигенсвязывающая молекула представляет собой анти-CD137 антитело, включающее HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, имеющие такие же аминокислотные последовательности, что и HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, содержащиеся в A375/B167. В другом варианте осуществления настоящего изобретения контрольная анти-CD137 антигенсвязывающая молекула представляет собой анти-CD137 антитело, содержащее A375/B167 в качестве комбинации вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения контрольная антигенсвязывающая молекула представляет собой анти-CD137 антитело, содержащее HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, имеющие такие же аминокислотные последовательности, что и HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, содержащиеся в A551/B379. В другом варианте осуществления настоящего изобретения контрольная анти-CD137 антигенсвязывающая молекула представляет собой анти-CD137 антитело, содержащее A551/B379 в качестве комбинации вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения контрольная антигенсвязывающая молекула содержит константные области тяжелой и легкой цепей человеческого происхождения (например, G1T3 (SEQ ID

NO: 138) в качестве константной области тяжелой цепи, λ-цепи человека Lamlib (SEQ ID NO: 63) в качестве константной области легкой цепи).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, у которого связывающая активность (связанное количество) в отношении CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения такое же или ниже связывающей активности контрольной анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы, а также, связывающая активность (связанное количество) в отношении CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения в концентрации 10 мкМ или более равно или более чем связывающая активность контрольной анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы в отношении CD137 в тех же условиях. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, у которого связывающая активность в отношении CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения такое же или меньше связывающей активности контрольного анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы, а также, связывающая активность (связанное количество) в отношении CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения в концентрации 10 мкМ или более равно или более чем связывающая активность (связанное количество) контрольной анти-CD137 связывающей активности в отношении CD137 в тех же условиях. В любом из приведенных выше вариантах осуществления настоящего изобретения контрольная анти-CD137 антигенсвязывающая молекула может быть выбрана из анти-CD137 антител, содержащих HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 , HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, имеющие те же аминокислотные последовательности, что и HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 , HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, содержащиеся в A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 или A549/B167, описанных в табл. 37.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения контрольная анти-CD137 антигенсвязывающая молекула является анти-CD137 антителом, содержащим аминокислотную последовательность A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 или A549/B167, описанных в табл. 37 в виде комбинации вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения контрольная анти-CD137 антигенсвязывающая молекула является анти-CD137 антителом, содержащим области HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, имеющие те же аминокислотные последовательности, что и HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, содержащиеся в A375/B167. В другом варианте осуществления настоящего изобретения контрольная анти-CD137 антигенсвязывающая молекула является анти-CD137 антителом, содержащим A375/B167 в виде комбинации вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения контрольная антигенсвязывающая молекула является анти-CD137 антителом, содержащим HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, имеющие те же аминокислотные последовательности, что и HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, содержащиеся в A551/B379. В другом варианте осуществления настоящего изобретения контрольная анти-CD137 антигенсвязывающая молекула является анти-CD137 антителом, содержащим A551/B379 в виде комбинации вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения контрольная антигенсвязывающая молекула содержит константные области тяжелой и легкой цепей, происходящих от человека (например, G1T3 (SEQ ID NO: 138) как константная область тяжелой цепи, λ цепь Lamlib человека (SEQ ID NO: 63) как константная область легкой цепи.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, у которого значение [связывающей активности (KD) по отношению к CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения в концентрации 1 мкМ]/[связывающей активности (KD) по отношению к CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения в концентрации 10 мкМ или более] такое же или больше, чем значение для контрольной анти-CD137 антигенсвязывающую молекулы. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, у которого значение [связывающей активности (KD) по отношению к CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения в концентрации 1 мкМ]/[связывающей активности (KD) по отношению к CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения в концентрации 100 мкМ или более] такое же или больше, чем значение для контрольной антигенсвязывающую молекулы. В любом из приведенных выше вариантах осуществления настоящего изобретения контрольная антигенсвязывающая молекула может быть выбрана из анти-CD137 антител, содержащих HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, имеющих такие же аминокислотные последовательности что и HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 , HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, содержащиеся в A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 или A549/B167, описанных в табл. 37.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения контрольной антигенсвязывающей молекулой является антитело, включающее аминокислотную последовательность A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 или A549/B167, описанные в табл. 37, в качестве комбинации вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения контрольной антигенсвязывающей молекулой является антитело, включающее HVR-H1, HVR- H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, имеющих такие же аминокислотные последовательности что и HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, содержащиеся в A375/B167. В другом варианте осуществления настоящего изобретения контрольной антигенсвязывающей молекулой является антитело, включающее A375/B167 в качестве комбинации вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи. В другом варианте осуществления настоящего изобретения контрольной антигенсвязывающей молекулой является антитело, включающее HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, имеющие ту же аминокислотную последовательность, что и HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, содержащиеся в A551/B379. В другом варианте осуществления настоящего изобретения контрольной антигенсвязывающей молекулой является антитело, включающее A551/B379 в качестве комбинации вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения контрольная антигенсвязывающая молекула включает константные области тяжелой и легкой цепей, происходящих от человека (например, G1T3 (SEQ ID NO: 138) в качестве константной области тяжелой цепи, λ цепь Lamlib человека (SEQ ID NO: 63) в качестве константной области легкой цепи).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающую активность анти-CD137 антитела в отношении CD137, при наличии, отсутствии, высокой концентрации и/или низкой концентрации низкомолекулярного соединения измеряют, например, методом захвата лиганда с использованием BIACORE (зарегистрированная торговая марка) T200 поверхностного плазмонного резонанса в качестве принципа измерения.

Детали примера метода измерения связывающей активности анти-CD137 антитела в отношении CD137 описаны ниже. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающую активности анти-CD137 антитела в отношении CD137 в отношении CD137 оценивают методом BIACORE (зарегистрированная торговая марка) T200. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения в этом методе используют 20 мМ ACES (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 2 мМ $MgCl_2$ и 0,05% Tween 20 в качестве подвижного буфера и его осуществляют при 37°C. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения такое измерение осуществляют после захвата антитела в качестве лиганда на лиганд-захватывающей молекуле. Конкретно, необходимое количество (например, примерно 100 RU, 200 RU, 300 RU, 400 RU или 500 RU) антитела захватывается, взаимодействуя с раствором антитела, приготовленным с использованием подвижного буфера с чипом, приготовленным заранее путем иммобилизации Sure Protein A (фирма GE Healthcare) на сенсорном чипе Series S Sensor Chip CM3 (фирма GE Healthcare).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения примерно от 100 до 500 RU, предпочтительно примерно от 250 до 400 RU антитела захватывается. Затем связывающую активность в отношении CD137 в присутствии или в отсутствие низкомолекулярного соединения оценивают путем взаимодействия раствора CD137, приготовленного с использованием подвижного буфера, добавленного с низкомолекулярным соединением к целевой концентрации (например, 1 мкМ, 10 мкМ, 50 мкМ или 100 мкМ), или раствор CD137 приготовляют, используя подвижный буфер, который не содержит низкомолекулярного соединения. Хотя концентрация CD137 в растворе CD137 может быть определена соответствующим образом, например, когда hCD137-HisBAP (см. пример 1-1) применяют в качестве антигена, измерение осуществляют, используя концентрации антигена 0 нМ, 15,625 нМ, 62,5 нМ, 250 нМ и 1000 нМ, соответственно. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения константа диссоциации (KD) анти-CD137 антитела с CD137 человека рассчитывают, используя программное обеспечение Biacore T200 Evaluation Software 2.0. Конкретно константу скорости связывания ka (л/М/сек) и константу скорости диссоциации kd (1/сек) рассчитывают путем глобальной подгонки сенсограммы, полученной измерением с использованием модели связывания Лэнгмюра 1:1. Константу диссоциации KD (М/л) рассчитывают исходя из этих величин.

Дополнительные типичные методы анализа по измерению активности связывания анти-CD137 антитела с CD137 будут подробно описаны ниже. Связывание анти-CD137 антител с CD137 человека оценивают с помощью Biacore T200. Связывание с CD137 человека измеряют, используя 20 мМ ACES (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 2 мМ $MgCl_2$, 0,05% Tween 20 в качестве подвижного буфера, измерение проводят при 37°C. Во-первых, антитело примерно от 250 до 400 RU захватывают путем взаимодействия раствора антитела, приготовленного с использованием подвижного буфера, с чипом, на котором Sure Protein A (фирма GE Healthcare) иммобилизован на сенсорном чипе Series S CM3 (фирма GE Healthcare). Затем раствор CD137 человека, приготовленный с применением подвижного буфера с добавлением АТФ в целевой концентрации (например, 1 мкМ, 10 мкМ, 50 мкМ или 100 мкМ), или раствор CD137 человека, приготовленный с применением подвижного буфера, который не содержит АТФ, вступает во взаимодействие для оценки связывающей активности в отношении CD137 в присутствии или в отсутствие АТФ. hCD137-HisBAP получают методом, описанным в примере (1-1), и применяют в качестве CD137 человека, являющегося антигеном, измерение проводят при концентрации антигена 0 нМ, 15,625 нМ, 62,5 нМ, 250 нМ и 1000 нМ, соответственно. Чип регенерируют, используя 25 мМ NaOH и 10 мМ глицин-HCl (pH 1,5), измерение проводят путем повторяющегося захвата антител. Константа диссоциации каждого антитела в отношении CD137 человека рассчитывают, используя программное обеспечение Biacore T200 Evaluation Software 2.0. Конкретно константу скорости связывания ka (л/М/сек) и константу скорости диссоциации kd (1/сек) рассчитывают путем глобальной подгонки сенсограммы, полученной измерением с использованием модели связывания Лэнгмюра 1:1. Константу диссоциации KD (М/л) рассчитывают, исходя из этих величин.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающая активность анти-CD137 антитела в отношении CD137 (предпочтительно CD137 человека) также может быть названа по-другому, а именно «количество связываемого CD137 на единицу антитела». В частности, используя сенсограммы, полученные с помощью вышеуказанного метода анализа с использованием BIACORE (зарегистрированная торговая марка) T200, количество связывания CD137 с антителом (RU) делится на количество захваченного антитела для расчета «количества связывания CD137 на единицу количества антитела ». В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающая активность анти-CD137 антитела в отношении CD137 (предпочтительно CD137 человека) также может быть измерена методом, описанным в примерах 5-3 или 6-2.

Понятия «малая молекула» и «низкомолекулярное соединение» относятся к химическому веществу природного происхождения, отличному от «биополимеров», присутствующих в живом организме, или к химическому веществу неприродного происхождения. Предпочтительно, это целевое тканеспецифичное соединение или не встречающееся в природе соединение, но ими перечень не ограничивают. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения «низкомолекулярное соединение» по настоящему изобретению является «соединением, специфичное в отношении раковой ткани» или «метаболитом, специфическим в отношении раковой ткани». В настоящем изобретении понятие «соединение, специфичное в отношении раковой ткани» относится к соединению, которое существует в опухолевой ткани, но не в неопухолевой ткани. В настоящем изобретении понятие «рак» применяют для описания злокачественных новообразований, которые могут быть с метастазами или без них. Термин «метаболизм» относится к химическим изменениям, которые происходят в ткани организма, включая «ассимиляцию» и «катаболизм». Ассимиляция относится к биосинтезу или накоплению молекул, а катаболизм относится к разложению молекул. «Метаболит» – это промежуточное соединение или продукт, образующийся в результате метаболизма вещества.

В настоящем изобретении понятие «целевая ткань» означает любую ткань в живом организме, к которой антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению должна быть доставлена. Целевая ткань может быть гистологически разной, такой как ткань различных органов или патологически отличающаяся ткань, например, нормальные ткани и больные ткани. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения целевой тканью является опухолевая ткань. Напротив, «нецелевой тканью (тканями)» являются ткани в живом организме, отличные от целевой ткани.

Понятие «опухолевая ткань» означает ткань, которая включает по меньшей мере одну опухолевую клетку. Обычно опухолевая ткань производит популяцию опухолевых клеток, составляющих основное тело опухоли (паренхиму) и соединительные ткани и кровеносные сосуды, существующие между опухолевыми клетками и поддерживающей опухоль тканью (стромой). В некоторых случаях они четко различимы, но есть случаи, когда они перемешаны. В некоторых случаях, есть такие клетки, как иммунные клетки, которые инфильтруются в ткань опухоли. Напротив, понятие «неопухолевая ткань» означает ткань живого организма, отличающуюся от опухолевой ткани (тканей). Здоровые ткани/нормальные ткани представляют такие неопухолевые ткани.

Примером, который не ограничивает рамок охвата настоящего изобретения, является специфическое в отношении раковой ткани соединение или раковый тканеспецифичный метаболит, применяемый в настоящем изобретении, по меньшей мере одно соединение, выбранное из соединений, подробно описанных ниже, которое можно соответствующим образом проиллюстрировать. Понятие «по меньшей мере одно соединение» включает, помимо случая, когда связывающая активность против антигена теми же антигенсвязывающими доменами, описанными ниже, зависит от одного типа ракового тканеспецифичного соединения или ракового тканеспецифичного метаболита, случай, когда связывающая активность зависит от нескольких типов, специфических в отношении раковой ткани соединений или раковых тканеспецифичных метаболитов.

В настоящем изобретении термин «тканеспецифическое соединение-мишень» относится к соединению, которое специфически присутствует в ткани-мишени по сравнению с тканью, не являющейся мишенью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения тканеспецифическое соединение-мишень может быть соединением, определяемым качественной тканевой специфичностью-мишенью, такой как присутствие в ткани-мишени, но не в тканях, не являющихся мишенями, или присутствие в ткани, не являющейся мишенью, но не в ткани-мишени. В другом варианте осуществления настоящего изобретения тканеспецифическое соединение-мишень может быть соединением, определяемым количественно тканевой специфичностью-мишенью, такой как присутствие в ткани-мишени в концентрации, которая отличается (например, более высокая концентрация или более низкая концентрация) по сравнению с тканью, не являющейся мишенью. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения тканеспецифическое соединение-мишень присутствует в ткани-мишени в концентрации, которая больше, например, в 1,05 раз или более, в 1,1 раза или более, в 1,15 раз или более, в 1,2 раза или более, в 1,25 раз или более, в 1,3 раз или более, в 1,35 раз или более, в 1,4 раз или более, в 1,45 раз или более, в 1,5 раз или более, в 1,55 раз или более, в 1,6 раз или более, в 1,65 раз или более, в 1,7 раз или более, в 1,75 раз или более, в 1,8 раз или более, в 1,85 раз или более, в 1,9 раз или более, в 1,95 раз или более, в 2 раза или более, в 2,1 раза или более, в 2,2 раз или более, в 2,3 раза или более, в 2,4 раза или более, в 2,5 раз или более, в 3 раза или более, в 5 раз или более, в 10 раз или более, в 50 раз или более, в 100 раз или более, в 10^3 раз или более, в 10^4 раз или более, в 10^5 раз или более, в 10^6 раз или более по сравнению с тканью, не являющейся мишенью. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения специфическое в отношении целевой ткани соединение по сравнению с нецелевой тканью, присутствует в ткани-мишени в концентрации, которая статистически значительно выше или ниже (т.е., по анализу с использованием из t-критерия Уэлча или критерия суммы рангов Вилкоксона, значение p меньше 0,05 и/или значение q меньше 0,10). В определенном варианте осуществления настоящего изобретения тканеспецифическое соединение-мишень представляет собой тканеспецифическое соединение опухоли.

В определенном варианте осуществления настоящего изобретения тканеспецифическое соединение-мишень представляет собой метаболит, специфически вырабатываемый опухолевой клеткой. Метаболит может быть продуктом, который образуется в процессе метаболизма, необходимого для жизнедеятельности (первичный метаболит), или продуктом, образующимся в результате метаболизма, необязательного для жизнедеятельности (вторичный метаболит). Примеры первичных метаболитов могут включать сахара, белки, липиды, нуклеиновые кислоты и т.п. Примеры вторичных метаболитов включают антибиотики и красители. Метаболит может быть биополимером или небольшой молекулой. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения биополимер представляет собой молекулу с молекулярной массой около 5000 или более, которая состоит из одного или более типов повторяющихся единиц, включая, например, полисахариды, полипептиды и полинуклеотиды. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения небольшими молекулами являются молекулы, имеющие молекулярную массу около 500 или менее, и представляют собой химические вещества, присутствующие в живом организме. В другом варианте осуществления настоящего изобретения тканеспецифическое соединение опухоли представляет собой низкомолекулярный метаболит, специфически продуцируемый в опухолевых клетках (Eva Gottfried, Katrin Peter, Marina P. Kreutz, *From Molecular and Modular Tumor Therapy*, 3(2), 2010, 111-132). В другом варианте осуществления настоящего изобретения тканеспецифическое соединение опухоли представляет собой представляет собой метаболит, который специфически вырабатывается клеткой, инфильтрующейся в опухолевую ткань (например, иммунной клеткой), или стромальной клеткой (например, фибробластом, связанным с раком (CAF, cancer associated fibroblast)), присутствующей в опухолевой ткани. Примерами иммунных клеток, инфильтрирующихся в опухолевую ткань, являются дендритные клетки, супрессивные дендритные клетки, регуляторные Т-клетки, истощенные Т-клетки, происходящие от миеломы супрессорные клетки (MDSC, myeloma-derived suppressor cells) и т.п. В другом варианте осуществления настоящего изобретения метаболит, который продуцируется клетками, присутствующими в опухолевой ткани (например, опухолевыми клетками, иммунными клетками, стромальными клетками и т.д.), который высвобождается из клетки после их гибели в результате апоптоза или некроза или тому подобного процесса, также может быть отнесен к соединениям настоящего изобретения, специфичным для опухолевой ткани.

Чтобы идентифицировать тканеспецифическое соединение опухоли, анализ на транскриптомном уровне (см., например, Dhanasekaran с соавт., *Nature*, 41 2, 2001, 822-826; Lapointe с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 2004, 811-816; Perou с соавт., *Nature*, 406, 2000, 747-752), анализ на протеомном уровне (см., например, Ahram с соавт., *Mol. Carcinog.*, 33, 2002, 9-15; Hood с соавт., *Mol. Cell. Proteomics*, 4, 2005, 1741-1753) и анализ метаболизма, основанный на метаболомном профилировании (метаболомика), может быть использован надлежащим образом. То есть для идентификации метаболита в исследуемом образце используют высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), ядерный магнитный резонанс (ЯМР) (Brindle с соавт., *J. Mol. Recognit.*, 10, 1997, 182-187)), масс-спектрометрию (GC/MS и LC/MS) (Gates, Sweeley, *Clin. Chem.*, 24, 1978, 1663-1673) и метаболическое профилирование с применением метода ELISA, и тому подобные подходящие методы, которые можно применять отдельно и/или в комбинации.

В определенном варианте осуществления настоящего изобретения специфическое для опухолевой ткани соединение представляет собой по крайней мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из: нуклеозидов, имеющих структуру пуринового кольца, аминокислот и их метаболитов, липидов и их метаболитов, первичных метаболитов углеводного обмена, а также никотинамида и его метаболитов. В другом варианте осуществления настоящего изобретения специфическое для опухолевой ткани соединение представляет собой по меньшей мере одно соединение, выбранное из п.п. (1) - (6), включающих:

(1) нуклеозиды, имеющие пуриновую структуру, такие как аденозин (ADO), аденозинтрифосфат (АТФ), аденозиндифосфат (АДФ), аденозинмонофосфат (АМФ) и инозин;

(2) аминокислоты, такие как аланин, глутаминовая кислота и аспарагиновая кислота;

(3) метаболиты аминокислот, такие как кинуренин, антраниловая кислота, 3-гидроксикинуренин и кинуреновая кислота;

(4) метаболиты арахидоновой кислоты, такие как простагландин E2;

(5) первичные метаболиты гликолитического пути или цикла Кребса, такие как молочная кислота, янтарная кислота и лимонная кислота; и,

(6) метаболиты никотинамида, такие как 1-метилникотинамид.

(1) Нуклеозиды, имеющие пуриновую структуру, такие как аденозин (ADO), аденозинтрифосфат (АТФ), аденозиндифосфат (АДФ), аденозинмонофосфат (АМФ) и инозин

Известно, что при гибели опухолевых клеток происходит утечка большого количества внутриклеточного АТФ. Следовательно, концентрация АТФ в опухолевой ткани значительно выше, чем в нормальной ткани (*PLoS One*. (2008) 3, e2599). АМФ метаболизируется ферментами на поверхности клетки, такими как внеклеточная 5'-нуклеотидаза (эко-5'-нуклеотидаза) (CD73) (Resta, Thompson, *Immunol. Rev*. 161, 1998, 95-109; Sadej с соавт., *Melanoma Res*. 16, 2006, 213-222). Аденозин представляет собой пуриновый нуклеозид, который постоянно присутствует во внеклеточной среде в низких концентрациях, но сообщалось о заметном повышении внеклеточной концентрации аденозина в гипоксических тканях, обнаруженных в солидных опухолях (Blay, Hoskin, *Cancer Res*., 57, 1997, 2602-2605). CD73 экспрессируется на поверхности опухолей и иммунных клеток (Kobie с соавт., *J. Immunol*. 177, 2006, 6780-6786) и повышенную активность обнаруживают при раке груди (Canbolat с соавт., *Breast Cancer Res. Treat*. 37, 1996, 189-193), раке желудка (Durak с соавт., *Cancer Lett*. 84, 1994, 199-202), раке поджелудочной железы (Flocke, Mannherz, *Biochim. Biophys. Acta* 1076, 1991, 273-281) и глиобластоме (Bardot с соавт., *Br. J. Cancer*, 70, 1994, 212-218). Было высказано предположение, что накопление аденозина в опухолевой ткани является результатом увеличения дефосфорилирования АМФ цитоплазматической 5'-нуклеотидазой (Headrick, Willis, *Biochem. J*., 261, 1989, 541-550). Кроме того, регуляторные Т-клетки, проникающие в опухолевую ткань, также экспрессируют АТФазу и продуцируют аденозин (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 (35), 2006, 13132-13137; *Curr. Med. Chem*., 18, 2011, 5217-5223). Полагают, что продуцируемый аденозин поддерживает ткани опухоли в иммуносупрессивной среде через аденозиновые рецепторы, такие как рецептор A2A (*Curr. Med. Chem*., 18, 2011, 5217-5223). Таким образом, АТФ, АДФ, АМФ, аденозин и т.п., которые, как считается, накапливаются в высокой концентрации в опухолевой ткани за счет метаболизма пуриновых нуклеотидов, являются примерами соединений, специфичных для опухолевой ткани, используемых в настоящем изобретении. Кроме того, поскольку аденозин разрушается до инозина под действием аденозиндезаминазы, инозин накапливается в высокой концентрации.

В определенном варианте осуществления настоящего изобретения нуклеозиды, имеющие структуру пуринового кольца, включают аденозинсодержащие соединения. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения аденозинсодержащие соединения включают, например, аденозин (АДО), аденозинтрифосфат (АТР), аденозиндифосфат (АДФ), аденозинмонофосфат (АМФ), циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), дезоксиаденозин (дАДО), дезоксиаденозин трифосфат (дАТФ), дезоксиаденозин дифосфат (дАДФ), дезоксиаденозин монофосфат (дАМФ), аденозин[γ-тио]трифосфат (АТФγS) и тому подобное. В другом варианте осуществления настоящего изобретения нуклеозиды, имеющие структуру пуринового кольца, включают инозин, который является метаболитом аденозина.

Более того, в определенном варианте осуществления настоящего изобретения, нуклеозиды, имеющие структуру пуринового кольца, включают коммерчески доступные нуклеозиды, имеющие структуру пуринового кольца, такие как АДФ-бета-S (фирма Sigma Inc.) и ему подобные.

<u>(2) Аминокислоты, такие как аланин, глутаминовая кислота и аспарагиновая кислота</u>

Скорость поглощения глутамина, который действует как переносчик азота в живом организме, увеличивается в опухолевых клетках, и считается, что такое включение глутамина и связанное с этим преобразование в глутаминовую кислоту и молочную кислоту (разрушение глутамина (глутаминолиз)) являются особенностями опухолевых клеток (Mazurek, Eigenbrodt, *Anticancer Res*. 23, 2003, 1149-1154; Mazurek с соавт., *J. cell. Physiol*. 181, 1999, 136-146). У онкологических больных уровень глутамина в плазме снижается, а концентрация глутаминовой кислоты повышается (Droge с соавт., *Immunobiology*, 174, 1987, 473-479), и исследования метаболизма меченной по ^{13}C глюкозы в ткани рака легких показали корреляцию между концентрациями меченной по ^{13}C янтарной кислоты, меченного по ^{13}C аланина, меченной по ^{13}C глутаминовой кислоты и меченного по ^{13}C цитрата. По этим причинам аланин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота и другие подобные соединения, которые, как считается, накапливаются в высоких концентрациях в опухолевой ткани, например, из-за разрушения глутамина, являются примерами соединений, специфичных для опухолевой ткани, используемых в настоящем изобретении.

(3) Метаболиты аминокислот, такие как кинуренин, антраниловая кислота, 3-гидроксикинуренин и кинуреновая кислота

Индолеамин-2,3-диоксигеназа (IDO, Indoleamine 2,3-dioxygenase) является метаболизирующим триптофан ферментом, который высоко экспрессируется при многих раковых заболеваниях, таких как меланома, рак толстой кишки, рак почки и других подобных заболеваний (Uyttenhove с соавт., *Nat. Med.*, 9, 2003, 1269-1274)). IDO катализирует превращение триптофана в кинуренин. В глиомах, которые не экспрессируют IDO, кинуренин вырабатывается из триптофана триптофан-2,3-диоксигеназой (TDO, tryptophan 2,3-dioxygenase) печени (Opitz с соавт., Nature, 478 (7368), 2011, 197-203). IDO также экспрессируется на дендритных клетках, проникающих в опухолевую ткань, и дендритные клетки также производят кинуренин (*J. Immunol.* 181, 2008, 5396-5404). Кроме того, IDO также экспрессируется в миелоидных супрессорных клетках (MDSC, myeloid-derived suppressor cell) опухолевых тканей, и MDSC также продуцирует кинуренин (Yu с соавт., *J. Immunol.*, 190, 2013, 3783-3797). Кинуренин превращается в антраниловую кислоту с помощью кинурениназы и в 3-гидроксикинуренин с помощью кинуренин-3-гидроксилазы. Как антраниловая кислота, так и 3-гидроксикинуренин конвертируют в 3-гидроксиантраниловую кислоту, предшественник НАД. Кинуренин превращается в кинуреновую кислоту кинуренинаминотрансферазой. По этим причинам кинуренин и его метаболит, то есть антраниловая кислота, 3-гидроксикинуренин, кинурениновая кислота и т.п., являются примерами соединений, специфичных для опухолевой ткани, используемых в настоящем изобретении, в частности, метаболитов, специфичных для опухолевых клеток.

(4) Метаболиты арахидоновой кислоты, такие как простагландин E2

Простагландин E2 (PGE2) способствует росту раковых клеток толстой кишки и подавляет их апоптоз (Sheng с соавт., *Cancer Res.*, 58, 1998, 362-366). Что касается синтетаз PGE2, в основном было обнаружено, что COX-1 конститутивно экспрессируется почти во всех тканях, тогда как COX-2 индуцируется некоторыми воспалительными цитокинами и онкогенами в опухолях (Warner, Mitchell, *FASEB J.*, 18, 2004, 790-804). Сообщалось, что сверхэкспрессия COX-2 связана с плохим прогнозом рака груди (Denkert с соавт., Clin. Breast Cancer, 4, 2004, 428-433) и быстрым прогрессированием рака яичников (Denker с соавт., *Mod. Pathol.*, 19, 2006, 1261-1269). Кроме того, регуляторные Т-клетки, проникающие в опухолевую ткань, также производят PGE2 (*Curr. Med. Chem.*, 18, 2011, 5217-5223). По этим причинам метаболиты арахидоновой кислоты, такие как PGE2, являются примерами соединений, специфичных для опухолевой ткани, в частности метаболитов, специфичных для опухолевых клеток, или метаболитов, специфичных для иммунных клеток, инфильтрирующих опухолевую ткань. Помимо PGE2, выработка тромбоксана A2 (TXA2) повышается в опухолевых тканях, например, при раке толстой кишки (*J. Lab. Clin. Med.*, 122, 1993, 518-523).

<u>(5) Первичные метаболиты гликолитического пути или цикла Кребса, такие как молочная кислота, янтарная кислота и лимонная кислота</u>

Гликолитический фенотип, характеризующийся активацией гликолитических (путь Эмбдена-Мейергофа) ферментов, таких как пируваткиназа, гексокиназа и лактатдегидрогеназа (ЛДГ), традиционно известен как эффект Варбурга, характерный для солидных опухолей. Молочная кислота, которая является конечным продуктом гликолиза, а также янтарная и лимонная кислоты, образующиеся в ходе цикла Кребса, накапливаются в опухолевых тканях (Teresa с соавт., *Mol. Cancer*, 8, 2009, 41-59). По этим причинам молочная кислота, янтарная кислота, лимонная кислота и другие подобные соединения, которые являются первичными метаболитами, образуемыми в ходе гликолиза, являются примерами соединений, специфичных для опухолевой ткани, в частности метаболитов, специфичных для опухолевых клеток, упоминаемых в настоящем изобретении. Кроме того, известно, что из-за гибели клеток сукцинат, который присутствует в клетках в высокой концентрации, выделяется из клеток (*Nature Immunology*, 9, 2008, 1261-1269). Предполагают, что причиной является повышенная концентрация янтарной кислоты в опухолевых тканях, где часто происходит гибель клеток.

<u>(6) Метаболиты никотинамида, такие как 1-метилникотинамид</u>

Известно, что никотинамид-N-метилтрансфераза экспрессируется на высоком уровне во множестве опухолевых тканей человека. Также известно, что 1-метилникотинамид, который представляет собой стабильный метаболит никотинамида, продуцируемый этим ферментом, секретируется за пределы опухолевых клеток (Yamada с соавт., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 56, 2010, 83-86). По этой причине 1-метилникотинамид и другие подобные соединения, которые предположительно накапливаются в опухолевой ткани в высокой концентрации в результате метаболизма никотинамида, являются примерами соединений, специфичных для опухолевой ткани, упоминаемых в настоящем изобретении.

«Антигенсвязывающая молекула» в настоящем изобретении содержит «антигенсвязывающий домен». В качестве «антигенсвязывающего домена» можно использовать домен любой структуры, если он связывается с антигеном-мишенью. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению включают, например, вариабельные области тяжелых цепей и/или легких цепей антител, авимеры, содержащие модуль (домен А) примерно из 35 аминокислот, содержащихся в различных белках клеточных мембран в живом организме (WO2004/044011 и WO2005/040229), аднектины, содержащие домен 10Fn3 фибронектина, который представляет собой гликопротеин, экспрессируемый на клеточной мембране (WO2002/032925), аффитела, использующие в качестве каркаса связывающий домен IgG из 58 аминокислот белка А (WO WO1995/001937), сконструированные белки с анкириновым повтором (DARPin, Designed Ankyrin Repeat protein), с использованием анкиринового повтора (AR, ankyrin repeat), который представляет собой повторяющуюся последовательность из 33 аминокислот, в качестве основания (WO2002/020565), антикалины, содержащие липокалин, такой как липокалин, связанный с желатиназой нейтрофилов (NGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin) в качестве основания (WO2003/029462), вариабельные рецепторы лимфоцитов (VLR, variable lymphocyte receptor), которые являются белками, функционирующими в адаптивных иммунных системах бесчелюстных позвоночных, таких как *Lampetra japonica* и *Eptatretus*, и содержат модуль обогащенных лейцином повторов (LRR, leucine-rich-repeat) модуль (WO2008/016854) и другие подобные соединения. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающий домен по настоящему изобретению содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела. В другом варианте осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающий домен по настоящему изобретению содержит, например, одноцепочечный домен scFv (single chain Fv), одноцепочечные антитела, Fv, scFv2 (single chain Fv2), Fab или F(ab')2.

<u>HVR и вариабельная область</u>

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к анти-CD137 антигенсвязывающей молекуле или антителу, которые содержат по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из: (а) HVR-H1, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающей любую аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16; (в) HVR-H3, включающей любую аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 17, 18, 19 или 20. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включают: (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, содержащую любую аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16; (в) HVR-H3, содержащую любую аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 17, 18, 19 или 20.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело, содержащее аминокислотную последовательность из числа последовательностей A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 или A549/B167, представленных в табл. 17, как комбинацию вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающей молекулой является анти-CD137 антитело, включающее области HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, имеющие такие же аминокислотные последовательности, как HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, содержащиеся в A375/B167. В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой является анти-CD137 антитело, содержащее A375/B167 в виде комбинации вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающей молекулой является анти-CD137 антитело, включающее области HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, содержащие такие же аминокислотные последовательности, как HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, содержащиеся в A551/B379. В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула представляет собой анти-CD137 антитело, содержащее A551/B379 в виде комбинации вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает следующие области (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; (в) HVR-H3, включающей любую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает следующие области (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; (в) HVR-H3, включающей любую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает следующие области (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; (в) HVR-H3, включающей любую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает следующие области (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; (в) HVR-H3, включающей любую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает следующие области (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; (в) HVR-H3, включающей любую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает следующие области (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; (в) HVR-H3, включающей любую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает следующие области (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; (в) HVR-H3, включающей любую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает следующие области (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; (в) HVR-H3, включающей любую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает следующие области (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; (в) HVR-H3, включающей любую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает следующие области (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; (в) HVR-H3, включающей любую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает следующие области (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; (в)

HVR-H3, включающей любую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, включающее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из: (а) HVR-L1, включающей любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24 или 25; (б) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (в) HVR-L3, включающую любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 27, 28 или 29. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, включающее (а) HVR-L1, содержащий любую из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24 и 25; (б) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и (в) HVR-L3, содержащий любую из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 27, 28 и 29.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает (а) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; (б) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (в) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает (а) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; (б) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (в) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает (а) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; (б) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (в) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает (а) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; (б) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (в) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает (а) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; (б) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (в) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает (а) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; (б) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (в) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает (а) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; (б) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (в) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело по настоящему изобретению включает (а) домен VH, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (i) HVR-H1, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (ii) HVR-H2, включающей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16; (iii) HVR-H3, включающей любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 17, 18, 19 или 20; (б) домен VL, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (i) HVR-L1, включающей любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24 и 25; (ii) HVR-L2, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (iii) HVR-L3, включающей любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 27, 28 или 29.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, включающие (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; (в) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; (г) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; (д) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (е) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, включающие (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; (в) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; (г) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; (д) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (е) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, включающие (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; (в) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; (г) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; (д) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (е) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, включающие (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; (в) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; (г) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; (д) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (е) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, включающие (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; (в) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; (г) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; (д) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (е) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, включающие (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; (в) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; (г) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; (д) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (е) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, включающие (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; (в) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; (г) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; (д) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (е) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, включающее (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; (в) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; (г) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; (д) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 26; (е) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, включающие (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; (в) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; (г) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; (д) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (е) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, включающее (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; (в) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; (г) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; (д) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (е) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, включающее (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; (в) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; (г) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; (д) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (е) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, включающее (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; (в) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 19; (г) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; (д) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (е) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, включающее (а) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; (в) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; (г) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; (д) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (е) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В определенном варианте осуществления настоящего изобретения любая одна или несколько аминокислот вышеописанного анти-CD137 антитела заменены в следующих положениях HVR:

В HVR-H2 (SEQ ID NO: 30): положения 5, 6, 7, 10, 13, 14 и/или 17

В HVR-H3 (SEQ ID NO: 31): положение 3 и/или 6

В HVR-L1 (SEQ ID NO: 32): положения 4, 5, 9 и/или 11

В HVR -L3 (SEQ ID NO: 33): положения 6, 7 и/или 8.

В определенном варианте осуществления настоящего изобретения замены, предусмотренные настоящим изобретением, являются консервативными заменами. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения любое одно или несколько приведенных ниже замен могут быть переработаны в любой комбинации:

В HVR-H2 (SEQ ID NO: 8): K5H или S; S6G; T7S; E10Y; D13E; S14Q; V17G или L.

В HVR-H3 (SEQ ID NO: 17): A3P, K или I; F6E.

В HVR-L1 (SEQ ID NO: 21): R4S; Y5T; Y9F; E11N.

В HVR-L3 (SEQ ID NO: 27): E6P; H7A; Q8I.

Все возможные комбинации указанных выше замен входят в консенсусные последовательности SEQ ID NO: 30, 31, 32 и 33 для HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1 и HVR-L3, соответственно.

В любом из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело являются гуманизированными. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включают области HVR согласно любому из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, и дополнительно содержат акцепторную каркасную область человека, например, каркасную область иммуноглобулина человека или консенсусную каркасную область человека. В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включают области HVR как в любом из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения и дополнительно содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) или вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность каркасного участка (FR, framework). В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения каркасный участок FR1 в вариабельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, FR2 в вариабельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, FR3 в вариабельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 и FR4 в вариабельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID No: 38. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения FR1 в вариабельной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, FR2 в вариабельной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, FR3 в вариабельной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41 и FR4 в вариабельной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включают последовательность вариабельного домена тяжелой цепи (VH), которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 или 53. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность VH, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична, содержит замены (например, содержит консервативные замены), инсерции или делеции относительно контрольной последовательности, но анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело, содержащее такую последовательность, сохраняют способность связываться с CD137. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в целом от 1 до 10 аминокислот были заменены, инсертированы и/или делетированы в SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 или 53. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения замены, инсерции или делеции происходят в областях вне HVR (т.е. в каркасных участках (FR)). Необязательно, анти-CD137 антитело содержит последовательность VH в SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 или 53, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения VH содержит одну, две или три HVR, выбранные из: (а) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (б) HVR-H2, содержащей любую одну аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 и 16; и (в) HVR-H3, содержащей любую одну аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 17, 18, 19 или 20. Посттрансляционные модификации включают, но не ограничиваются ими, модификацию глутамина или глутамата на N-конце тяжелой цепи или легкой цепи в пироглутаминовую кислоту путем пироглутамилирования.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающая молекулу или антитело, причем антитело включают вариабельный домен легкой цепи (VL), который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность VL, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична, содержит замены (например, содержит консервативные замены), инсерции или делеции относительно контрольной последовательности, но анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело, содержащая такую последовательность, сохраняет способность связываться с CD137. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в целом от 1 до 10 аминокислот были заменены, инсертированы и/или делетированы в SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения замены, инсерции или делеции происходят в областях вне HVR (т.е. в каркасных участках (FR)). Необязательно, анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело содержит последовательность VL в SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения VL содержит одну, две или три HVR, выбранные из: (а) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24 и 25; (б) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (в) HVR-L3, содержащей любую одну аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 27, 28 и 29. Посттрансляционные модификации включают, но не ограничиваются ими, модификацию глутамина или глутамата на N-конце тяжелой цепи или легкой цепи в пироглутаминовую кислоту путем пироглутамилирования.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, причем антигенсвязывающая молекула или антитело содержит VH, как в любом из вариантов осуществления настоящего изобретения, представленных выше, и VL, как в любом из вариантов осуществления настоящего изобретения, представленных выше.

- В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает последовательности VH и VL в последовательностях SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 54, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

- В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает последовательности VH и VL в последовательностях SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 55, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

- В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает последовательности VH и VL в последовательностях SEQ ID NO: 45 и SEQ ID

NO: 55, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

- В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает последовательности VH и VL в последовательностях SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 54, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

- В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает последовательности VH и VL в последовательностях SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 54, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

- В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает последовательности VH и VL в последовательностях SEQ ID NO: 48 и SEQ ID NO: 56, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

- В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает последовательности VH и VL в последовательностях SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 57, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

- В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает последовательности VH и VL в последовательностях SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 58, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

- В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает последовательности VH и VL в последовательностях SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 59, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

- В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает последовательности VH и VL в последовательностях SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 60, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

- В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает последовательности VH и VL в последовательностях SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 60, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

- В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает последовательности VH и VL в последовательностях SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 59, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

- В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело включает последовательности VH и VL в последовательностях SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

Вышеупомянутые посттрансляционные модификации включают, но не ограничиваются ими, модификацию глутамина или глутамата на N-конце тяжелой цепи или легкой цепи в пироглутаминовую кислоту путем пироглутамилирования.

SEQ ID NO, соответствующие аминокислотным последовательностям предпочтительной вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи и их HVR1, 2 и 3 для каждой анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела по настоящему изобретению, показаны в таблице ниже.

Таблица 1.

Вариабельные области тяжелой цепи/легкой цепи	SEQ ID NO вариабельной области		SEQ ID NO гипервариабельной области (HVR)					
	Тяжелой цепи	Легкой цепи	H1	H2	H3	L1	L2	L3
A375/B167	43	54	7	8	17	21	26	27
A372/B040	44	55	7	9	17	22	26	27
A356/B040	45	55	7	10	17	22	26	27
A486/B167	46	54	7	11	18	21	26	27
A487/B167	47	54	7	8	18	21	26	27
A488/B226	48	56	7	12	18	21	26	28

Вариабельные области тяжелой цепи/легкой цепи	SEQ ID NO вариабельной области		SEQ ID NO гипервариабельной области (HVR)					
	Тяжелой цепи	Легкой цепи	H1	H2	H3	L1	L2	L3
A489/B223	49	57	7	13	18	21	26	29
A548/B376	50	58	7	14	19	23	26	27
A551/B256	51	59	7	15	20	24	26	27
A551/B379	51	60	7	15	20	25	26	27
A555/B379	52	60	7	16	20	25	26	27
A548/B256	50	59	7	14	19	24	26	27
A549/B167	53	54	7	14	17	21	26	27

Если анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело по настоящему изобретению содержит глутамин в качестве N-концевой аминокислоты тяжелой цепи или легкой цепи, эта аминокислота может быть заменена глутаминовой кислотой. Если анти-CD137 антитело, представленное в настоящем изобретении, содержит глутаминовую кислоту в качестве аминокислоты на N-конце тяжелой цепи или легкой цепи, эта аминокислота может быть заменена глутамином.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела, содержащие описанные выше HVR, вариабельные области тяжелой цепи и/или вариабельные области легкой цепи, все обладают зависимой от низкомолекулярного соединения связывающей активностью по отношению к CD137 согласно описанному выше.

Константные области

В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела содержат константную область. Константная область может быть константной областью тяжелой цепи (включая область Fc), константной областью легкой цепи или обеими. В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела содержат область Fc. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения константная область является областью с нативной последовательностью. Примеры константных областей тяжелой цепи, полученных из нативных антител, включают, например, константную область тяжелой цепи IgG1 человека (SEQ ID NO: 61, 62), IgG2 человека, IgG3 человека, IgG4 человека и другие подобные. Примеры константных областей легкой цепи, полученных из нативных антител, включают, например, каппа-цепь человека, лямбда-цепь человека (например, SEQ ID NO: 63) и другие подобные.

В настоящем изобретении понятие «исходная константная область» или «исходная Fc-область» относятся к константной области или Fc-области до внедрения аминокислотных изменений, описанных в настоящем изобретении. Понятие «исходная антигенсвязывающая молекула» относится к антигенсвязывающей молекуле, которая содержит исходную константную область или исходную Fc-область. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения исходная Fc-область является Fc-областью с нативной последовательностью (или Fc-областью нативного антитела). Антитела включают, например, IgA (IgA1, IgA2), IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM и др. Антитела могут происходить от человека или от обезьяны (например, макаки-крабоеда, макаки резус, мармозетки, шимпанзе или бабуина). Нативные антитела также могут иметь природные мутации. Множество аллотипов последовательностей IgG из-за генетического полиморфизма описано в публикации «Sequences of proteins of immunological interest», NIH Publication No. 91-3242, каждый из которых может применяться в настоящем изобретении. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения исходная Fc-область является Fc-областью, происходящей от константной области IgG1 человека, представленной последовательностями SEQ ID NO: 61, 62 или 182.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела обладают повышенной изоэлектрической точкой (pI, isoelectric point) по сравнению с анти-CD137 антигенсвязывающими молекулами или антителами, которые содержат нативную последовательность Fc-области или исходной области Fc. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения варианты Fc-области включают по меньшей мере одно аминокислотное изменение. В других вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислотное изменение приводит к повышению изоэлектрической точки (pI) варианта Fc-области по сравнению с исходной Fc-областью. Не опираясь на какую-либо теорию, предполагают, что pH биологических жидкостей (например, плазмы) находится в нейтральном диапазоне pH. В биологических жидкостях общий положительный заряд антигенсвязывающей молекулы или антитела с повышенной величиной pI увеличивается из-за увеличения pI, и в результате антигенсвязывающая молекула или антитело сильнее притягивается физико-химическим кулоновским взаимодействием к поверхности эндотелиальной клетки, которая имеет общий отрицательный заряд по сравнению с антигенсвязывающей молекулой или антителом, не имеющим повышенной величины pI. Таким образом, агонистические антигенсвязывающие молекулы (или антитела) или антигенсвязывающие агонистические антигенсвязывающие молекулы (или антитела) могут приближаться к поверхности клеток, которые экспрессируют рецептор Fc-гамма, что приводит к усилению связывания антигенсвязывающих молекул или антител с клетками, экспрессирующим Fc-гамма-рецептор. Для тех анти-CD137 агонистических антигенсвязывающих молекул или антител, которые проявляют агонистическую активность против CD137, основанную на вкладе за счет связывающей активности связывания с Fc-гамма-рецептором, анти-CD137-агонистические антигенсвязывающие молекулы или антитела, имеющие повышенное связывание с экспрессирующими Fc-гамма рецептор клетками из-за повышающих pI аминокислотных изменений могут проявлять более сильную агонистическую активность против CD137 по сравнению с анти-CD137 агонистическими антигенсвязывающими молекулами или антителами, не имеющими изменений аминокислот, которые повышают изоэлектрическую точку (pI).

В настоящем изобретении pI может быть теоретическим или экспериментально определенной величиной. Значение pI можно определить, например, с помощью изоэлектрического фокусирования, известного специалистам в данной области. Значение теоретической pI можно рассчитать, например, с помощью программного обеспечения для анализа генной и аминокислотной последовательности (Genetyx и т.д.). При расчете свойства антитела могут быть отражены в формуле расчета. Например, (i) обычно Cys, консервативный в антителе, образует дисульфидную связь и не несет электрического заряда в боковой цепи, поэтому такой Cys может быть исключен из расчета, и только Cys в свободной форме, который не образует дисульфидную связь, может быть включен в расчет. В другом варианте (ii) состояние заряда или изоэлектрическая точка антител может изменяться из-за посттрансляционных модификаций; поэтому формула расчета может быть изменена следующим образом с учетом таких посттрансляционных модификаций: (a) если N-концом тяжелой цепи является Q (глутамин), N-концевая аминогруппа исключается из расчета, предполагая, что происходит пироглутамилирование, (б) если С-концом тяжелой цепи является K (лизин), K (только один остаток) исключается из расчета, предполагая, что происходит усечение; и (в) боковые цепи всех С (цистеинов), присутствующих в обычно консервативных положениях, исключаются из расчета, предполагая, что все эти С образуют дисульфидные связи внутри молекулы. В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения оба вышеописанных положения (i) и (ii) могут быть отражены в формуле расчета.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения величина pI может быть увеличена, например, по меньшей мере на 0,01, 0,03, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, или более, по меньшей мере на 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, или более, по меньшей мере на 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, или более, или по меньшей мере на 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 3,0 или более, по сравнению с величиной pI до модификации.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения аминокислотные изменения, относящиеся к увеличению и способы увеличения pI антигенсвязывающей молекулы или антитела, подробно описаны в настоящем изобретении в разделе «III. Композиции и способы (агонистические антигенсвязывающие молекулы, содержащие вариант Fc-области с повышенной изоэлектрической точкой (pI))». Специалисты в данной области поймут, что любые аминокислотные изменения и способы увеличения pI, описанные в разделе «III. Композиции и способы (агонистические антигенсвязывающие молекулы, содержащие вариант Fc-области с повышенной изоэлектрической точкой (pI))» могут применяться к анти-CD137 антигенсвязывающим молекулам или антителам.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела имеют вариант Fc-области с увеличенной величиной pI, и вариант Fc-области содержит по меньшей мере одно аминокислотное изменение по меньшей мере в одном положении, выбранном из группы, состоящей из положений 285, 311, 312, 315, 318, 333, 335, 337, 341, 342, 343, 384, 385, 388, 390, 399, 400, 401, 402, 413, 420, 422 и 431 по нумерации EC. В других вариантах осуществления настоящего изобретения варианты Fc-области с повышенной величиной pI включают Arg или Lys в каждом выбранном положении.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела имеют вариант Fc-области с повышенной величиной pI, а вариант Fc-области содержит по меньшей мере одно аминокислотное изменение по меньшей мере в одном положении, выбранном из группы, состоящей из положений 311, 343 и 413 по нумерации EC. В других вариантах осуществления настоящего изобретения варианты Fc-области с повышенной величиной pI включают аминокислотное изменение в положении 311, 343 или 413 по нумерации EC. В другом варианте осуществления настоящего изобретения варианты Fc-области с повышенной величиной pI включают Arg или Lys в каждом выбранном положении.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела, содержащие вариант Fc-области с повышенной величиной pI, который содержит аминокислотные изменения любого из следующих (1) - (3): (1) в положениях 311 и 343; (2) в положениях 311 и 413; и (3) в положениях 343 и 413 в соответствии с нумерацией EC. В других вариантах осуществления настоящего изобретения варианты Fc-области с повышенной величиной pI содержат Arg или Lys в каждом выбранном положении.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела по настоящему изобретению включают вариант Fc-области, которая содержит аминокислотное изменение (изменения), представленные в табл. 2 ниже.

Таблица 2. Аминокислотные изменения для повышения pI Fc-области

Номер	Аминокислотные замены (нумерация EC)
1	P343R/D413K
2	Q311R/P343R
3	P343R
4	D413K
5	Q311R
6	Q311R/D413K

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела, содержащие вариант Fc-области, полученный путем внесения аминокислотных изменений в Fc-область, имеющую нативную последовательность. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения вариантные Fc-области обладают повышенной связывающей активностью по меньшей мере с одним рецептором Fc-гамма, выбранным из группы, состоящей из Fc-гамма RIa, Fc-гамма RIIa, Fc-гамма RIIb, Fc-гамма RIIIa и Fc-гамма RIIIb, по сравнению с Fc-областью, имеющей нативную последовательность или исходную Fc-областью. Предпочтительно, вариантные Fc-области обладают повышенной связывающей активностью в отношении Fc-гамма RIIb по сравнению с Fc-областью, имеющей нативную последовательность или исходную Fc-область. Сообщают, что анти-CD137 антитело, содержащее вариант Fc-области с повышенной связывающей активностью в отношении Fc-гамма RIIb, обладает повышенной агонистической активностью по сравнению с анти-CD137 антителом, содержащим Fc-область с нативной последовательностью. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения в качестве аминокислотных изменений для увеличения связывающей активности по отношению к Fc-гамма RIIb, например, можно использовать аминокислотные изменения, описанные в WO2012/115241, WO2014/030728, WO2014/163101и/или WO2017/104783. В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения изменения для увеличения связывающей активности по отношению к Fc-gamma RIIb представляют собой аминокислотные изменения по меньшей мере в одном положении, выбранном из группы, состоящей из положений 234, 235, 236, 237, 238, 264, 268, 295, 326 и 330 по нумерации EC.

«Рецепторы Fc-гамма» (называемые в настоящем изобретении рецепторами Fc-гамма, Fc гамма R или FcgR) относятся к рецепторам, которые могут связываться с Fc-областью моноклональных антител IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и практически означает любого представителя группы семейства белков, кодируемых генами рецепторов Fc-гамма. У людей это семейство включает Fc-гамма RI (CD64), включая изоформы Fc-гамма RIa, Fc-гамма RIb и Fc-гамма RIc; Fc-гамма RII (CD32), включая изоформы Fc-гамма RIIa (включая аллотипы H131 (тип H) и R131 (тип R)), Fc-гамма RIIb (включая Fc-гамма RIIb-1 и Fc-гамма RIIb-2) и Fc-гамма RIIc; и Fc-гамма RIII (CD16), включая изоформы Fc-гамма RIIIa (включая аллотипы V158 и F158), и Fc-гамма RIIIb (включая аллотипы Fc-гамма RIIIb-NA1 и Fc-гамма RIIIb-NA2) и любые Fc-гамма Rs человека, Fc-гамма изоформы или аллотипы, которые еще предстоит открыть. Установлено, что Fc-гамма RIIb1 и Fc-гамма RIIb2 являются вариантами сплайсинга Fc-гамма RIIb человека. Кроме того, сообщалось о варианте сплайсинга под названием Fc-гамма RIIb3 (*J Exp Med*, 170, 1989, 1369-1385). Помимо этих вариантов сплайсинга, Fc-гамма RIIb человека включает AAI46679.1, зарегистрированный в NCBI, и все варианты сплайсинга, зарегистрированные в NCBI, а именно NP_001002273.1, NP_001002274.1, NP_001002275.1, NP_001177757.1 и NP_003992.3. Кроме того, Fc-гамма RIIb человека включает все ранее описанные генетические полиморфизмы, а также Fc-гамма RIIb (*Arthritis Rheum*. 48, 2003, 3242-3252; Kono с соавт., *Hum. Mol. Genet*. 14, 2005, 2881-2892; Kyogoju с соавт., *Arthritis Rheum*. 46, 2002, 1242-1254) и каждый генетический полиморфизм, о котором будет известно в будущем.

У Fc-гамма RIIa существует два аллотипа, в одном из которых аминокислота в положении 131 Fc-гамма RIIa представляет собой гистидин (тип H), а в другом аминокислота в положении 131 замещена аргинином (тип R) (Warrmerdam, *J. Exp. Med*. 172, 1990, 19-25).

Fc-гамма R включает Fc-гамма R человека, мыши, крысы, кролика и обезьяны, но ими не ограничивается и может происходить из любого организма. Fc-гамма R мыши включают Fc-гамма RI (CD64), Fc-гамма RII (CD32), Fc-гамма RIII (CD16) и Fc-гамма RIII-2 (CD16-2), а также любые Fc-гамма R мыши или изоформы Fc-гамма R, но ими перечень не ограничивают.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела, содержащие вариант Fc-области с повышенной связывающей активностью в отношении Fc-гамма RIIb, которая включает аминокислотные изменения любого из следующих пунктов (1) - (8): (1) в положениях 234, 238, 264 и 330; (2) в положениях 234, 238 и 330; (3) в положениях 234, 237, 238 и 330; (4) в положениях 236, 268 и 330; (5) в положениях 235, 236, 268, 295, 326 и 330; согласно нумерации EC.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела по настоящему изобретению содержат вариант области Fc, содержащей изменения аминокислот, представленные ниже в табл. 3. В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела по настоящему изобретению содержат вариант области Fc, который дополнительно включает, помимо аминокислотного изменения (изменений), описанных в табл. 2

(аминокислотные изменения, включающие увеличение pI области Fc), любую комбинацию аминокислотных изменений, указанных в табл. 3 ниже.

Таблица 3. Аминокислотные изменения для увеличения связывающей активности Fc-gamma RIIb в Fc-области

Номер	Аминокислотные замены (нумерация EC)
1	L234Y/P238D/V264I/A330K
2	L234Y/P238D/A330K
3	L234Y/G237D/P238D/A330K
4	G236N/H268D/A330K
5	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают варианты Fc-области, которые имеют изменение по меньшей мере одной аминокислоты и обладают связывающей активностью по отношению к Fc-гамма RIIb, эквивалентной или более высокой, чем у контрольной Fc-области. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения контрольная Fc-область представляет собой Fc-область, содержащую любую комбинацию аминокислотных изменений, указанных выше в табл. 3. В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения контрольная Fc-область представляет собой Fc-область, содержащуюся в константной области тяжелой цепи TT14 (SEQ ID NO: 149), TT16 (SEQ ID NO: 150), MY201 (SEQ ID NO: 153) или MY518 (SEQ ID NO: 154). В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения контрольная Fc-область представляет собой Fc-область, содержащуюся в константной области тяжелой цепи MY201 (SEQ ID NO: 153) или MY518 (SEQ ID NO: 154).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения в настоящем изобретении предусматривают выделенные агонистические антигенсвязывающие молекулы или антитела, которые содержат вариант Fc-области с повышенной связывающей активностью в отношении рецептора Fc-гамма (предпочтительно, Fc-гамма RIIb) и увеличенной pI. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения варианты Fc-областей содержат по меньшей мере два аминокислотных изменения по сравнению с исходными Fc-областями. Выше описано, что антигенсвязывающая молекула или антитело с повышенной pI более сильно притягивается физико-химическим кулоновским взаимодействием к поверхности эндотелиальной клетки, которая имеет общий отрицательный заряд, по сравнению с антигенсвязывающей молекулой или антителом, не имеющим повышенной pI. Следовательно, для тех агонистических антигенсвязывающих молекул или антител, которые проявляют агонистическую активность, основанную на вкладе связывающей активности в отношении рецептора Fc-гамма (предпочтительно Fc-гамма RIIb), агонистическая активность антигенсвязывающих молекул или антител может быть увеличена путем комбинирования аминокислотного изменения (изменений) для увеличения рецептора Fc-гамма (предпочтительно Fc-гамма RIIb) и аминокислотное изменение (изменений) для увеличения pI.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела содержат вариант Fc-области, который включает как аминокислотные изменения для увеличения связывающей активности в отношении Fc-гамма-рецептора (например, Fc-gamma RIIb), так и аминокислотные изменения для увеличения изоэлектрической точки (pI), как описано выше. Выше описано, что антигенсвязывающая молекула или антитело с повышенной pI более сильно притягивается физико-химическим кулоновским взаимодействием к поверхности эндотелиальной клетки, которая имеет общий отрицательный заряд, по сравнению с антигенсвязывающей молекулой или антителом, не имеющим повышенной изоэлектрической точки (pI). Следовательно, для тех анти-CD137 агонистических антигенсвязывающих молекул или антител, которые проявляют агонистическую активность против CD137 на основе вклада за счет связывающей активности с рецептором Fc-гамма (предпочтительно Fc-гамма RIIb), агонистическая активность анти-CD137 антигенсвязывающих молекул против или антитела могут быть увеличены путем комбинирования аминокислотных изменений для увеличения рецептора Fc-гамма (предпочтительно Fc-гамма RIIb) и аминокислотных изменений для увеличения pI.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения в настоящем изобретении предусматривают полипептиды, включающие вариант Fc-области с повышенной связывающей активностью в отношении Fc-гамма RIIb и с повышенной величиной pI, который включает по меньшей мере три аминокислотных изменения, включая (a) по меньшей мере одно аминокислотное изменение по меньшей мере в одном положении, выбранном из группы, состоящей из положений 234 , 235, 236, 237, 238, 264, 268, 295, 326 и 330 в соответствии с нумерацией EC, и (б) по меньшей мере два аминокислотных изменения по меньшей мере в двух положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 311, 343 и 413, согласно нумерации EC.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают полипептиды, содержащие вариант Fc-области с повышенной связывающей активностью по отношению к Fc-gamma RIIb и повышенной величиной pI, которые включают аминокислотные изменения по любому из следующих п.п. (1) - (26):

(1) положения 235, 236, 268, 295, 326, 330, 343 и 413;

(2) положения 214, 235, 236, 268, 295, 326, 330, 343 и 413;

(3) положения 234, 238, 250, 264, 307, 330, 343 и 413;

(4) положения 234, 238, 264, 330, 343 и 413;

(5) положения 234, 237, 238, 250, 307, 330, 343 и 413;

(6) положения 234, 237, 238, 330, 343 и 413;

(7) положения 235, 236, 268, 295, 326, 330, 311 и 343;

(8) положения 234, 238, 250, 264, 307, 330, 311 и 343;

(9) положения 234, 238, 264, 330, 311 и 343;

(10) положения 234, 237, 238, 250, 307, 330, 311 и 343;

(11) положения 234, 237, 238, 330, 311 и 343;

(12) положения 235, 236, 268, 295, 326, 330 и 343;

(13) положения 214, 235, 236, 268, 295, 326, 330 и 343;

(14) положения 235, 236, 268, 295, 326, 330 и 413;

(15) положения 214, 236, 268, 330 и 343;

(16) положения 214, 235, 236, 268, 330 и 343;

(17) положения 214, 236, 268, 330 и 413;

(18) положения 214, 236, 268, 330, 343 и 413;

(19) положения 214, 235, 236, 268, 330, 343 и 413;

(20) положения 214, 236, 268, 330 и 311;

(21) положения 214, 235, 236, 268, 330 и 311;

(22) положения 214, 236, 268, 330, 311 и 343;

(23) положения 214, 235, 236, 268, 330, 311 и 343;

(24) положения 214, 236, 268, 330, 311 и 413;

(25) положения 214, 235, 236, 268, 330, 311 и 413;

(26) положения 214, 235, 236, 268, 295, 326, 330 и 311,

в соответствии с нумерацией ЕС.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения вариантные Fc-области по настоящему изобретению включают любую комбинацию аминокислотных изменений, представленных ниже в табл. 4.

Таблица 4.

Номер	Аминокислотные замены (нумерация ЕС)
1	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K
2	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K
3	L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/P343R/D413K
4	L234Y/P238D/V264I/A330K/P343R/D413K
5	L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/P343R/D413K
6	L234Y/G237D/P238D/A330K/P343R/D413K
7	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R/P343R
8	L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/Q311R/P343R
9	L234Y/P238D/V264I/A330K/Q311R/P343R
10	L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/Q311R/P343R
11	L234Y/G237D/P238D/A330K/Q311R/P343R
12	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R
13	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R
14	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/D413K
15	K214R/G236N/H268D/A330K/P343R
16	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R
17	K214R/G236N/H268D/A330K/D413K
18	K214R/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K
19	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K
20	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R
21	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R
22	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R
23	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R
24	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K
25	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K
26	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения варианты Fc-области, содержащие любую комбинацию аминокислотных изменений, описанных выше в табл. 4, не содержат аминокислоту в положении 447 согласно нумерации ЕС.

Специалистам в данной области известно, что по крайней мере одно изменение аминокислоты для увеличения связывающей активности в отношении Fc-гамма R (включая Fc-гамма RIIb) по сравнению с исходной областью Fc, как описано или предложено, например, в WO2013/047752, WO2013/125667, WO2014/030728, WO2014/163101 или WO2017104783, и по меньшей мере одно аминокислотное изменение для увеличения pI по сравнению с исходной областью Fc, как описано или предложено, например, в WO2017/104783, WO2017/046994 и любой комбинации этих аминокислотных изменений могут быть использованы в дополнение к изменениям, представленным в качестве иллюстраций выше.

Кроме того, аминокислотные изменения, выполненные для других целей, могут быть объединены в варианте Fc-области, описанной в настоящем изобретении. Например, аминокислотные замены, повышающие FcRn-связывающую активность (Hinton с соавт., J. *Immunol.* 176(1), 2006, 346-356; Dall'Acqua с соавт., *J. Biol. Chem.* 281(33), 2006, 23514-23524; Petkova с соавт., *Intl. Immunol.* 18(12), 2006, 1759-1769; Zalevsky с соавт., *Nat. Biotechnol.* 28(2), 2010, 157-159; WO 2006/019447; WO 2006/053301; WO 2009/086320), и могут быть добавлены аминокислотные замены для улучшения гетерогенности или стабильности антител (WO 2009/041613). В другом варианте полипептиды со свойством стимулирования клиренса антигена, которые описаны в WO 2011/122011, WO 2012/132067, WO 2013/046704 или WO 2013/180201, полипептиды со свойством специфического связывания с тканью-мишенью, которые описаны в WO 2013/180200, полипептиды со свойством многократного связывания с множеством молекул антигена, которые описаны в WO 2009/125825, WO 2012/073992 или WO 2013/047752, можно комбинировать с вариантом области Fc, описанным в настоящем изобретении. В другом варианте с целью придания связывающей активности другим антигенам, аминокислотные изменения, описанные в EP1752471 и EP1772465, могут быть объединены в CH3 варианта Fc-области, описанного в настоящем изобретении.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела по настоящему изобретению содержат константную область тяжелой цепи, содержащую любую одну аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 64-85. Предпочтительно анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела по настоящему изобретению содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75 или 82.

В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела по настоящему изобретению содержащие описанный выше вариант области Fc, обладают описанной выше CD137-связывающей активностью, зависящей от низкомолекулярного соединения.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела по настоящему изобретению содержат следующую вариабельную область и константную область: вариабельную область, содержащую описанную выше область HVR, вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи; и описанный выше вариант Fc-области. В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела по настоящему изобретению могут быть любым анти-CD137 антителом, выбранным из антител, описанных в табл. 72.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают антигенсвязывающие молекулы или антитела, связывающиеся с тем же эпитопом на CD137, что и анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела, представленные в настоящем изобретении, в присутствии низкомолекулярного соединения (например, в присутствии 10 мкМ или более, 50 мкМ или более, 100 мкМ или более, 150 мкМ или более, 200 мкМ или более, или 250 мкМ или более низкомолекулярного соединения). Например, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают те антигенсвязывающие молекулы или антитела, которые связываются с одним и тем же эпитопом с антигенсвязывающими молекулами или антителами против CD137, содержащими A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 и/или A549/B167, описанными в табл. 37, в виде комбинации вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела по настоящему изобретению, обладающие CD137-связывающей активностью, которая зависит от антигенсвязывающей активности, зависящей от низкомолекулярного соединения, распознают эпитоп, образованный комплексом, сформированным из антигена (например, CD137) и низкомолекулярного соединения (например, АТФ).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают антигенсвязывающие молекулы или антитела, которые конкурируют за связывание с CD137 с анти-CD137 антигенсвязывающими молекулами или антителами по настоящему изобретению в присутствии низкомолекулярного соединения (например, в присутствии 10 микромолей или более, 50 микромолей или более, 100 микромолей или более, 150 микромолей или более, 200 микромолей или более или 250 микромолей или более низкомолекулярного соединения). Например, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения они конкурируют за сайт связывания с CD137 с анти-CD137 антигенсвязывающими молекулами или антителами, содержащими A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 и/или A549/B167, описанные в табл. 37, в виде комбинации вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело по любому из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения является моноклональным антителом, в том числе химерным, гуманизированным или антителом человека. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антитело является фрагментом антитела, например, Fv, Fab, Fab', scFv, диателом или фрагментом $F(ab')_2$. В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело является антителом полной длины, например, интактным антителом IgG1 или антителом другого класса или изотипа согласно настоящему описанию.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело по любому из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения может включать любую из функций, по отдельности или в комбинации, как описано в разделах 1-7 ниже:

<u>1. Агонистическая активность анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела</u>

В определенном варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело по настоящему изобретению обладает агонистической активностью CD137. Передача сигнала CD137 не только стимулирует секрецию IFN-γ и пролиферацию клеток NK (Buechele с соавт., 2012; Lin с соавт., 2008; Melero с соавт., 1998), но также повышает их выживаемость и активацию дендритных клеток (DC), на что указывает активация костимулирующих молекул и секреции цитокинов (Choi с соавт., 2009; Futagawa с соавт., 2002; Wilcox с соавт., 2002). Однако CD137 лучше всего охарактеризовать как костимулирующую молекулу, которая регулирует TCR-индуцированную активацию как в $CD4^+$, так и в $CD8^+$ подмножествах Т-клеток. В комбинации с активацией TCR анти-CD137 агонистические антитела усиливают пролиферацию Т-клеток, стимулируют секрецию лимфокинов и снижают чувствительность Т-лимфоцитов к гибели клеток, вызванной активацией (рассмотрено в публикации Snelc соавт., 2011). Из этих явлений физиологические явления, наблюдаемые после передачи сигнала CD137 на Т-клетки, опосредуются расположенными ниже по цепи сигналами, активируемыми передачей сигналов CD137, такими как TRAF2, TRAF1, в частности NF-kappaB, JNK, Erk, Akt, сурвивин, Bcl-XL и/или Bcl-2 (Ward-Kavanagh с соавт., *Immunity*, 44, 2016, 1005).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения понятия «анти-CD137 агонистическая антигенсвязывающая молекула» или «анти-CD137 агонистическое антитело» означают антигенсвязывающую молекулу или антитело, которое, связываясь с CD137, трансдуцирует сигнал CD137 и значительно индуцирует или усиливает секрецию IFN-гамма, пролиферацию и повышение выживаемости клеток NK; активация DC указывает на повышенную регуляцию секреции цитокинов и костимулирующих молекул; индукцию TCR; пролиферацию Т-клеток; и/или секрецию лимфокинов. В другом варианте осуществления настоящего изобретения понятия «анти-CD137 агонистическая антигенсвязывающая молекула» или «анти-CD137 агонистическое антитело» означают антигенсвязывающую молекулу или антитело, которое трансдуцирует сигнал CD137 путем связывания с CD137 на Т-клетках и существенно индуцирует активацию NF-kappaB Т-клеток. Кроме того, если антигенсвязывающая молекула или антитело «проявляет агонистическую активность против CD137», это означает, что наблюдается любое из вышеупомянутых физиологических явлений, когда антигенсвязывающая молекула или антитело связывается с CD137. Метод измерения агонистической активности CD137 подробно описан ниже в разделе «B. Анализы».

В определенном варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело по настоящему изобретению обладает зависимой от низкомолекулярных соединений агонистической активностью по отношению к CD137. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, не ограничивающем рамок охвата настоящего изобретения, агонистическая активность CD137 анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела против CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения выше, чем агонистическая активность CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения. В другом варианте осуществления настоящего изобретения агонистическая активность в отношении CD137 анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела в присутствии высокой концентрации низкомолекулярного соединения выше по сравнению с агонистической активностью CD137 в присутствии низкой концентрации низкомолекулярного соединения. В другом варианте осуществления настоящего изобретения агонистическая активность в отношении CD137 анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела в присутствии низкомолекулярного соединения больше в 2 раза или более, в 3 раза или более, в 5 раз или более, в 10 раз или более, в 20 раз или более, в 30 раз или более, в 50 раз или более, в 100 раз или более, в 200 раз или более, в 300 раз или более, в 500 раз или более, в 1×10^3 раз или более, 2×10^3 раз или более, в 3×10^3 раз или более, в 5×10^3 раз или более, в 1×10^4 раз или более, в 2×10^4 раз или более, в 3×10^4 раз или более, в 5×10^4 раз или более, или в 1×10^5 раз или более по сравнению с агонистической активностью в отношении CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения.

Любая подходящая концентрация может быть выбрана в качестве концентрации низкомолекулярного соединения при условии, что обнаруживают различие в связывающей активности анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело трансдуцирует сигнал CD137, связываясь с CD137 на поверхности клетки. Следовательно, специалисту в данной области очевидно, что анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело, которое обладает зависимой от низкомолекулярного соединения связывающей активностью с CD137, обладает агонистической активностью по отношению к CD137, зависящей от низкомолекулярного соединения. Однако, с другой стороны, поскольку методы измерения связывающей активности и агонистической активности различны, специалист в данной области поймет, что концентрация низкомолекулярного соединения, при которой обнаруживают различия в связывающей активности, может отличаться от концентрации низкомолекулярного соединения, для которой обнаружено различие в агонистической активности (например, для анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела, чья CD137-связывающая активность в присутствии низкомолекулярного соединения в концентрации 10 мкМ выше в 2 раза или более по сравнению со связывающей активностью CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения, агонистическая активность CD137 (исследуемое значение) в присутствии 10 мкМ низкомолекулярного соединения может быть менее чем в 2 раза по сравнению с агонистической активностью CD137 (исследуемое значение) в отсутствие низкомолекулярного соединения). Кроме того, специалистам в данной области понятно, что определение агонистической активности может варьировать в зависимости от анализа агонистической активности в отношении CD137 (см. раздел «B. Анализы»).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело (i) проявляет агонистическую активность в отношении CD137 в присутствии 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ или 250 мкМ низкомолекулярного соединения, и (ii) по существу не проявляет агонистической активности в отношении CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения или имеет низкую агонистическую активность в отношении CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения (по сравнению с присутствием низкомолекулярного соединения).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения если агонистическую активность анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела оценивают с помощью «a) Анализа агонистической активности (МКПК)», подробно описанного в разделе «B. Анализы», анти-CD137 агонистическая антигенсвязывающая молекула или антитело (i) проявляет агонистическую активность в отношении CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения в концентрации 250 мкМ, и (ii) имеет низкую агонистическую активность в отношении CD137 в отсутствие низкомолекулярное соединение (по сравнению с наличием низкомолекулярного соединения). В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 агонистическая антигенсвязывающая молекула или антитело (i) проявляет агонистическую активность по отношению к CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения в концентрации 250 мкМ, и (ii) по существу не проявляет агонистической активности в отношении CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения если агонистическую активность анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела оценивают с помощью пункта «б) Анализ агонистической активности (анализ репортерного гена)», подробно рассмотренного в разделе «В. Анализы», анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело (i) проявляют агонистическую активность в отношении CD137 в присутствии 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ или 250 мкМ низкомолекулярного соединения, и (ii) по существу не имеет агонистической активности в отношении CD137 или имеет более пониженную агонистическую активность в отсутствие низкомолекулярного соединения (по сравнению с таковой в присутствии низкомолекулярного соединения). Концентрации антител в анализе репортерного гена могут быть выбраны произвольно, например, конечная концентрация антитела составляет 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 или 10 мкг/мл. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения конечная концентрация антитела составляет 0,1 мкг/мл или 1 мкг/мл.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, когда конечная концентрация антитела составляет 0,1 мкг/мл в пункте «б) Анализ агонистической активности (анализ репортерного гена)», подробно рассмотренного в разделе «В. Анализы», (i) агонистическая активность (относительная световая единица (RLU – relative light unit) анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела против CD137 в присутствии 10 мкМ низкомолекулярного соединения является 2-кратной или более, 3-кратной или более, 5 -кратной или более, 10-кратной или более, 20-кратной или более, 30-кратной или более, 50-кратной или более, 60-кратной или более, 70-кратной или более, 80-кратной или более или 90-кратной или более по сравнению с (ii) агонистической активностью в отношении CD137 (относительная световая единица) в отсутствие низкомолекулярного соединения. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения если конечная концентрация антитела составляет 0,1 мкг/мл в пункте «б) Анализ агонистической активности (анализ репортерного гена)», подробно рассмотренного в разделе «B. Анализы», (i) агонистическая активность в отношении CD137 (относительная световая единица) антигенсвязывающей молекулы или антитела в отношении CD137 в присутствии 100 мкМ низкомолекулярного соединения является 2-кратной или более, 3-кратной или более, 5 -кратной или более, 10-кратной или более, 20-кратной или более, 30-кратной или более, 50-кратной или более, 60-кратной или более, 70-кратной или более, 80-кратной или более или 90- кратной или более по сравнению с (ii) агонистической активностью CD137 (относительная световая единица) в отсутствие низкомолекулярного соединения. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, когда конечная концентрация антител составляет 0,1 мкг/мл в пункте «б) Анализ агонистической активности (анализ репортерного гена)», подробно рассмотренного в разделе «B. Анализы», (i) агонистическая активность в отношении CD137 (в относительных световых единицах (RLU)) анти-CD137 агонистической антигенсвязывающей молекулы или антитела в присутствии 250 мкМ низкомолекулярного соединения больше в 2 раза или более, в 3 раза или более, в 5 раз или более, в 10 раз или более, в 20 раз или более, в 30 раз или более, в 50 раз или более, в 60 раз или более, в 70 раз или более, в 80 раз или более, или в 90 раз или более по сравнению с (ii) агонистической активностью в отношении CD137 (в относительных световых единицах) в отсутствие низкомолекулярного соединения. В любом из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, дополнительно, 0,1 мкг/мл анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела по существу не проявляет агонистической активности в отношении CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения когда конечная концентрация антител составляет 1 мкг/мл в пункте «б) Анализ агонистической активности (анализ репортерного гена)», подробно рассмотренного в разделе «B. Анализы», (i) агонистическая активность в отношении CD137 (в относительных световых единицах (RLU)) анти-CD137 агонистической антигенсвязывающей молекулы или антитела в присутствии 10 мкМ низкомолекулярного соединения больше в 2 раза или более, в 3 раза или более, в 5 раз или более, в 10 раз или более, в 20 раз или более, в 30 раз или более, в 50 раз или более, в 60 раз или более, в 70 раз или более, в 80 раз или более, или в 90 раз или более по сравнению с (ii) агонистической активностью в отношении CD137 (в относительных световых единицах) в отсутствие низкомолекулярного соединения. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения если итоговая концентрация антитела составляет 0,1 мкг/мл в пункте «б) Анализ агонистической активности (анализ репортерного гена)», подробно рассмотренного в разделе «В. Анализы», (i) агонистическая активность в отношении CD137 (в относительных световых единицах (RLU)) анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела в присутствии 100 мкМ низкомолекулярного соединения больше в 2 раза или более, в 3 раза или более, в 5 раз или более, в 10 раз или более, в 20 раз или более, в 30 раз или более, в 50 раз или более, в 60 раз или более, в 70 раз или более, в 80 раз или более, или в 90 раз или более по сравнению с (ii) агонистической активностью в отношении CD137 (в относительных световых единицах) в отсутствие низкомолекулярного соединения. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения если итоговая концентрация антитела составляет 0,1 мкг/мл в пункте «б) Анализ агонистической активности (анализ репортерного гена)», подробно рассмотренного в разделе «В. Анализы», (i) агонистическая активность в отношении CD137 (в относительных световых единицах (RLU)) анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела в присутствии 250 мкМ низкомолекулярного соединения больше в 2 раза или более, в 3 раза или более, в 5 раз или более, в 10 раз или более, в 20 раз или более, в 30 раз или более, в 50 раз или более, в 60 раз или более, в 70 раз или более, в 80 раз или более, или в 90 раз или более по сравнению с (ii) агонистической активностью в отношении CD137 (в относительных световых единицах) в отсутствие низкомолекулярного соединения. В любом из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, дополнительно, 1 мкг/мл анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела по существу не проявляет агонистической активности в отношении CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения.

2. Фрагменты антител

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматриваемое антитело является фрагментом антитела. К фрагментам антител относятся, но ими перечень не ограничивается, фрагменты Fab, Fab’, Fab’-SH, $F(ab')_2$, Fv и scFv, а также другие фрагменты, описанные ниже. Обзор по фрагментам антител опубликован Hudson с соавт. *Nat. Med.* 9, 2003, 129-134. Обзор фрагментов scFv см., например, в публикации Pluckthun в «*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*», под ред. Rosenburg и Moore, (изд-во Springer-Verlag, Нью-Йорк), 113, 1994, 269-315; см. также WO 93/16185; US 5571894 и US 5587458. Для обсуждения фрагментов Fab и $F(ab')_2$, содержащих остатки эпитопа, связывающего рецептор спасения, и имеющих увеличенный период полужизни *in vivo*, см. US 5869046.

Диатела и фрагменты антитела с двумя сайтами связывания антигена могут быть бивалентными или биспецифичными. См., например, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson с соавт., *Nat. Med.* 9, 2003, 129-134; Hollinger с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1993, 6444-6448. Триатела и тетратела также описаны в публикации Hudson с соавт., *Nat. Med.* 9, 2003, 129-134.

Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие весь или часть вариабельного домена тяжелой цепи или весь или часть вариабельного домена легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения однодоменное антитело является однодоменным антителом человека (фирма Domantis, Inc., Уолтем, Массачусетс; см., например, US 6248516 B1).

Фрагменты антител могут быть получены различными методами, включая, но ими не ограничиваясь, протеолитическое расщепление интактного антитела, а также выработку рекомбинантными клетками-хозяевами (например, *E. coli* или фаг) по описанию настоящего изобретения.

3. Химерные и гуманизированные антитела

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотренное антитело является химерным антителом. Некоторые химерные антитела описаны, например, в US 4816567; Morrison с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 1984, 6851-6855. В одном из примеров химерное антитело содержит вариабельную область, не относящуюся к антителу человека (например, вариабельную область, производную от мыши, крысы, хомяка, кролика или приматов, но не от человека, таких как обезьяна), и константную область человека. В другом примере химерное антитело представляет собой антитело «переключенного класса», в котором класс или подкласс был изменен по сравнению с классом родительского антитела. Химерные антитела включают их антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения химерное антитело представляет собой гуманизированное антитело. Обычно антитело, не являющееся антителом человека, гуманизируют для снижения иммуногенности для человека, сохраняя при этом специфичность и аффинность исходного, не являющегося антителом человека, антитела. Обычно гуманизированное антитело включает один или более вариабельных доменов, в которых HVR, например, CDR (или их части) происходят из антитела, не являющегося антителом человека, а FR (или их части) происходят из последовательностей антитела человека. Гуманизированное антитело необязательно также может содержать по меньшей мере часть константной области человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения некоторые остатки FR в гуманизированном антителе заменены соответствующими остатками антитела, не являющегося антителом человека (например, антитела, из которого получены остатки HVR), например, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

Гуманизированные антитела и методы их получения рассмотрены, например, Almagro и Fransson, *Front. Biosci.* 13, 2008, 1619-1633, а также описаны, например, в публикациях Riechmann с соавт., *Nature* 332, 1988, 323-329; Queen с соавт., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86, 1989, 10029-10033; US 5821337, US 7527791, US 6982321, US 7087409; Kashmiri *с соавт.*, *Methods* 36, 2005, 25-34 (описание трансплантации области, определяющей специфичность (SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28, 1991, 489-498 (описание «перекладки»); Dall'Acqua с соавт., *Methods* 36, 2005, 43-60 (описание «перетасовки FR»); Osbourn с соавт., *Methods* 36, 2005, 61-68; Klimka с соавт., *Br. J. Cancer*, 83, 2000, 252-260 (описание подхода «направленного отбора» к перетасовке FR).

Области каркасного участка человека, которые можно использовать для гуманизирования, включают, но ими не ограничиваются: каркасные области, выбранные с использованием метода «наилучшего соответствия» (см., например, Sims с соавт. *J. Immunol.* 151, 1993, 2296); области каркасного участка, производного от консенсусной последовательности антител человека определенной подгруппы вариабельных областей легкой или тяжелой цепи (см., например, Carter с соавт. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1992, 4285; and Presta с соавт. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); зрелые (соматически мутировавшие) каркасные области человека или каркасные области зародышевой линии человека (см., например, Almagro и Fransson, *Front. Biosci.* 13, 2008, 1619-1633); и области каркасного участка, полученные из скрининговых библиотек FR (См., например, Baca с соавт., *J. Biol. Chem.* 272, 1997, 10678-10684; Rosok с соавт., *J. Biol. Chem.* 271, 1996, 22611-22618).

4. Антитела человека

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотренное в настоящем изобретении антитело является антителом человека. Антитела человека можно получить с использованием различных методик, известных в данной области. Антитела человека в общем описаны в публикациях van Dijk, van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 2001, 368-374, и Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20, 2008, 450-459.

Антитела человека могут быть получены путем введения иммуногена трансгенному животному, которое было модифицировано для выработки интактных антител человека или интактных антител с вариабельными областями человека в ответ на антигенную пробу. Такие животные обычно содержат все или часть локусов иммуноглобулина человека, которые заменяют эндогенные локусы иммуноглобулина, или которые присутствуют вне хромосом или случайным образом интегрированы в хромосомы животного. У таких трансгенных мышей локусы эндогенного иммуноглобулина обычно инактивированы. Для обзора методов получения антител человека от трансгенных животных см. Lonberg, *Nat. Biotech.* 23, 2005, 1117-1125. См. также, например, патенты US 6075181 и US 6150584, описывающие технологию XENOMOUSE™; патент US 5770429, описывающий технологию HuMab (зарегистрированная торговая марка); патент US 7041870, описывающий технологию K-M MOUSE (зарегистрированная торговая марка), и публикацию патентной заявки US 2007/0061900, описывающую технологию VelociMouse (зарегистрированная торговая марка). Вариабельные области человека из интактных антител, вырабатываемые такими животными, можно дополнительно модифицировать, например, путем комбинирования с другой константной областью человека.

Антитела человека также можно получить методами на основе гибридом. Описаны клеточные линии миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека для выработки моноклональных антител человека. (См., например, Kozbor *J. Immunol.*, 133, 1984, 3001); Brodeur с соавт. в кн.: *Monoclonal Antibody Production*

Techniques and Applications, 1987, 51-63, изд-во Marcel Dekker, Inc., Нью-Йорк); Boerner с соавт., *J. Immunol*., 147, 1991, 86.) Антитела человека, полученные с помощью технологии гибридом B-клеток человека, также описаны Li с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 2006, 3557-3562. Дополнительные методы описаны, например, в US 7189826 (описание выработки моноклональных антител IgM человека линиями гибридомных клеток); Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4),2006, 265-268 (описание гибридом клеток человека с клетками человека). Технология гибридомы человека (технология Trioma) также описана в работах Vollmers, Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3), 2005, 927-937, и Vollmers, Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3), 2005, 185-191.

Антитела человека также могут быть получены путем выделения последовательностей вариабельного домена клона Fv, выбранных из полученных от человека библиотек фагового дисплея. Такие последовательности вариабельного домена затем можно комбинировать с желаемым константным доменом человека. Методы отбора человеческих антител из библиотек антител описаны ниже.

5. Антитела, производные от библиотек

Антитела по настоящему изобретению могут быть выделены путем скрининга комбинаторных библиотек на антитела с требуемой активностью или активностями. Например, в данной области известны различные методы создания библиотек фагового дисплея и скрининга таких библиотек на антитела, обладающие требуемыми характеристиками связывания. Такие методы рассмотрены, например, в работе Hoogenboom с соавт., *Methods in Molecular Biology* 178, 2001,1-37, под ред. O’Brien с соавт., изд-во Human Press, Тотова, Нью-Джерси, а также описаны, например, McCafferty с соавт., *Nature* 348, 552-554; Clackson с соавт., *Nature* 352, 1991, 624-628; Marks с соавт., *J. Mol. Biol.* 222, 1992, 581-597; Marks, Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248, 2003, 161-175 (под ред. Lo, изд-во Human Press, Тотова, Нью-Джерси); Sidhu с соавт., *J. Mol. Biol.* 338(2), 2004, 299-310; Lee с соавт., *J. Mol. Biol.* 340(5), 2004, 1073-1093; Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34), 2004, 12467-12472; Lee с соавт., *J. Immunol. Methods* 284(1-2), 2004, 119-132.

В некоторых методах фагового дисплея репертуары генов VH и VL отдельно клонируют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и случайным образом рекомбинируют в фаговых библиотеках, которые затем могут быть проверены на антигенсвязывающий фаг, как описано Winter с соавт., *Ann. Rev. Immunol.*, 12, 1994, 433-455. Фаг обычно отображает фрагменты антител либо в виде одноцепочечных фрагментов Fv (scFv), либо в виде фрагментов Fab. Библиотеки из иммунизированных источников предоставляют антитела с высоким сродством к иммуногену без необходимости конструирования гибридом. В другом варианте наивный репертуар можно клонировать (например, из человека) для обеспечения единого источника антител к широкому спектру чужеродных, а также аутоантигенов без какой-либо иммунизации, как описано Griffiths с соавт., *EMBO J,* 12, 1993, 725-734. Наконец, наивные библиотеки также могут быть получены синтетически путем клонирования неупорядоченных сегментов V-гена из стволовых клеток и использования праймеров ПЦР, содержащих случайную последовательность, для кодирования высоко вариабельных участков CDR3 и для выполнения реаранжировки *in vitro*, как описано Hoogenboom and Winter, *J. Мол. Biol.*, 227, 1992, 381-388. Патентные публикации, описывающие фаговые библиотеки человеческих антител, включают, например, US 5750373 и публикации патентных заявок 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 и 2009/0002360.

Антитела или фрагменты антител, выделенные из библиотек антител человека, в настоящем изобретении расценивают как антитела человека или фрагменты антител человека.

Антигенсвязывающие молекулы или антитела, обладающие антигенсвязывающей активностью, зависящей от низкомолекулярного соединения по настоящему изобретению, могут быть выбраны путем проведения скрининга библиотеки антигенсвязывающих молекул. В качестве такой библиотеки можно использовать описанные выше комбинаторные библиотеки. Библиотека антигенсвязывающих молекул может быть с непредвзятым репертуаром антигенсвязывающих молекул (наивная библиотека) или может иметь необъективный репертуар антигенсвязывающих молекул. Примеры библиотеки последнего типа включают библиотеку антигенсвязывающих молекул, которым заранее придается связывающая активность по отношению к определенному соединению. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения библиотека антигенсвязывающих молекул представляет собой библиотеку антигенсвязывающих молекул, в которую заранее вносятся аминокислотные изменения для придания связывающей активности по отношению к определенному соединению. Примеры библиотек такого типа включают библиотеки, описанные, например, в публикации международной патентной заявки WO 2015/083764.

6. Мультиспецифические антитела

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают антитело, которое является мультиспецифическим, например, биспецифическим антителом. Мультиспецифические антитела – это моноклональные антитела, которые обладают специфичностью связывания по крайней мере с двумя разными сайтами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одна из специфичностей связывания предназначена для CD137, а другая – для любого другого антигена. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифические антитела могут связываться с двумя разными эпитопами CD137. Биспецифические антитела также можно использовать для локализации цитотоксических агентов в клетках, экспрессирующих CD137. Биспецифические антитела можно получить в виде полноразмерных антител или фрагментов антител.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела по настоящему изобретению являются биспецифическими антителами, одна составляющая которых связывается с CD137, зависящая от низкомолекулярного соединения, а другая составляющая связывается с антигеном, отличным от CD137. «Антиген», отличный от CD137, особенно не ограничен по структуре. Другими словами, антиген может быть неорганическим или органическим соединением. Типичные антигены описывают ниже. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антигены предпочтительно представляют собой антигены, экспрессируемые в раковых клетках, иммунных клетках, стромальных клетках или подобных клетках в раковых тканях или воспалительных тканях.

В настоящем изобретении «антигены» существенным образом не ограничиваются по своей структуре, при условии, что они содержат эпитопы, с которыми связываются антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению. Антигены могут быть неорганическими или органическими веществами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения к примерам антигенов относятся: 17-IA, 4-1BB, 4Dc, 6-кето-PGF1a, 8-изо-PGF2a, 8-оксо-dG, рецептор аденозина A1, A33, ACE, ACE-2, активин, активин A, активин AB, активин B, активин C, активин RIA, активин RIA ALK-2, активин RIB ALK-4, активин RIIA, активин RIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, аддрессин, aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, альфа-1-антитрипсин, антагонист альфа-V/бета-1, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, ARC, ART, артемин, анти-Id, ASPARTIC, предсердный натрийуретический пептид, av/b3 интегрин, Axl, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, фактор стимуляции B-лимфоцитов (BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2 BMP-2a, BMP-3 остеогенин, BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II (BRK-3), BMP, b-NGF, BOK, бомбезин, костный нейротрофический фактор, BPDE, BPDE-ДНК, BTC, фактор комплемента 3 (C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, кальцитонин, цАМФ, карциноэмбриональный антиген (CEA), связанный с раком антиген, катепсин A, катепсин B, катепсин C/DPPI, катепсин D, катепсин E, катепсин H, катепсин L, катепсин O, катепсин S, катепсин V, катепсин X/Z/P, CBL, CCI, CCK2, CCL, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR, CCR1, CCR10, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33 (белок p67), CD34, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80 (B7-1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, cGMP, CINC, ботулиновый токсин, токсин *Clostridium perfringens*, CKb8-1, CLC, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, PD1, PDL1, LAG3, TIM3, галектин-9, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, цитокератин, ассоциированный с опухолью антиген, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, регуляторный фактор комплемента (фактор ускорения распада), des (1-3)-IGF-I (IGF-1 мозга), Dhh, дигоксин, DNAM-1, Dnase, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), EMA, EMMPRIN, ENA рецептор эндотелина, энкефалиназа, eNOS, Eot, эотаксин 1, EpCAM, эфрин B2/EphB4, EPO, ERCC, E-селектин, ET-1, фактор IIa, фактор VII, фактор VIIIc, фактор IX, белок активации фибробластов (FAP) , Fas, FcR1, FEN-1, ферритин, FGF, FGF-19, FGF-2, FGF-3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, фибрин, FL, FLIP, Flt-3, Flt-4, фолликул стимулирующий гормон, фракталкин, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14, CDMP-1), GDF-6 (BMP-13, CDMP-2), GDF-7 (BMP-12, CDMP-3), GDF-8 (миостатин), GDF-9, GDF-15 (MIC-1), GDNF, GDNF, GFAP, GFRa-1, GFR-альфа1, GFR-альфа2, GFR-альфа3, GITR, глюкагон, Glut4, гликопротеин IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, гормон высвобождения гормона роста, гаптен (NP-cap или NIP-cap), HB-EGF, HCC, гликопротеин оболочки gB HCMV, гликопротеин оболочки gH HCMV, UL HCMV, гематопоэтический фактор роста (HGF), Hep B gp120, гепараназа, Her2, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), гликопротеин gB вируса простого герпеса (HSV), гликопротеин gD HSV, HGFA, высокомолекулярный антиген, связанный с меланомой (HMW-MAA), HIV gp120, HIV IIIB gp 120 V3 петля, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMFG PEM, HRG, Hrk, сердечный миозин человека, цитомегаловирус человека (HCMV), гормон роста человека (HGH), HVEM, I-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, IgA receptor, IgE, IGF, IGF-связывающий белок, IGF-1R, IGFBP, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-18R, IL-21, IL-23, IL-27, интерферон (INF) -альфа, INF-бета, INF-гамма, ингибин, iNOS, цепь A инсулина, цепь B инсулина, инсулиноподобный фактор роста 1, интегрин альфа 2, интегрин альфа 3, интегрин альфа 4, интегрин альфа4/бета1, интегрин альфа4/бета7, интегрин альфа5 (альфа V), интегрин альфа5/бета1, интегрин альфа5/бета3, интегрин альфа6, интегрин бета1, интегрин бета2, интерферон гамма, IP-10, I-TAC, JE, калликреин 2, калликреин 5, калликреин 6, калликреин 11, калликреин 12, калликреин 14, калликреин 15, калликреин L1, калликреин L2, калликреин L3, калликреин, калликреин L3, калликреин фактор роста кератиноцитов (KGF), ламинин 5, LAMP, LAP, LAP (TGF-1), латентный TGF-1, латентный TGF-1 bp1, LBP, LDGF, LECT2, левша, антиген Lewis-Y, антиген Lewis-Y , LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, липопротеин, LIX, LKN, Lptn, L-селектин, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, поверхность легких, лютеинизирующий гормон, рецептор лимфотоксина бета, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCAM, MCK-2, MCP, M-CSF, MDC, Mer, METALLOPROTEASES, MGDF receptor, MGMT, MHC (HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-альфа, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MPIF, Mpo, MSK, MSP, муцин (Muc1), MUC18, вещество, ингибирующее мюллериан, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, N-C адгерин, NCA 90, NCAM, NCAM, неприлизин, нейротрофин-3, -4 или -6, нейротрофин, фактор роста нервов (NGF), NGFR, NGF-бета, nNOS, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L, OX40R, p150, p95, PADPr, паратироидный гормон, PARC , PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-кадгерин, PCNA, PDGF, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIN, PLA2, щелочная фосфатаза плаценты (PLAP), PlGF, PLP, PP14, проинсулин, прорелаксин, белок C, PS, PSA, PSCA, простатоспецифический мембранный антиген (PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, цепь релаксина A, цепь релаксина B, ренин, респираторный синцитиальный вирус (RSV) F, RSV Fgp, Ret, ревматоидный фактор, RLIP76, RPA2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, SERINE, сывороточный альбумин, sFRP-3, Shh, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72 (опухоль-ассоциированный гликопротеин-72), TARC, TCA-3, рецептор T-клеток (например, рецептор T-клеток альфа/бета), TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, PLAP-подобная щелочная фосфатаза семенников, TfR, TGF, TGF-альфа, TGF-бета, TGF-бета Pan специфический, TGF-бетаRI (ALK-5), TGF-бетаRII, TGF-бетаRIIb, TGF-бетаRIII, TGF-бета1, TGF-бета2, TGF-бета3, TGF-бета4, TGF-бета5, тромбин, тимус Ck-1, тиреотропный гормон, Tie, TIMP, TIQ, тканевой фактор, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, TNF-альфа, TNF-альфабета, TNF-бета2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2, DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5, KILLER, TRICK-2A, TRICK-B), TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1, LIT, TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2, TRUNDD), TNFRSF11A (RANK ODF R, TRANCE R), TNFRSF11B (OPG OCIF, TR1), TNFRSF12 (TWEAK R FN14), TNFRSF13B

(TACI), TNFRSF13C (BAFF R), TNFRSF14 (HVEM ATAR, HveA, LIGHT R, TR2), TNFRSF16 (NGFR p75NTR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR AITR), TNFRSF19 (TROY TAJ, TRADE), TNFRSF19L (RELT), TNFRSF1A (TNF RI CD120a, p55-60), TNFRSF1B (TNF RII CD120b, p75-80), TNFRSF26 (TNFRH3), TNFRSF3 (LTbR TNF RIII, TNFC R), TNFRSF4 (OX40 ACT35, TXGP1 R), TNFRSF5 (CD40 p50), TNFRSF6 (Fas Apo-1, APT1, CD95), TNFRSF6B (DcR3 M68, TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1BB CD137, ILA), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFRSF25 (DR3 Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-1), TNFSF10 (TRAIL Apo-2 лиганд, TL2), TNFSF11 (TRANCE/RANK лиганд ODF, OPG лиганд), TNFSF12 (TWEAK Apo-3 лиганд, DR3 лиганд), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS, TALL1, THANK, TNFSF20), TNFSF14 (LIGHT HVEM лиганд, LTg), TNFSF15 (TL1A/VEGI), TNFSF18 (GITR лиганд AITR лиганд, TL6), TNFSF1A (TNF-a конектин, DIF, TNFSF2), TNFSF1B (TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC, p33), TNFSF4 (OX40 лиганд gp34, TXGP1), TNFSF5 (CD40 лиганд CD154, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6 (Fas лиганд Apo-1 лиганд, APT1 лиганд), TNFSF7 (CD27 лиганд CD70), TNFSF8 (CD30 лиганд CD153), TNFSF9 (4-1BB лиганд CD137 лиганд), TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, рецептор трансферрина, TRF, Trk, TROP-2, TLR1 (Толл-подобный рецептор 1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TSG, TSLP, опухоль-ассоциированный антиген CA125, опухольассоциированный антигенэкспрессирующий Lewis-Y ассоциированные углеводы, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, урокиназа, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE- кадгерин, VE- кадгерин -2, VEFGR-1 (flt-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3 (flt-4), VEGI, VIM, вирусный антиген, VLA, VLA-1, VLA-4, VNR интегрин, фактор фон Виллебранда, WIF-1, WNT1, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD, HMGB1, IgA, A бета, CD81, CD97, CD98, DDR1, DKK1, EREG, Hsp90, IL-17/IL-17R, IL-20/IL-20R, окисленный LDL, PCSK9, прекалликреин, RON, TMEM16F, SOD1, хромогранин A, хромогранин B, тау, VAP1, высокомолекулярный кининоген, IL-31, IL-31R, Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9, EPCR, C1, C1q, C1r, C1s, C2, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4a, C4b, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9, фактор B, фактор D, фактор H, пропердин, склеростин, фибриноген, фибрин, протромбин, тромбин, тканевой фактор, фактор V, фактор Va, фактор VII, фактор VIIa, фактор VIII, фактор VIIIa, фактор IX, фактор IXa, фактор X , фактор Xa, фактор XI, фактор XIa, фактор XII, фактор XIIa, фактор XIII, фактор XIIIa, TFPI, антитромбин III, EPCR, тромбомодулин, TAPI, tPA, плазминоген, плазмин, PAI-1, PAI-2, GPC3, синдекан-1, синдекан-2, синдекан-3, синдекан-4, LPA и S1P. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения примеры антигенов включают рецепторы гормонов и факторов роста. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антигенами являются те антигены, которые экспрессируются или секретируются клетками, присутствующими в опухолевых тканях (например, опухолевыми клетками, иммунными клетками, стромальными клетками или другими подобными).

Методы получения мультиспецифических антител включают, но не ограничиваются ими, рекомбинантную совместную экспрессию двух пар тяжелая цепь-легкая цепь иммуноглобулина, имеющих разные специфичности (см. Milstein, Cuello, *Nature* 305, 1983, 537; WO 93/08829; Traunecker с соавт., *EMBO J.* 10, 1991, 3655), конструирование по типу «выступ-во-впадину» (см., например, US 5731168). Мультиспецифические антитела также могут быть получены путем создания электростатических управляющих эффектов для создания Fc-гетеродимерных молекул антитела (WO 2009/089004A1); перекрестным сшиванием двух или более антител или фрагментов (см., например, US 4676980; Brennan с соавт., *Science*, 1985, 229:81); использованием лейциновых молний для выработки биспецифических антител (см., например, Kostelny с соавт., *J. Immunol.*, 1992, 148(5):1547-1553); использованием технологии «диател» для получения фрагментов биспецифических антител (см., например, Hollinger с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90:6444-6448); использованием димеров одноцепочечных Fv (scFv) (см., например, Gruber с соавт., *J. Immunol.*, 1994, 152:5368); и получением триспецифических антител, как описано, например, Tutt с соавт. *J. Immunol.* 1991, 147:60.

Сконструированные антитела с тремя или более функциональными антигенсвязывающими сайтами, включая мультивалентные «антитела-осьминоги», также включены в настоящее изобретение (см., например US 2006/0025576A1).

В настоящем изобретении также предусматривают «Fab двойного действия» или «DAF (Dual acting Fab)», содержащий антигенсвязывающий сайт, который связывается с CD137, а также с другим отличающимся антигеном (см., например, US 2008/0069820).

7. Варианты антител

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают варианты аминокислотной последовательности представленных антител. Например, может быть желательным улучшить аффинность и/или другие биологические свойства антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела могут быть получены путем внесения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Любая комбинация делеции, вставки и замены может быть использована для получения конечной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками, например связыванием антигена.

а) Варианты замен, инсерций и делеций

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают варианты антител, содержащие одну или несколько аминокислотных замен. Сайты, представляющие интерес для замещающего мутагенеза, включают области HVR и FR. Консервативные замены показаны в табл. 5 под заголовком «предпочтительные замены». Более существенные изменения представлены в табл. 5 под заголовком «примеры замен» и дополнительно описаны ниже со ссылкой на классы боковых цепей аминокислот. Аминокислотные замены могут быть введены в представляющее интерес антитело, и продукты могут быть проверены на желаемую активность, например, сохранение/улучшение связывания антигена, снижение иммуногенности или улучшение ADCC или CDC.

Таблица 5.

Исходный остаток	Примеры замен	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu

Исходный остаток	Примеры замен	Предпочтительные замены
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин	Leu

Аминокислоты могут быть сгруппированы в соответствии со свойствами боковой цепи:

(1) гидрофобные: Норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) кислые: Asp, Glu;

(4) основные: His, Lys, Arg;

(5) остатки, влияющие на ориентацию боковой цепи: Gly, Pro;

(6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены приводят к замене представителя одного из этих классов на другой класс.

Один тип варианта замены включает замену одного или более остатков гипервариабельных областей родительского антитела (например, гуманизированного антитела или антитела человека). Как правило, полученный вариант (варианты), выбранные для дальнейшего исследования, могут иметь модификации (например, улучшения) определенных биологических свойств (например, повышенную аффинность, пониженную иммуногенность) по сравнению с исходным антителом и/или в значительной степени сохранят определенные биологические свойства родительского антитела. Типичный вариант замены представляет собой антитело с созревшей аффинностью, которое может быть легко получено, например, с использованием методов формирования аффинности на основе фагового дисплея, таких как описанные в настоящем изобретении. Вкратце, один или несколько остатков HVR мутируют, и варианты антитела отображаются на фаге и подвергаются скринингу на определенную биологическую активность (например, аффинность).

Изменение (например, замены) могут быть сделаны в HVR, например, для улучшения аффинности антитела. Такие изменения могут быть сделаны в «горячих точках» HVR, то есть в остатках, кодируемых кодонами, которые подвергаются мутациям с высокой частотой в процессе соматического созревания (см., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 2008, 207:179-196), и/или в остатках, которые контактируют с антигеном, при этом полученный вариант VH или VL тестируют на аффинность. Описано созревание аффинности путем конструирования и повторного отбора из вторичных библиотек, например, в публикации Hoogenboom с соавт. в кн.: *Methods in Molecular Biology* 2001, 178:1-37, под ред. O'Brien с соавт., изд-во Human Press, Тотова, Нью-Джерси. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, связанных с созреванием аффинности, вводят разнообразие в вариабельные гены, выбранные для созревания, любым из множества методов (например, подверженной ошибкам ПЦР, перетасовкой цепей или олигонуклеотид-направленным мутагенезом). Затем создают вторичную библиотеку. Эту библиотеку подвергают скринингу для выявления любых вариантов антител с желаемой аффинностью. Другой метод введения разнообразия включает подходы, направленные на HVR, в которых несколько остатков HVR (например, 4-6 остатков за раз) рандомизируют. Остатки HVR, участвующие в связывании антигена, могут быть специфически идентифицированы, например, с использованием мутагенеза или моделирования аланинового сканирования. CDR-H3 и CDR-L3, в частности, часто становятся мишенью.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения замены, вставки или делеции могут происходить в одной или нескольких HVR, если такие изменения существенно не снижают способность антитела связывать антиген. Например, консервативные изменения (например, консервативные замены, как предусмотрено в данном документе), которые существенно не снижают аффинности, могут быть внесены в HVR. Такие изменения могут, например, происходить за пределами контактирующих с антигеном остатков в

HVR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения из вариантов последовательностей VH и VL, представленных выше, каждая HVR либо не изменена, либо содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

Полезный метод идентификации остатков или областей антитела, которые могут быть мишенью для мутагенеза, называется «аланиновый сканирующий мутагенез», который описан Cunningham и Wells, *Science*, 1989, 244:1081-1085. По этому методу остаток или группу целевых остатков (например, заряженных остатков, таких как arg, asp, his, lys и glu) идентифицируют и заменяют нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или полиаланином) чтобы определить, есть ли воздействие на взаимодействие антитела с антигеном. Дальнейшие замены могут быть введены в аминокислотные положения, демонстрирующие функциональную чувствительность к начальным заменам. В другом варианте или дополнительно может быть проанализирована кристаллическая структура комплекса антиген-антитело для определения точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки могут быть нацелены или исключены как кандидаты на замену. Варианты могут быть проверены, чтобы определить, содержат ли они требуемые свойства.

Инсерции аминокислотной последовательности включают амино- и/или карбокси-концевые слияния длиной от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым метионильным остатком. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают слияние фермента (например, для ADEPT) или полипептида, который увеличивает период полужизни антитела в плазме, по N- или C-концу антитела.

<u>б) Варианты гликозилирования</u>

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотренное антитело изменено для увеличения или уменьшения степени гликозилирования антитела. Добавление или удаление сайтов гликозилирования к антителу может быть выполнено апробированным методом изменения аминокислотной последовательности таким образом, что создают или удаляют один или несколько сайтов гликозилирования.

Если антитело включает Fc-область, присоединенный к ней углевод может быть изменен. Нативные антитела, вырабатываемые клетками млекопитающих, обычно содержат разветвленный двухантенарный олигосахарид, который обычно присоединен N-связью к Asn297 домена CH2 области Fc. См., например, Wright с соавт., *TIBTECH* 1997, 15:26-32. В составе могут быть разные олигосахариды, например, манноза, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактоза и сиаловая кислота, а также фукоза, присоединенная к GlcNAc в «стволе» двухантенарной структуры олигосахарида. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификации олигосахарида в антителе по настоящему изобретению могут быть сделаны для создания вариантов антител с определенными улучшенными свойствами.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают варианты антител, имеющие углеводную структуру, в которой отсутствует фукоза, присоединенная (прямо или опосредованно) к Fc-области. Например, количество фукозы в таком антителе может составлять от 1% до 80%, от 1% до 65%, от 5% до 65% или от 20% до 40%. Количество фукозы определяют путем расчета среднего количества фукозы в цепи сахара при Asn297 относительно суммы всех гликоструктур, присоединенных к Asn 297 (например, сложных, гибридных и высокоманнозных структур) по данным измерения методом масс-спектрометрии MALDI-TOF по описанию в WO 2008/077546, например при Asn297, относится к остатку аспарагина, расположенному около положения 297 в области Fc (нумерация остатков области Fc по EC); однако Asn297 может также располагаться примерно на ± 3 аминокислоты выше или ниже по цепи от положения 297, то есть между положениями 294 и 300, из-за незначительных вариаций последовательности в антителах. Такие фукозилированные варианты могут обладать улучшенной функцией ADCC. См., например, US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Примеры публикаций, относящихся к «дефукозилированным» или «дефицитным по фукозе» вариантам антител, включают: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki с соавт. *J. Mol. Biol.* 2004, 336:1239-1249; Yamane-Ohnuki с соавт., *Biotech. Bioeng.* 2004, 87:614.

Примеры клеточных линий, способных вырабатывать дефукозилированные антитела, включают клетки Lec13 CHO, дефицитные по фукозилированию белка (Ripka с соавт. *Arch. Biochem. Biophys.* 1986, 249:533-545; US 2003/0157108 A1; WO 2004/056312 A1, Adams *с соавт.*, особенно в примере 11), и линии клеток с нокаутом, такие как ген альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8, клетки с нокаутом CHO (см., например, Yamane-Ohnuki с соавт. *Biotech. Bioeng.* 2004, 87-614; Kanda Y. с соавт., *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 94(4):680-688; WO2003/085107).

Варианты антител дополнительно содержат олигосахариды, разделенные пополам, например, в которых двухантенный олигосахарид, присоединенный к Fc-области антитела, разделен пополам GlcNAc. Такие варианты антител могут иметь пониженное фукозилирование и/или улучшенную функцию ADCC. Описаны примеры таких вариантов антител, например, в WO 2003/011878 (Jean-Mairet с соавт.); US 6602684 (Umana с соавт.); US 2005/0123546 (Umana *с соавт.*). Также предусмотрены варианты антител по крайней мере с одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc-области. Такие варианты антител могут иметь улучшенную функцию CDC. Такие варианты антител описаны, например, в WO 1997/30087 (Patel с соавт.); WO 1998/58964 (Raju, S.); WO 1999/22764 (Raju, S.).

в) Варианты Fc-области

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одна или более аминокислотных модификаций могут быть введены в Fc-область антитела, предусмотренного в настоящем изобретении, тем самым создавая вариант Fc-области (который также может называться «измененной Fc-областью»). Вариант Fc-области может содержать последовательность Fc-области человека (например, Fc-области IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), включающей модификацию аминокислоты (например, замену) в одном или нескольких аминокислотных положениях.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рассматривают вариант антитела, который обладает некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает его желательным кандидатом для применений, в которых важен период полужизни антитела *in vivo*, однако некоторые эффекторные функции (такие как комплемент и ADCC) являются ненужными или вредными. *In vitro* и/или *in vivo* могут быть проведены анализы цитотоксичности для подтверждения снижения/истощения активности CDC и/или ADCC. Например, анализы связывания рецептора Fc (FcR) могут быть проведены, чтобы гарантировать, что антитело утратило способность связывать Fc гамма R (следовательно, вероятно, не обладает активностью ADCC), но сохраняет связывающую активность с FcRn. Первичные клетки для опосредования ADCC, клетки NK, экспрессируют только Fc гамма RIII, тогда как моноциты экспрессируют Fc гамма RI, Fc гамма RII и Fc гамма RIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках суммирована в табл. 3 на странице 464 публикации Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol*. 1991, 9:457-492. Примеры методов анализа активности ADCC *in vitro*, перечень которых не ограничивается данными примерами, приведены в US 5500362 (см., например, Hellstrom I. с соавт. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 1986, 83:7059- 7063; Hellstrom I с соавт., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 1985, 82:1499-1502; US 5821337 (см. Bruggemann M. с соавт., *J. Exp. Med.* 1987, 166:1351-1361). В другом варианте можно использовать методы нерадиоактивных анализов (см., например, анализ нерадиоактивной цитотоксичности ACT1™ методом жидкостной цитометрии (CellTechnology, Inc., Маунтин-Вью, Калифорния; и CytoTox 96 (зарегистрированная торговая марка) анализ нерадиоактивной цитотоксичности (фирма Promega, Мэдисон, Висконсин)). Эффекторные клетки, применимые для таких анализов, включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и природные клетки-киллеры (NK). В другом варианте или дополнительно активность ADCC исследуемой молекулы можно оценить *in vivo*, например, в животной модели, такой как описанная в публикации Clynes с соавт. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 1998, 95:652-656. Анализы связывания C1q также могут быть выполнены для подтверждения того, что антитело неспособно связывать C1q и, следовательно, не обладает активностью CDC. См., например, связывание C1q и C3c методом ELISA в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента может быть выполнен анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro с соавт., *J. Immunol. Methods* 1996, 202:163; Cragg M.S. с соавт., *Blood* 2003, 101:1045-1052; Cragg M.S., Glennie M.J., *Blood* 2004, 103:2738-2743). Связывание FcRn и определение клиренса/периода полужизни *in vivo* также можно проводить с использованием методов, известных в данной области (см., например, Petkova S.B. с соавт., *Int'l. Immunol.* 2006, 18(12):1759-1769).

К антителам с пониженной эффекторной функцией относят антитела с заменой одного или более из остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 в области Fc (US 6737056). К таким мутантам Fc относятся мутанты Fc с заменами в двух или более положениях аминокислот 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый мутант Fc «DANA» с заменой остатков 265 и 297 на аланин (US 7332581).

Описаны некоторые варианты антител с повышенным или пониженным связыванием с FcR. (См., например, US 6737056; WO 2004/056312; Shields с соавт., *J. Biol. Chem.* 2001, 9(2):6591-6604).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вариант антитела включает Fc-область с одной или более аминокислотными заменами, которые улучшают ADCC, например, замены в положениях 298, 333 и/или 334 области Fc (нумерация остатков по EC).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в Fc-область вносят изменения, которые приводят к изменению (т.е. к увеличению или уменьшению) связывания C1q и/или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в US 6194551, WO 99/51642 и Idusogie с соавт. *J. Immunol.* 2000, 164:4178-4184.

Антитела с увеличенной полужизнью и повышенным связыванием с неонатальным рецептором Fc (FcRn), который ответственен за передача материнских IgG плоду (Guyer с соавт., *J. Immunol.* 1976, 117:587; Kim с соавт., *J. Immunol.* 1994, 24:249), описаны в US2005/0014934A1 (Hinton с соавт.). Эти антитела содержат Fc-область с одной или несколькими заменами в ней, которые увеличивают связывание Fc-области с FcRn. Такие варианты Fc включают варианты с заменами в одного или нескольких остатков в области Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например, замена остатка 434 в Fc-области (US 7371826).

См. также публикации Duncan, Winter, *Nature* 1988, 322:738-740; US 5648260; US 5624821; WO 94/29351, касающиеся примеров других вариантов Fc-области.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающая активность по отношению к каждому рецептору Fc-гамма человека (Fc-gamma R) области Fc антитела (включая вариант области Fc (то же самое применимо и далее)) может быть измерена методом захвата лиганда с использованием, например, BIACORE (зарегистрированная торговая марка) T200, в основе которых лежат методы анализа поверхностного плазмонного резонанса в качестве принципа измерения.

Подробности примера метода измерения связывающей активности Fc-области антитела в отношении различных рецепторов Fc-гамма человека (Fc-гамма Rs) описаны ниже. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающей активности Fc-области по отношению к Fc-гамма R оценивают с использованием BIACORE (зарегистрированная торговая марка) T200. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения это измерение проводят при 25°C с использованием буфера для измерений 50 мМ фосфат, 150 мМ NaCl, P20 0,05 мас./об.%, pH 7,4. В частности, около 1000 RU антитела, содержащего вариант Fc-области, сначала захватывается сенсорным чипом с помощью CaptureSelect (товарный знак) конъюгата Fab-лямбда человека-биотин (фирма ThermoFisher Scientific), иммобилизованного в качестве молекулы, захватывающей лиганд. Fc-гамма R человека разбавляют буфером для измерения до 8 нМ для Fc-гамма RIa и до 1000 нМ для других Fc-гамма R, и дают возможность связываться с захваченным антителом. Связывающую активность каждого антитела по отношению к каждому Fc-гамма R оценивают путем расчета количества связанного Fc-гамма R на единицу количества антитела (RU) с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software 2.0. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающая активность области Fc антитела в отношении различных рецепторов Fc-гамма человека (Fc-гамма R) может быть измерена методом, описанным в примере 7-4.

В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения Fc-гамма R, используемые для описанного выше способа измерения, могут быть внеклеточным доменом Fc-гамма R, полученным методом, описанным ниже. Во-первых, синтез гена внеклеточного домена Fc-гамма R проводят методом, известным специалистам в данной области. Для этого синтеза последовательности каждого Fc-гамма R готовят на основе информации, зарегистрированной в NCBI. Более конкретно, последовательность Fc-gamma RI получают на основе последовательности NCBI (номер в базе данных NM_000566.3), последовательность Fc-gamma RIIa получают на основе последовательности NCBI (номер в базе данных NM_001136219.1), последовательности для Fc- гамма RIIb получают на основе последовательности NCBI (номер в базе данных NM_004001.3), последовательность для Fc-гамма RIIIa получают на основе последовательности NCBI (номер в базе данных NM_001127593.1); к С-концу добавляют His-метку. Полиморфные сайты для Fc-гамма RIIa получают со ссылкой на *J. Exp. Med.*, 1990, 172:19-25, и полиморфные сайты для Fc-гамма RIIIa получают со ссылкой на *J. Clin. Invest.*, 1997, 100:1059-1070. Полученные фрагменты генов инсертируют в вектор экспрессии для клеток животных для получения векторов экспрессии. Такие векторы экспрессии временно вводят в клетки FreeStyle293 (фирма Invitrogen), полученные из клеток почки эмбрионального рака человека, и дают возможность экспрессироваться белку интереса. Супернатант культуры собирают и фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, затем очищают в основном с помощью описанных ниже четырех этапов. На первом этапе проводят катионообменную колоночную хроматографию (SP Sepharose FF); на втором этапе – колоночная аффинная хроматография к His-меткам (HisTrap HP); на третьем этапе – гель-фильтрационная колоночная хроматография (Superdex200); и, четвертый этап – асептическая фильтрация. Следует отметить, что для Fc-гамма RI в качестве первой стадии проводят анионообменную колоночную хроматографию с использованием Q-сефарозы FF. Концентрацию очищенного белка рассчитывают на основе коэффициента поглощения, рассчитанного путем измерения поглощения при 280 нм с использованием спектрофотометра и с использованием PACE или подобного метода для получения значений (*Protein Science*, 1995, 4:2411-2423).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающая активность области Fc антитела по отношению к FcRn человека может быть измерена методом захвата лиганда с использованием, например, BIACORE (зарегистрированная торговая марка) T200, принцип измерения которого основан на методах анализа поверхностного плазмонного резонанса.

Детали примера метода измерения связывающей активности Fc-области антитела с FcRn человека описаны ниже. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающую активность Fc-области антитела в отношении FcRn оценивают, используя BIACORE (зарегистрированная торговая марка) T200. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения это измерение проводят при 25°C с использованием буфера для измерений (50 мМ фосфат, 150 мМ NaCl, P20 – 0,05 мас./об.%; pH 6,0). В частности, около 400 RU антитела, содержащего Fc-область, сначала захватывается на сенсорном чипе, на котором CaptureSelect (торговая марка) Human Fab-lambda Kinetics Biotin Conjugate (фирма ThermoFisher Scientific) иммобилизован как молекула, захватывающая лиганд, и затем FcRn человека, разбавленный буфером для измерений, может связываться с ним. Связывающую активность каждого антитела по отношению к FcRn оценивают путем расчета KD (M) с использованием модели устойчивого состояния Biacore T200 Evaluation Software 2.0. В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения белок FcRn человека, используемый в этом измерении, получают в соответствии со способом, описанным в примере 2 WO2010107110, используемым в качестве образца. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающая активность области Fc антитела в отношении различных FcRn человека может быть измерена способом, описанным в примере 7-5.

г) Варианты антител, разработанных на основе цистеина

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения может потребоваться разработать сконструированные на основе цистеина антитела, например, «тиоMAb», в которых один или несколько остатков антитела заменены остатками цистеина. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения замещенные остатки находятся в доступных сайтах антитела. За счет замены этих остатков цистеином реактивные тиоловые группы тем самым размещают в доступных сайтах антитела и их можно использоваться для конъюгирования антитела с другими фрагментами, такими как фрагменты лекарственного средства или фрагменты линкер-лекарственное средство, для создания иммуноконъюгата, как описано ниже в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения любой один или несколько из следующих остатков могут быть заменены цистеином: V205 (нумерация Kabat) легкой цепи; A118 (нумерация EC) тяжелой цепи; и S400 (EU нумерация) области Fc тяжелой цепи. Сконструированные антитела с применением цистеина могут быть получены как описано, например, в US 7521541.

д) Производные антител

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают антитело, которое может быть дополнительно модифицировано за счет включения дополнительных небелковых фрагментов, которые известны в данной области и легко доступны. Фрагменты, подходящие для дериватизации антитела, включают, но ими не ограничиваются, водорастворимые полимеры. Примеры водорастворимых полимеров включают, но ими перечень не ограничивается, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена и малеинового ангидрида, полиаминокислоты (гомополимеры или статистические сополимеры) и декстран или поли (н-винилпирролидон) полиэтиленгликоль, гомополимеры полипропиленгликоля, сополимеры полипропиленоксида и этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Пропиональдегид полиэтиленгликоля может иметь преимущества при получении из-за его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, присоединенных к антителу, может варьировать, и если присоединено более одного полимера, они могут быть одинаковыми или разными молекулами. В общем, количество и/или тип полимеров, используемых для дериватизации, может быть определен с учетом ряда обстоятельств, например, конкретных свойств или функций подлежащего улучшению антитела, планируется ли использование производного антитела в терапии при определенные условия и т.д.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают конъюгаты антитела и небелкового фрагмента, которые можно избирательно нагревать под воздействием излучения. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения небелковый фрагмент представляет собой углеродную нанотрубку (Kam с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 2005, 102:11600-11605). Излучение может иметь любую длину волны и включает, помимо прочего, длины волн, которые не повреждают обычные клетки, но нагревают небелковый фрагмент до температуры, при которой гибнут клетки, проксимальные к небелковому фрагменту, не содержащему антитела.

Б. Методы рекомбинации и композиции

Антитела могут быть получены с использованием методов рекомбинации и композиции, например, описанные в US 4816567. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело, описанные в настоящем изобретении. Такая нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкую и/или тяжелую цепи антитела). В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают один или более векторов (например, векторов экспрессии), включающих такую нуклеиновую кислоту. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают клетку-хозяина, включающую такую нуклеиновую кислоту. В одном из подобных вариантов осуществления настоящего изобретения клетка-хозяин содержит (например, была трансформирована): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения клетка-хозяин является эукариотической, например клеткой яичника китайского хомячка (CHO) или лимфоидной клеткой (например, клетками Y0, NS0, Sp2/0). В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают способ получения анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела, который включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, как указано выше, в условиях, подходящих для экспрессии анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела, и необязательно извлечение антитела из клетки-хозяина (или среды для культивирования клеток-хозяев).

Для рекомбинантного получения анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, как описано выше, выделяют и вставляют в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такую нуклеиновую кислоту можно легко выделить и секвенировать с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела).

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в настоящем изобретении. Например, антитела могут вырабатываться в бактериях, в частности, когда гликозилирование и эффекторная функция Fc не нужны. Для экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях см., например, US 5648237, US 5789199, US 5840523 (см. также Charlton, *Methods in Molecular Biology,* 2003, 248:245-254 (под ред. B.K.C. Lo, изд-во Humana Press, Тотова, Нью-Джерси), в которых описывают экспрессию фрагментов антител в *E. coli*). После экспрессии антитело может быть выделено из биомассы бактериальных клеток в растворимую фракции и может быть дополнительно очищено.

Помимо прокариот, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, являются эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, чьи пути гликозилирования были «гуманизированы», что приводит к выработке антитела с частично или полностью гликозилированным образцом человека. См. публикации *Nat. Biotech.*, 2004, 22:1409-1414; Li с соавт., *Nat. Biotech.* 2006, 24:210-215.

Клетки-хозяева, применимые для экспрессии гликозилированного антитела, также происходят из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки насекомых, также применимы клетки растений. Идентифицированы многочисленные штаммы бакуловирусов, которые можно использовать в сочетании с клетками насекомых, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

В качестве клеток-хозяев также можно использовать клетки растений. См., например, US 5959177, US 6040498, US 6420548, US 7125978 и US 6417429 (описание технологии PLANTIBODIES™ по получению антител в клетках трансгенных растений).

В качестве клеток-хозяев также можно использовать клетки животных. Например, можно использовать линии клеток млекопитающих, которые адаптированы к росту в виде суспензии. К другим примерам относятся линии клеток-хозяев млекопитающих, а именно линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная вирусом SV40 (COS-7); линия почки эмбриона человека (293 или 293 клеткипо описанию, например, в публикации Graham с соавт., *J. Gen Virol.* 1977, 36:59); клетки почки детеныша хомяка (BHK, baby hamster kidney); клетки Сертоли мыши (клетки TM4 по описанию, например, в публикации Mather, *Biol. Reprod.* 1980, 23:243-251); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени буйволовой крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI согласно описанию, например, в публикации Mather с соавт., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1982, 383:44-68; клетки MRC 5; клетки FS4. К другим применимым линиям клеток-хозяев млекопитающих относятся клетки яичника китайского хомячка (CHO, Chinese hamster ovary), включая клетки DHFR-CHO (Urlaub с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980, 77:4216); клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Для обзора некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, применимых для выработки антител, см., например, Yazaki и Wu, *Methods in Molecular Biology*, 2003, 248: 255-268, под ред. B.K.C. Lo, изд-во Humana Press, Тотова, Нью-Джерси.

В. Методы исследования

Анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела, предусмотренные в настоящем изобретении, могут быть идентифицированы, подвергнуты скринингу или охарактеризованы по их физическим/химическим свойствам и/или биологической активности с помощью различных методов исследования, известных в данной области.

1. Анализ связывания и другие методы

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающая молекула или антитело по настоящему описанию тестируют на антигенсвязывающую активность, например, известными методами, такими как ELISA, вестерн-блоттинг и т.д.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения конкурентный анализ в присутствии низкомолекулярного соединения можно использовать для идентификации антигенсвязывающей молекулы или антитела, которые конкурируют за связывание с CD137 с анти-CD137 антигенсвязывающими молекулами или антителами, включая антитела A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 и/или A549/B167, описанные в табл. 37, в качестве комбинации вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи в присутствии низкомолекулярного соединения (например, в присутствии 10 микромолей или более, 50 микромолей или более, 100 микромолей или более, 150 микромолей или более, 200 микромолей или более или 250 микромолей или более низкомолекулярного соединения). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения такие конкурирующие антигенсвязывающие молекулы или антитела связываются с одним и тем же эпитопом (например, линейным эпитопом или конформационным эпитопом), который связывается анти-CD137 антигенсвязывающими молекулами, включая A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 и/или A549/B167, описанные в табл. 37 в качестве комбинации вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи. Подробное описание примеров методов картирование эпитопа, с которым связывается антигенсвязывающая молекула или антитело, представлены в работе Morris "Epitope Mapping Protocols," in *Methods in Molecular Biology* том 66, 1966, изд-во Humana Press, Тотова, Нью-Джерси). В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела в настоящем описании, обладающие CD137-связывающей активностью, которая зависит от антигенсвязывающей активности, которая в свою очередь зависящей от низкомолекулярного соединения, распознает эпитоп, образованный комплексом, сформированным из антигена (например, CD137) и низкомолекулярного соединения (например, АТФ).

В типичном конкурентном анализе с использованием антитела иммобилизованный CD137 инкубируют в присутствии низкомолекулярного соединения (например, в присутствии 10 микромолей или более, 50 микромолей или более, 100 микромолей или более, 150 микромолей или более, 200 микромолей или более, или 250 микромолей или большего количества низкомолекулярного соединения) в растворе, содержащем первое меченое антитело, связывающееся с CD137 (например, анти-CD137 антитела, включающие A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 и/или A549/B167, описанные в табл. 37, в качестве комбинации вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи), и второе немеченое антитело, которое тестируют на способность конкурировать за связывание с CD137 с первым антителом. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный CD137 инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не второе немеченое антитело. После инкубации в условиях, допускающих связывание первого антитела с CD137, избыток несвязавшегося антитела удаляют и измеряют количество метки, связанной с иммобилизованным CD137. Если количество метки, связанной с иммобилизованным CD137, существенно снижено в тестируемом образце по сравнению с контрольным образцом, это указывает на то, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с CD137. См. публикацию Harlow и Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, глава 14, 1988, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, Нью-Йорк). Специалистам в данной области очевидно, что анализ можно проводить аналогично с исследованием антигенсвязывающих молекул, отличных от антител.

2. Анализы активности

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают анализы для идентификации биологической активности анти-CD137 антигенсвязывающих молекул или антител, обладающих биологической активностью. Биологическая активность может включать, например, агонистическую активность CD137; период полужизни в плазме; противоопухолевую активность; и слабая или подавленная системная реакция в тканях, отличных от опухолей. Также предусматривают антигенсвязывающие молекулы или антитела, обладающие такой биологической активностью *in vivo* и/или *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающая молекула (например, анти-CD137 антигенсвязывающая молекула) или антитело по настоящему изобретению тестируют на такую биологическую активность.

а) Анализ агонистической активности (МКПК)

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агонистическую активность по отношению к CD137 измеряют путем контакта CD137-экспрессирующих клеток с анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой или антителом в растворе, в который добавляют или не добавляют низкомолекулярное соединение. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агонистическую активность по отношению к CD137 в растворе, в который добавлено низкомолекулярное соединение, и агонистическую активность по отношению к CD137 в растворе, в который не добавлено низкомолекулярное соединение, оценивают по количеству цитокина, вырабатываемого (например, количества вырабатываемого IL-2, IFN-γ и/или IL-6), которое измеряют в течение 18 ч, 24 ч, 36 ч, 48 ч или 72 ч после контакта в растворе CD137-экспрессирующих клеток и анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения раствор, в который добавляют низкомолекулярное соединение, регулируют таким образом, чтобы концентрация низкомолекулярного соединения после корректировки составляет 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ или 250 мкМ. В другом варианте осуществления настоящего изобретения используемые клетки, экспрессирующие CD137, представляют собой выделенные мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека или Т-клетки, размноженные из выделенных МКПК человека.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения используют МКПК человека, выделенные из крови здорового донора путем центрифугирования в режиме 400 × g в течение 30 мин при комнатной температуре. Предпочтительно используют МКПК человека, выделенные на последующих двух этапах. На первом этапе Leucosep (Greiner Bio-One), обогащенный Ficoll-Paque PLUS (фирма GE Healthcare), центрифугируют в режиме 1000 × g в течение 1 мин при комнатной температуре, затем кровь разбавляют ФСБ и центрифугируют в режиме 400 × g в течение 30 мин при комнатной температуре. На втором этапе лейкоцитарную пленку из пробирки после центрифугирования собирают и промывают 60 мл ФСБ (фирма Wako).

Подробное описание примера метода измерения CD137 агонистической активности с применением МКПК человека описано ниже. Следует отметить, что даже несмотря на то, что в следующем примере для иллюстрации АТФ используют в качестве низкомолекулярного соединения, это не исключает других низкомолекулярных соединений. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения выделенные МКПК человека разводят до плотности 5×10^6/мл культуральной средой (5% сыворотки человека (фирма SIGMA), 95% AIM-V (фирма Thermo Fischer Scientific)). Затем выделенные МКПК человека контактируют с антителом против CD3ε человека и/или с антителом против CD28 человека, посредством чего экспрессия CD137 индуцируется в МКПК человека. Предпочтительно 50 мкл 0,04 мкг/мл антитела против CD3ε человека (фирма BD Co., клон SP34) и 20 мкг/мл антитела против CD28 человека (фирма BD, клон: CD28.2), разведенные культуральной средой, добавляют к выделенным МКПК человека (100 мкл с плотностью клеток 5×10^6/мл).

К МКПК человека, к которым добавлены антитела против CD3ε человека и или антитела против CD28 человека, затем дополнительно добавляют (i) культуральную среду с или без АТФ; и (ii) анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело. Предпочтительно добавляют 25 мкл питательной среды с АТФ или без него. Предпочтительно добавляют 25 мкл анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела в концентрации 40 мкг/мл. Более предпочтительно, указанные выше (i) и (ii) добавляют примерно через 6 ч после контакта МКПК человека с антителом против CD3ε человека и/или антителом против CD28 человека. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, предпочтительно количество выработанного IL-2 измеряют до выработки количества IFN-γ. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения количество выработки IL-2 измеряют в течение примерно 24 ч после контакта МКПК человека с антителом против CD3ε человека и/или антителом против CD28 человека. Предпочтительно количество выработки IL-2 измеряют примерно через 24 ч после контакта МКПК человека с антителом против CD3ε человека и/или антителом против CD28 человека и примерно через 18 ч после добавления анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения количество выработанного IFN-γ измеряют примерно в течение 48 ч после контакта МКПК человека с антителом против CD3ε человека и/или с антителом против CD28 человека. Предпочтительно количество выработанного IFN-γ измеряют примерно в течение 48 ч после контакта МКПК человека с антителом против CD3ε человека и/или с антителом против CD28 человека и примерно 42 ч после добавления анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения количество выработанного IL-2 и/или количество выработанного IFN-γ определяют путем измерения количества выработанного IL-2 и/или количества выработанного IFN-γ в собранном культуральном супернатанте. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения МКПК человека, добавленные с антителом против CD3ε человека и/или антителом против CD28 человека, оставляют в инкубаторе в атмосфере 5% CO_2 при 37°C пока все измерения не будут завершены.

Подробности еще одного примера метода измерения агонистической активности CD137 с использованием МКПК человека описаны ниже. Выделенный МКПК человека разводят до плотности клеток 5×10^6/мл культуральной средой (5% сыворотки человека (фирма SIGMA), 95% AIM-V (фирма Thermo Fischer Scientific)). Затем плотность МКПК человека доводят до 5×10^6/мл и по 100 мкл высевают в лунки 96-луночного планшета (плоскодонного с крышкой) (фирма Corning). Затем воздействуют на МКПК человека для индукции экспрессии CD137. Например, экспрессию CD137 в МКПК человека индуцируют добавлением 50 мкл антитела против CD3ε человека в концентрации 0,04 мкг/мл (фирма BD Co., клон SP34) и антитела против CD28 человека в концентрации 20 мкг/мл (фирма BD, клон CD28.2), разведенных культуральной средой.

Затем экспрессию CD137 индуцируют в МКПК человека, планшет встряхивают и оставляют на 6 ч при 37°C в инкубаторе в атмосфере 5% CO_2. Затем по 25 мкл 2 мМ АТФ (фирма SIGMA), разведенной в среде, или только среду без АТФ, и 25 мкл каждого антитела в концентрации 40 мкг/мл вносят в каждую лунку, и планшет встряхивают и оставляют на 18 ч при 37°C в инкубаторе в атмосфере 5% CO_2. Затем собирают часть культурального супернатанта, и с его помощью количество IL-2, содержащегося в культуральном супернатанте, количественно определяют с помощью набора для иммуноферментного анализа Human IL-2 DuoSet ELISA (фирма R&D systems) или набора Human IL-2 ELISA Set (фирма BD Biosciences). После сбора культурального супернатанта планшет снова оставляют на 24 ч при 37°С в инкубаторе в атмосфере 5% CO_2. Затем собирают часть культурального супернатанта и IFN-γ, содержащийся в культуральном супернатанте, количественно определяют с использованием набора для иммуноферментного анализа IFN-γ DuoSet ELISA (фирма R&D systems) или набора Human IFN-γ ELISA Development (фирма PeproTech). Метод ELISA в основном применяют в соответствии с протоколом, прилагаемым к набору. При работе с набором Human IL-2 DuoSet ELISA (фирма R&D systems) и набором Human IFN-γ ELISA Development (фирма R&D systems) появление и прекращение окрашивания выполняют в соответствии с протоколом с использованием раствора субстрата (фирма R&D systems), содержащего H_2O_2, тетраметилбензидин и 1н H_2SO_4 (фирма Wako). При работе с набором Human IL-2 ELISA Set (фирма BD Biosciences) прекращение окрашивания выполняют с применением 1н H_2SO_4 (фирма Wako).

При работе с набором IFN-γ ELISA Development (фирма PeproTech) появление окрашивания и прекращение окрашивания проводят с использованием раствора TMB Chromogen Solution (фирма Thermo Fischer Scientific) и 1н H_2SO_4 (фирма Wako). Затем измерение абсорбции выполняют с помощью EnVision (фирма PerkinElmer), и количества (пг/мл) IL-2 и IFN-γ в культуральном супернатанте соответственно рассчитывают с использованием калибровочной кривой, построенной в соответствии с протоколом. В этом анализе МКПК агонистическую активность CD137 может быть выражена как кратное изменение количества IL-2 и IFN-γ в супернатанте культуры по сравнению с отрицательным контрольным антителом (антителом, которое не связывается с CD137). В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агонистическую активность CD137 измеряют в соответствии с методами, описанными в контрольных примерах 5-5-1 и 5-5-2.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения если агонистическую активность в отношении CD137 оценивают по количеству выработанного цитокина (например, по количеству выработанного IL-2, IFN-γ и/или IL-6) в МКПК человека, анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело можно расценить как проявление агонистической активности в отношении CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения, если количество выработанного цитокина в присутствии 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ или 250 мкМ низкомолекулярного соединения при добавлении анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела больше в 1,01 раз или более, в 1,02 раз или более, в 1,03 раз или более, в 1,05 раз или более, в 1,06 раз или более, в 1,07 раз или более, в 1,08 раз или более, в 1,09 раз или более, в 1,1 раза или более, в 1,11 раз или более, в 1,12 раз или более, в 1,13 раз или более, в 1,14 раз или более или в 1,15 раз или более, в 1,5 раза или более, в 2 раза или более, или в 3 раза или более по сравнению с количеством выработанного цитокина при добавлении антитела – отрицательного контроля.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агонистическую активность в отношении CD137 оценивают по количеству выработанного IL-2 в МКПК человека, когда анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело можно оценить как проявляющую агонистическую активность в отношении CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения, если количество вырабатываемого IL-2 в присутствии 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ или 250 мкМ низкомолекулярного соединения, если добавленные анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело больше в 1,01 раза или более, в 1,02 раза или более, в 1,03 раза или более, или в 1,05 раза или более, в 1,05 раза или более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения по сравнению с количеством выработанного IL-2 при добавлении антитела – отрицательного контроля.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, когда агонистическую активность в отношении CD137 оценивают по количеству выработанного IFN-γ в анализе с МКПК человека, анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело можно оценить как проявляющую агонистическую активность в отношении CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения, когда количество вырабатываемого IFN-γ в присутствии 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ или 250 мкМ низкомолекулярного соединения при добавлении анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела больше в 1,1 раза или более, в 1,11 раз или более, в 1,12 раз или более, в 1,13 раз или более, в 1,14 раз или более, в 1,15 раз или более, в 1,15 раз или более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения по сравнению с количеством выработанного IFN-γ при добавлении антитела – отрицательного контроля.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения среди анти-CD137 антигенсвязывающих молекул или антител, для которых установлено, что они проявляют агонистическую активность в отношении CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения в вышеупомянутом сравнении с отрицательным контролем, дополнительно определяют антитела, которые оценивают как не проявляющие агонистической активности в отношении CD137 или обладающие пониженной агонистической активностью CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения (по сравнению с таковой в присутствии низкомолекулярного соединения). В частности, когда указанные ниже (ii) больше, чем (i), анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело оценивают как не проявляющую активности агониста CD137 или имеющую более пониженную активность агониста CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения:

(i) [выработанное количество цитокина в отсутствие низкомолекулярного соединения при добавлении анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела]/[выработанное количество цитокина в отсутствие низкомолекулярного соединения при добавлении антитела – отрицательного контроля]

(ii) [выработанное количество цитокина в присутствии низкомолекулярного соединения при добавлении анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела]/[выработанное количество цитокина в присутствии низкомолекулярного соединения при добавлении антитела – отрицательного контроля].

В другом варианте осуществления настоящего изобретения когда агонистическая активность CD137 первой антигенсвязывающей молекулы или антитела против CD137 и второй антигенсвязывающей молекулы или антитела против CD137 сравнивают, используя количества выработанных цитокинов (например, количества IL-2, IFN-γ , и/или продуцирование IL-6) в анализе МКПК человека, первая антигенсвязывающая молекула или антитело против CD137 могут быть оценена как обладающие более высокой агонистической активностью, чем вторая антигенсвязывающая молекула или антитело против CD137, если (i) количество выработанных цитокинов при добавлении первой антигенсвязывающей молекулы или антитела против CD137 в присутствии 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ или 250 мкМ низкомолекулярного соединения больше в 1,01 раза или более, в 1,02 раза или более, в 1,03 раза или более, в 1,04 раз или более, в 1,05 раз или более, в 1,06 раз или более, в 1,07 раз или более, в 1,08 раза или более, в 1,09 раза или более, в 1,1 раз или более, в 1,11 раз или более, в 1,12 раз или более, в 1,13 раз или более, в 1,14 раз или более или в 1,15 раз или более, 1,5 раза или более, в 2 раза или более или в 3 раза или более по сравнению с (ii) количеством выработанных цитокинов при добавлении второй антигенсвязывающей молекулы или антитела против CD137 в тех же условиях.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения если агонистическую активность в отношении CD137 оценивают по количеству выработанного IL-2 в анализе МКПК человека, первая антигенсвязывающая молекула или антитело против CD137 может быть оценена как имеющая более высокую агонистическую активность, чем вторая антигенсвязывающая анти-CD137 молекула или антитело, если (i) количество выработки цитокинов при добавлении первой антигенсвязывающей молекулы или антитела к CD137 в присутствии 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ или 250 мкМ низкомолекулярного соединения больше в 1, 01 раза или более, в 1,02 раза или более, в 1,03 раза или более или в 1,04 раза или более, или в 1,04 раза или более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения по сравнению с (ii) количеством вырабатываемого IL-2 при добавлении второй антигенсвязывающей молекулы или антитела против CD137 в тех же условиях.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения если агонистическую активность в отношении CD137 оценивают по количеству выработки IFN-γ в анализе МКПК человека, первая антигенсвязывающая молекула или антитело против CD137 может быть оценена как имеющая более высокую агонистическую активность, чем вторая антигенсвязывающая анти-CD137 молекула или антитело, если (i) количество выработанных цитокинов при добавлении первой антигенсвязывающей молекулы или антитела против CD137 в присутствии 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ или 250 мкМ низкомолекулярного соединения больше в 1,05 раза или более, в 1,06 раза или более, в 1,07 раза или более, в 1,08 раза или более, в 1,09 раза или более или в 1,1 раза или более или в 1,1 раза или более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения по сравнению с (ii) добавлением второй антигенсвязывающей молекулы или антитела против CD137 в тех же условиях. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения первая антигенсвязывающая молекула или антитело против CD137 представляет собой антигенсвязывающую молекулу или антитело, содержащее исходную Fc-область, а вторая антигенсвязывающая молекула анти-CD137 представляет собой антигенсвязывающую молекулу или антитело, содержащее вариант Fc-области.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения метод, описанный в примерах 5-5-1 и 5-5-2, может использоваться для измерения агонистической активности CD137 с использованием МКПК человека, а метод, описанный в примере 2-6, может использоваться для измерения агонистической активности CD137 с использованием T-клеток, размноженных из выделенных МКПК человека.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агонистическая активность в отношении CD137 может быть измерена путем контактирования CD8-положительных или CD4-положительных T-клеток, выделенных из МКПК человека, с антигенсвязывающей молекулой или антителом против CD137 в растворе, в который добавлено или не добавлено низкомолекулярное соединение. В это время к раствору могут быть дополнительно добавлены клетки, экспрессирующие FcγRIIb. В другом варианте агонистическая активность в отношении CD137 может быть измерена путем контактирования B-клеток (которые могут быть выделены из МКПК человека или может использоваться известная линия B-клеток) с анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой или антителом. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агонистическая активность в отношении CD137 может быть оценена по количеству выработанных цитокинов (например, по количеству IL-2, IFN-γ и/или по количеству выработанного IL-6), которое измеряют после контакта в растворе CD8-положительных T-клеток, CD4-положительных T-клеток или B-клеток с анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой или антителом.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анализы агонистической активности с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК) выделяют из крови, взятой у здоровых индивидов. Таким образом, в любом из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения специалистам в данной области должно быть понятно, что результаты анализов с использованием анализов могут различаться для каждого донора образцов крови. Принимая во внимание это обстоятельство, антитела, агонистическая активность которых не проявляется в отношении части или большинства МКПК человека, выделенных от нескольких доноров, не могут считаться проявляющими агонистическую активность CD137, даже если критерии агонистической активности удовлетворяются у другой части МКПК человека. Кроме того, когда анализ в соответствии с описанным выше методом проводят на МКПК человека, выделенных от многих доноров, и критерии агонистической активности CD137 у большинства доноров соответствуют, можно сделать вывод, что проявляется агонистическая активность CD137. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, когда анализ в соответствии с описанным выше методом проводят на МКПК человека, выделенных от многих доноров, среднее или медианное значение анализа (например, количества IL-2, IFN-γ, и/или IL-6) может использоваться для определения наличия или отсутствия агонистической активности CD137. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения когда анализ проводят согласно вышеуказанному методу на МКПК человека, выделенных от множества доноров, количество доноров составляет, например, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 10 или более, 15 или более, или 20 или более.

б) Анализ агонистической активности (анализ репортерного гена)

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агонистическую активность по отношению к CD137 оценивают с помощью анализа репортерного гена в растворе, в который добавляют или не добавляют низкомолекулярное соединение. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агонистическую активность по отношению к CD137 в растворе, в который добавлено низкомолекулярное соединение, и агонистическую активность по отношению к CD137 в растворе, в который не добавлено низкомолекулярное соединение, соответственно оценивают по сигналу люминесценции люциферазы, измеренному после контакта Т-клеток, экспрессирующих репортерную конструкцию NF-каппаB-люциферазы и CD137 с антигенсвязывающей молекулой против CD137, и оставляют на определенное время в соответствующем растворе. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения раствор, в который добавляют низкомолекулярное соединение, регулируют таким образом, чтобы концентрация низкомолекулярного соединения после корректировки составляла 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ или 250 мкМ. Т-клетки, экспрессирующие репортерную конструкцию NF-kappaB-luciferase и CD137, предпочтительно являются клетками линии GloResponse™ NF-kappaB-Luc2/4-1BB Jurkat (фирма Promega, CS196004).

Подробности типичного метода измерения агонистической активности CD137 с использованием анализа репортерного гена описаны ниже. В приводимых ниже примерах АТФ используют в качестве примера низкомолекулярного соединения, но не исключаются и другие низкомолекулярные соединения. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения сначала концентрацию FcγRIIB-экспрессирующих клеток доводят до 5×10^4/мл средой (культуральная среда CHO (90% Ham's F12, 10 % ФСБ)), и оставляют на ночь при 37°C в инкубаторе в атмосфере 5% CO_2. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения в качестве клеток, экспрессирующих FcgRIIB, можно использовать не только клетки, усиленно экспрессирующие FcgRIIB, но также клеточные линии, которые эндогенно экспрессируют FcgRIIB, такие как линии B-клеток, B-клетки, выделенные из живого организма, и т.п. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения FcγRIIB-экспрессирующими клетками являются клетки FcγRIIB CHO-K1 (фирма Promega). Затем, после удаления среды аспирацией, концентрацию клеток линии GloResponseTM NF-kappaB-Luc2/4-1BB Jurkat (далее «4-1BB Jurkat») доводят до 2×10^6/мл другой средой (99% RPMI, 1% ФСБ). В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения на 200 мкл скорректированных средой FcγRIIB-экспрессирующих клеток добавляют 25 мкл GloResponse™ NF-kappaB-Luc2/4-1BB клеток линии Jurka, скорректированных средой. Затем по 25 мкл каждой антигенсвязывающей молекулы против CD137 разбавляют вышеупомянутой средой (99% RPMI, 1% ФСБ) до достижения желаемой концентрации (например, конечной концентрации 0, 0,001, 0,01, 0, 1, 1, 10 мкг/мл), а затем добавляют по 25 мкл раствора АТФ, разбавленного вышеупомянутой средой (99% RPMI, 1% ФСБ), чтобы получить желаемую концентрацию (например, конечная концентрация равна 0, 10, 50, 100, 150, 200, 250 мкМ). В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения сигнал люминесценции люциферазы измеряют после пребывания в течение 2 ч или менее, 4 ч или менее, 6 ч или менее, 24 ч или менее после добавления анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы к клеткам

4-1BB Jurkat. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения 4-1BB Jurkat выдерживают при 37°C в течение 6 ч в инкубаторе в атмосфере 5% CO_2. После этого добавляют 75 мкл реагента Bio-Glo и измеряют люминесценцию с помощью планшетного ридера. В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения реагентом Bio-Glo является Bio-Glo Luciferase Assay System (буфер и субстрат). В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения чтобы поддерживать постоянную температуру во время реакции клетки 4-1BB Jurkat можно оставить при комнатной температуре в течение 5 мин, 10 мин, 15 мин или 20 мин после извлечения из инкубатора. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения 4-1BB Jurkat оставляют при комнатной температуре в течение 15 мин после извлечения из инкубатора. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения значение люминесценции клеток 4-1BB Jurkat, к которым добавлена антигенсвязывающая молекула против CD137, делят на значение люминесценции клеток 4-1BB Jurkat, к которым не была добавлена антигенсвязывающая молекула против CD137, и это значение принимают за показатель кратности индукции (относительная световая единица) и используют в качестве показателя для оценки агонистической активности CD137 каждой антигенсвязывающей молекулы.

Еще один пример способа измерения агонистической активности CD137 с использованием анализа репортерного гена описан ниже. В каждую лунку 96-луночного планшета добавляют 200 мкл клеток FcγRIIB CHO-K1 (фирма Promega), доведенных добавлением среды до концентрации 5×10^4/мл и оставляют на ночь при 37°C в инкубаторе в атмосфере 5% CO_2. В качестве культуральной среды применяют среду CHO (90% Ham's F12, 10% ФСБ). Затем среду полностью удаляют отсасыванием, 25 мкл GloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB клеток линии Jurkat с откорректированной концентрацией 2×10^6/мл в среде для анализа (99% RPMI, 1% ФСБ) добавляют в каждую лунку. Затем добавляют по 25 мкл каждого раствора антигена, разбавленного средой для анализа до конечной концентрации 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 или 10 мкг/мл, и, в итоге добавляют 25 мкл раствора АТФ, разбавленного средой для анализа до 0 или 250 мкМ. После того, как планшет оставляют на 6 ч при 37°C в инкубаторе с 5% CO_2 в атмосфере, его оставляют при комнатной температуре на 15 мин и затем добавляют по 75 мкл реагента Bio-Glo в каждую лунку. В качестве реагента Bio-

Glo, например, можно использовать систему анализа люциферазы Bio-Glo Luciferase Assay System (буфер и субстрат). После этого люминесценцию в каждой лунке измеряют с помощью планшет-ридера. Показатель, полученный делением значения люминесценции в каждой лунке на значение люминесценции в лунке, в которую не добавлено какое-либо антитело, определяют как показатель кратности индукции. В анализе репортерного гена агонистическая активность CD137 может быть оценена по кратному изменению (как относительная световая единица) люминесценции в лунках с каждым добавленным антителом, по сравнению с количеством люминесценции в лунках, в которые не было добавлено каких-либо антител.

Еще один пример способа измерения агонистической активности CD137 с использованием анализа репортерного гена описан ниже. В каждую лунку 384-луночного планшета добавляют 10 мкл клеток FcγRIIB CHO-K1 (фирма Promega), доведенных до концентрации 2 × 10^6/мл с помощью среды для анализа (99% RPMI, 1% ФСБ). Затем в каждую лунку добавляют 10 мкл раствора антитела, содержащего АДФ, или раствора антитела, содержащего АТФ, или раствора антитела, не содержащего АТФ или АДФ. После этого в каждую лунку добавляют 10 мкл линии клеток GloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat, доведенной до 2 × 10^6/мл с помощью среды для анализа (99% RPMI, 1% ФСБ). Конечная концентрация АДФ составляет 50 мкМ и конечная концентрация АТФ составляет 50 мкМ. После того, как планшет оставляют при 37°C в течение 6 ч в инкубаторе с 5% CO_2 в атмосфере, его оставляют при комнатной температуре на 15 мин, и в каждую лунку добавляют 30 мкл реагента Bio-Glo. В качестве реагента Bio-Glo используют систему анализа люциферазы Bio-Glo (буфер и субстрат). После этого люминесценцию в каждой лунке измеряют с помощью планшет-ридера. Агонистическая активность CD137 может быть оценена как относительная световая единица (также оценку называют кратностью люминесценции или кратным изменением) люминесценции в лунках с каждым добавленным антителом, по сравнению с количеством люминесценции в лунках, в которые не было добавлено каких-либо антител.

Другой пример метода измерения агонистической активности в отношении CD137 с использованием анализа репортерного гена приведен ниже. В каждую лунку 384-луночного планшета добавляют 10 мкл клеток FcγRIIB CHO-K1 (фирма Promega), доведенных до концентрации 4 × 10^5/мл с помощью среды для анализа (99% RPMI, 1% ФСБ). Затем в каждую лунку добавляют 10 мкл раствора антитела, содержащего АДФ, или раствора антитела, содержащего АТФ, или раствора антитела, не содержащего АТФ или АДФ. После этого в каждую лунку добавляют 10 мкл линии клеток GloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat, доведенной до 2×10^6/мл с помощью среды для анализа (99% RPMI, 1% ФСБ). Конечная концентрация АДФ составляет 10 мкМ и конечная концентрация АТФ составляет 10 мкМ. После того, как планшет оставляют при 37°C в течение 6 ч в инкубаторе с 5% CO_2 в атмосфере, его оставляют при комнатной температуре на 15 мин, и в каждую лунку добавляют 30 мкл реагента Bio-Glo. В качестве реагента Bio-Glo используют систему анализа люциферазы Bio-Glo Luciferase Assay System (буфер и субстрат). После этого люминесценцию в каждой лунке измеряют с помощью планшет-ридера. Агонистическая активность CD137 может быть оценена как относительная световая единица (также оценку называют кратностью люминесценции или кратным изменением) люминесценции в лунках с каждым добавленным антителом, по сравнению с количеством люминесценции в лунках, в которые не было добавлено каких-либо антител.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения когда агонистическую активность в отношении CD137 измеряют с использованием анализа репортерного гена, антигенсвязывающая молекула или антитело против CD137 может быть оценена как проявляющая агонистическую активность в отношении CD137 в присутствии низкомолекулярного соединения, если (i) агонистическая активность в отношении CD137 (относительная световая единица) в присутствии 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ или 250 мкМ низкомолекулярного соединения больше в 1,1 раза или более, в 1,2 раза или более, в 1,3 раза или более, в 1,5 раз или более, в 2 раза или более, в 3 раза или более, в 5 раз или более, в 10 раз или более, в 20 раз или более, в 30 раз или более, в 50 раз или более, в 60 раз или более, в 70 раз или более, в 80 раз или более или в 90 раз или более по сравнению с (ii) агонистической активностью CD137 (относительная световая единица) в отсутствие низкомолекулярного соединения. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения итоговая концентрация антитела в (i) и (ii), указанная выше, составляет 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 или 10 мкг/мл, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения она составляет 0,1 мкг/мл или 1 мкг/мл.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения если анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело добавлены в определенной концентрации (например, при конечной концентрации 0,001, 0,01, 0,1, 1 или 10 мкг/мл, или 0,1 мкг/мл или 1 мкг/мл), антигенсвязывающую молекулу или антитело против CD137 оценивают как по существу не проявляющую агонистической активности против CD137 в отсутствие низкомолекулярного соединения, если индукция кратности (относительная световая единица) в отсутствие низкомолекулярного соединения составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, или 5 или менее в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, и существенно 1 в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения «кратность индукции (относительная световая единица) в отсутствие низкомолекулярного соединения по существу равна 1» означает те случаи, когда кратная индукция (относительная световая единица) в отсутствие низкомолекулярного соединения составляет менее 2 раз, менее 1, 9 раз, менее 1,8 раз, менее 1,7 раз, менее 1,6 раз, менее 1,5 раз, менее 1,4 раз, менее 1,3 раз, менее 1,2 раз или менее 1,1 раза.

в) Концентрация в плазме

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения кинетику в крови анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела по настоящему изобретению измеряют и/или сравнивают с использованием мышей с нокином CD137 человека. Мышь с нокином CD137 человека получают, например, путем замены гена CD137 мыши геном CD137 человека путем введения вектора замены с геном CD137 человека в эмбриональные стволовые клетки мыши (ES-клетки). В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающую молекулу или антитело CD137 по настоящему изобретению вводят путем однократного внутривенного введения мышам с нокином CD137 человека, и кровь собирают несколько раз с течением времени, начиная сразу после введения до примерно 5 дней, 10 дней, 15 дней, 20 дней, 25 дней или 30 дней после введения. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающую молекулу или антитело против CD137 по настоящему изобретению вводят путем однократного внутривенного введения мышам с нокином CD137 человека, кровь собирают несколько раз в течение периода времени от 5 мин до 28 дней после введения. Плазму быстро отделяют от собранной крови, и концентрацию антител в плазме измеряют электрохемилюминесценцией (ECL). В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения концентрацию антитела в плазме можно измерить способом, описанным в контрольном примере 6-3-2.

При измерении периода полужизни в плазме с использованием мыши с нокином CD137 человека, если анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело исчезает из плазмы медленнее, чем контрольная молекула, анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело оценивают как имеющее улучшенную кинетику в крови, чем у контрольной молекулы. Кроме того, если анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело, имеющие связывающую активность, зависящую от низкомолекулярного соединения (переключаемая молекула или переключаемое антитело), исчезает из плазмы медленнее, чем анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело, не зависящие от низкомолекулярного соединения (непереключаемая молекула или непереключаемое антитело), можно прийти к заключению, что переключаемая молекула (или переключаемое антитело) не связывается с CD137, экспрессируемым в неопухолевой ткани, по сравнению с непереключаемой молекулой (непереключаемым антителом).

г) Противоопухолевая активность

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело тестируют по способности ингибировать рост или пролиферацию клеток *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула или антитело тестируют по способности ингибировать рост опухоли *in vivo*. Системы моделей *in vivo*, такие как модели аллотрансплантата или модели ксенотрансплантата, могут использоваться для такого тестирования. В примере системы ксенотрансплантата опухолевые клетки человека вводят животному (не человеку) с соответствующим иммунодефицитом, например, бестимусной «голой» мыши. Антитело по настоящему изобретению вводят животному. Измеряют способность антитела ингибировать или уменьшать рост опухоли. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в указанной выше системе ксенотрансплантата опухолевые клетки человека представляют собой опухолевые клетки пациента-человека. Такие модели ксенотрансплантатов коммерчески доступны от фирмы Oncotest GmbH (Фрейбург, Германия). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения опухолевые клетки человека вводят животному (но не человеку) с соответствующим иммунодефицитом путем подкожной инъекции или трансплантации в подходящее место, такое как жировая прослойка молочной железы.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения противоопухолевая активность анти-CD137 антигенсвязывающих молекул или антител по настоящему изобретению может быть измерена и/или сопоставлена с использованием модели трансплантата сингенных опухолевых клеток, основанной на вышеописанных мышах с нокином CD137 человека. Подходящим образом может быть выбрана линия раковых клеток для использования в тесте, предпочтительно линия клеток рака толстой кишки мыши MC38. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения клеточную линия MC38 трансплантируют под кожу в брюшную область мыши, и модель считают сформированной, когда объем опухоли достигает примерно 50-300 мм^3. После формирования модели мышей с трансплантированными клетками MC38 распределяют по группам и затем им вводят анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения измерение объема опухоли проводят с частотой от одного до двух раз в неделю, чтобы оценить противоопухолевую активность. Объем опухоли рассчитывают с использованием следующего уравнения: объем опухоли = (большая ось × малая ось × малая ось)/2. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения противоопухолевую активность анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела может быть протестирована и оценена в соответствии с методом, описанным в примере 6-4.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела распознают как проявляющие противоопухолевую активность, когда объем опухоли в группе введения животным анти-CD137 антигенсвязывающих молекул или антител меньше, чем в группе введения животным растворителя, или увеличение объема опухоли меньше в группе введения животным анти-CD137 антигенсвязывающих молекул или антител меньше, чем в группе введения животным растворителя.

<u>д) Системная реакция</u>

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения системная реакция на анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела по настоящему изобретению измеряют и/или сравнивают с использованием модели трансплантата сингенных опухолевых клеток на основе описанных выше мышей с нокином CD137 человека. Органы для измерения системной реакции могут быть выбраны соответствующим образом, это могут быть печень, селезенка и/или лимфатические узлы. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения системную реакцию оценивают путем удаления печени, селезенки и/или лимфатических узлов у мышей с нокином CD137 человека в соответствующее время после введения анти-CD137 антигенсвязывающих молекул или антител. В случае, если подлежащим удалению органом является селезенка и/или лимфатические узлы, этот орган взвешивают и/или подсчитывают клетки во фракции лимфоцитов. При подсчете предпочтительно фракцию лимфоцитов после гемолиза используют для селезенки, а фракция лимфоцитов, полученная путем гомогенизации, используется для лимфатических узлов. В случае, если подлежащим удалению органом является печень, подсчитываю клетки во фракции лимфоцитов, полученные с помощью набора Liver dissociation kit, mouse (фирма Milteny Biotec). Кроме того, анализ Т-клеток с использованием жидкостной цитометрии (FCM, flowcytometry) можно проводить на фракции лимфоцитов из каждого органа (печени, селезенки и/или лимфатических узлов). В анализе FCM используют экспрессию гранзима B, или экспрессию PD-1, или экспрессию ICOS в CD8-альфа-положительных Т-клетках или соотношение CD8-альфа-положительных Т-клеток к CD45 положительным клеткам. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения системная реакция на анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела может быть протестирована и оценена в соответствии с методом, описанным в примере 6-4.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела распознают как вызывающие подавленную системную реакцию и/или подавленную активацию иммунных клеток в неопухолевых тканях (например, печени, селезенке и/или лимфатических узлах) по сравнению с контрольной молекулой, когда в группе, в которой мышам вводили анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела, отмечают более низкое значение при оценке вышеописанных различных показателей по сравнению с группой, в которой мышам вводили такое же количество контрольной молекулы. Кроме того, если группа, получающая введение анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела, обладающего связывающей активностью, зависящей от низкомолекулярного соединения (переключаемой молекулы или переключаемого антитела), показывает пониженное значение при оценке вышеописанных различных показателей, чем что для группы, в которой мышам вводили анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела, которое не обладает связывающей активностью, зависящей от низкомолекулярного соединения (непереключаемая молекула или непереключаемое антитело), переключаемая молекула (или переключаемое антитело) распознаются как вызывающие подавленную системную реакцию и/или подавленную активацию иммунных клеток в неопухолевых тканях (например, в печени, селезенке и/или лимфатических узлах) по сравнению с непереключаемой молекулой (или непереключаемым антителом).

Следует принять во внимание, что любой из описанных выше способов измерения может быть проведен с использованием иммуноконъюгатов по настоящему изобретению вместо или в дополнение к анти-CD137 антигенсвязывающим молекулам или антителам.

Г. Иммуноконъюгаты

В настоящем изобретении также предусматривают иммуноконъюгаты, содержащие анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела, конъюгированные с одним или несколькими цитотоксическими агентами, такими как химиотерапевтические агенты или лекарственные препараты, агенты, ингибирующие рост, токсины (например, белковые токсины, ферментативно активные токсины бактерий, а также грибкового, растительного или животного происхождения, или их фрагменты) или радиоактивные изотопы.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения иммуноконъюгат представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC, antibody-drug conjugate), где антитело конъюгировано с одним или несколькими лекарственными средствами, включая, но ими не ограничиваясь, майтансиноид (см. US 5208020, US 5416064, EP 0 425 235 B1); ауристатин, такой как лекарственные части монометилауристатина DE и DF (MMAE и MMAF) (см. US 5635483, US 5780588, US 7498298); доластатин; калихеамицин или его производное (см. US 5712374, US 5714586, US 5739116, US 5767285, US 5770701, US 5770710, US 5773001, US 5877296; Hinman с соавт., *Cancer Res.*

1993, 53:3336-3342; Lode с соавт., *Cancer Res.* 1998, 58:2925-2928); антрациклин, такой как дауномицин или доксорубицин (см. Kratz с соавт., *Current Med. Chem.* 2006, 13:477-523; Jeffrey с соавт., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 2006, 16_358-362; Torgov с соавт., *Bioconj. Chem.* 2005, 16:717-721; Nagy с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97:829-834; Dubowchik с соавт., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 2002, 12:1529-1532; King с соавт., *J. Med. Chem.* 2002, 45:4336-4343; US 6630579); метотрексат; виндезин; таксан, такой как доцетаксел, паклитаксел, ларотаксел, тезетаксел и ортатаксел; трихотецин; CC1065.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения иммуноконъюгат включает антитело, как описано в настоявшем изобретении, конъюгированное с ферментативно активным токсином или его фрагментом, включая, помимо прочего, цепь А дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь экзотоксина А (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь рицина А, цепь абрина А , цепь А модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор момордика харантии, курцин, кротин, ингибитор *Saponaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецины.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения иммуноконъюгат включает антитело, как описано в настоявшем изобретении, конъюгированное с радиоактивным атомом для формирования радиоактивного иммуноконъюгата. Для получения радиоконъюгатов доступны различные радиоактивные изотопы. Примерами являются ^{211}At, ^{131}I, ^{125}I, ^{90}Y, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{212}Bi, ^{32}P, ^{212}Pb и радиоактивные эпитопы Lu. Когда радиоконъюгат используют для обнаружения, он может содержать радиоактивный атом для сцинтиграфических исследований, например Tc-99m или ^{123}I, или спиновую метку для визуализации методом ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) (также известного как магнитно-резонансная томография, МРТ), например, йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Конъюгаты антитела и цитотоксического агента могут быть получены с использованием различных бифункциональных белковых связывающих агентов, таких как N-сукцинимидил-3- (2-пиридилдитио) пропионат (SPDP), сукцинимидил-4- (N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2, 4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин можно получить, как описано в публикации Vitetta с соавт., *Science* 1987, 238:1098. Меченая углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является типичным хелатирующим агентом для конъюгации радионуклида с антителом. См. WO94/11026. Линкер может быть «расщепляемым линкером», способствующим высвобождению цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, можно использовать кислотолабильный линкер, чувствительный к пептидазе линкер, фотолабильный линкер, диметиловый линкер или дисульфидсодержащий линкер (Chari с соавт., *Cancer Res.* 1992, 52:127-131; US 5208020).

Иммуноконъюгаты или ADC в настоящем изобретении явно предполагают, но не ограничиваются ими, такие конъюгаты, как полученные с помощью перекрестно-линкерных реагентов, включая, но ими не ограничиваясь, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB, а также SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), которые являются коммерческими доступными (например, от фирмы Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Иллинойс, США).

E. Способы и композиции для диагностики и обнаружения

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения любые из предусмотренных в настоящем изобретении анти-CD137 антигенсвязывающих молекул или антител применимы для обнаружения присутствия анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы в биологическом образце. В настоящем изобретении термин «обнаружение» означает количественное или качественное обнаружение. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения биологический образец включает клетку или ткань.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело предусматривают для применения в способе диагностики и обнаружения. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают метод обнаружения CD137 в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ включает приведение биологического образца в контакт с анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой или антителом, как описано в настоящем изобретении, в условиях, допускающих связывание анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела с CD137, и выявление того, образуется ли комплекс между анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой или антителом с CD137. Такой метод может быть методом *in vitro* или *in vivo*. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающую молекулу или антитело против CD137 используют для отбора субъектов, пригодных для терапии анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой или антителом, например, если CD137 является биомаркером для отбора пациентов.

К типичным расстройствам, которые можно диагностировать с использованием антитела по настоящему изобретению, относят рак.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают меченые анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела. К меткам относят, но ими перечень не ограничивается, метки или фрагменты, которые обнаруживают напрямую (такие как флуоресцентные, хромофорные, электронно-плотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), а также фрагменты, такие как ферменты или лиганды, которые обнаруживают опосредованно, например, через ферментативную реакцию или молекулярное взаимодействие. К примерам меток относят, но ими перечень не ограничивается, радиоизотопы ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H и ^{131}I, флуорофоры, например, такие как хелаты редкоземельных элементов или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон, люцериферазы, например, люцифераза светлячков и бактериальная люцифераза (US 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофталазиндионы, пероксидаза хрена (HRP), щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, глюкоамилаза, лизоцим, сахаридоксидазы, например, глюкозооксидаза, галактозооксидаза и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, гетероциклические оксидазы, такие как уриказа и ксантиноксидаза, соединенные с ферментом, который использует перекись водорода для окисления предшественника красителя, такого как HRP, лактопероксидаза или микропероксидаза, биотин/авидин, спиновые метки, бактериофаговые метки, стабильные свободные радикалы и др.

E. Фармацевтические составы

Фармацевтические составы анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела по настоящему изобретению получают путем смешивания такого антитела, имеющего желаемую степень чистоты, с одним или более необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16е изд., под ред. Osol A., 1980) в виде лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители обычно нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают, но ими не ограничиваются: буферы, такие как фосфатный, цитратный и других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные полипептиды (менее примерно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG). Примерами фармацевтически приемлемых носителей в настоящем изобретении также являются интерстициальные агенты для диспергирования лекарственных средств, такие как растворимые нейтрально-активные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20 человека, такие как rHuPH20 (HYLENEX (зарегистрированная торговая марка), Baxter International, Inc.). Некоторые примеры sHASEGP и способы их использования, включая rHuPH20, описаны в публикациях патентов US №2005/0260186 и US №2006/0104968. В одном из вариантов осуществления sHASEGP комбинируют с одной или несколькими дополнительными гликозаминогликаназами, такими как хондроитиназы.

Примеры составов лиофилизированных антител описаны в US 6267958. Водные составы антител включают те, которые описаны в US 6171586 и WO2006/044908, причем последние составы включают гистидин-ацетатный буфер.

Активные ингредиенты могут быть заключены в микрокапсулы, приготовленные, например, методами коацервации или межфазной полимеризацией, например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулы из поли(метилметакрилата), соответственно, в коллоидных системах доставки лекарств (например, липосомы, микросферы альбумина, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсиях. Такие методы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16е изд., под ред. Osol A., 1980.

Могут быть получены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, причем эти матрицы имеют форму изделий определенной формы, например пленок или микрокапсул.

Составы, используемые для введения *in vivo*, обычно стерильны. Стерильность может быть легко достигнута, например, путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

<u>Ж. Способы терапии и лечебные композиции</u>

Любая из антигенсвязывающих молекул или антител против CD137, представленных в настоящем изобретении, может использоваться в терапевтических способах.

В одном из объектов настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела для использования в качестве лекарственного средства. В настоящем изобретении примеры лекарственного средства, в частности, включают лекарственные средства для индукции противоопухолевого действия, например, ингибирования неоваскуляризации в опухолях, ингибирование пролиферации опухолевых клеток, истощение опухолевых В-клеток и т.д., посредством активации клеток, возникающих в результате связывания анти-CD137 антигенсвязывающих молекул или антител с CD137, экспрессируемым на иммунных клетках, таких как Т-клетки. В других вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела для применения в лечении опухолей. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают некоторые анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела для применения в методе лечения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают некоторые анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела для применения в методе лечения больного раком индивида, включающем введение индивиду эффективного количества анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела. В других вариантах осуществления настоящего изобретения примеры опухоли включают солидную опухоль, в которую проникли В-клетки, дендритные клетки, естественные клетки-киллеры, макрофаги, CD8-положительные Т-клетки и/или регуляторные Т-клетки (Treg-клетки).

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела для применения в методе активации иммунных клеток у индивида, включающем введение индивиду эффективного количества анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела для активации иммунных клеток, таких как В-клетки, дендритные клетки, естественные клетки-киллеры, макрофаги и/или CD8-положительные Т-клетки (более конкретно, эти иммунные клетки, проникшие в опухолевую ткань).

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела для применения в методе повреждения клеток (например, опухолевых клеток) у индивида, включающем введение индивиду эффективного количества анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения примеры опухолей включают солидную опухоль, в которую проникли В-клетки, дендритные клетки, природные клетки-киллеры, макрофаги, CD8-положительные Т-клетки и/или регуляторные Т-клетки (Treg-клетки). В любом из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения «индивидом» предпочтительно является человек.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают применение анти-CD137 антигенсвязывающих молекул или антител для получения лекарственного средства. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения лекарство предназначено для лечения опухоли (в зависимости от контекста может быть более подходящим называть это «раком» (то же самое применимо и в дальнейшем)). В других вариантах осуществления настоящего изобретения лекарственное средство предназначено для использования в способе лечения опухоли (или рака в зависимости от контекста), причем способ включает введение индивиду с опухолью (или раком в зависимости от контекста), эффективного количества лекарственного средства. В других вариантах осуществления настоящего изобретения лекарство предназначено для индукции противоопухолевого действия, например, ингибирования неоваскуляризации в опухолях, ингибирования пролиферации опухолевых клеток, для истощения опухолевых В-клеток и т.д., посредством активации клеток, возникающих в результате связывания анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела с CD137, экспрессируемым на иммунных клетках, таких как Т-клетки. В других вариантах осуществления настоящего изобретения лекарство предназначено для использования в способе, например, ингибирования неоваскуляризации в опухолях, ингибирования пролиферации опухолевых клеток, истощения опухолевых В-клеток и т.д. посредством активации клеток в результате связывания анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела с CD137, экспрессируемым на иммунных клетках, таких как Т-клетки, у индивида, причем способ включает введение для этого индивиду эффективного количества лекарственного средства. В любом из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения «индивидом» предпочтительно является человек.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают способ лечения рака. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способы включают введение индивиду с опухолью эффективного количества анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела. В других вариантах осуществления настоящего изобретения примеры опухоли включают солидную опухоль, в которую инфильтруются В-клетки, дендритные клетки, природные клетки-киллеры, макрофаги, CD8-положительные Т-клетки и/или регуляторные Т-клетки (Treg-клетки).

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают методы активации иммунных клеток у индивида. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ включает введение индивиду эффективного количества анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела. В других вариантах осуществления настоящего изобретения к иммунным клеткам относят такие иммунные клетки, как B-клетки, дендритные клетки, природные клетки-киллеры, макрофаги и/или CD8-положительные T-клетки (более конкретно, эти иммунные клетки, проникшие в опухолевую ткань). В этом способе, когда уровень экспрессии по меньшей мере одного гена, выбранного из CD8b1, Gzmb, Prf1 и Ifng, повышается в опухолевой ткани, можно судить об усилении активации T-клеток в опухолевой ткани.

В еще одном объекте настоящего изобретения предусматривают способ активации или стимуляции пролиферации иммунных клеток, в частности $CD8^+$ T-клеток, в опухолевой ткани индивидуума. В одном варианте осуществления настоящего изобретения такие способы включают способ, в котором вводят индивиду эффективное количество анти-CD137антигенсвязывающей молекулы или антитела. В способе активации $CD8^+$ T-клеток, когда наблюдается увеличение положительной доли по крайней мере одного маркера активации $CD8^+$ T-клеток, выбранного из тетрамера OVA, гранзима B, PD-1, DLRG-1 и ICOS (положительная доля (%) = количество $CD8^+$ T-клеток, положительных по маркеру активации в опухолевой ткани/количество $CD8^+$ T-клеток в опухолевой ткани X 100), можно судить, что $CD8^+$ T-клетки в опухолевой ткани активированы.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают способы повреждения клеток (в частности, опухолевых клеток) у индивида. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают способы, которые включают введение индивиду эффективного количества анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения примеры опухоли включают солидную опухоль, в которую инфильтруются B-клетки, дендритные клетки, природные клетки-киллеры, макрофаги, CD8-положительные T-клетки и/или регуляторные T-клетки (Treg-клетки). В любом из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения «индивидом» может быть человек.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения индивид представляет собой пациента с раковыми клетками или опухолевой тканью, содержащей раковые клетки. Предпочтительные типы рака в настоящем изобретении включают, например, рак желудка, рак головы и шеи, рак пищевода, колоректальный рак, рак легких, мезотелиому, рак печени, рак яичников, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак почки, рак кожи, рак мышц, опухоль, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак семенников, рак матки, холангиокарциному, карциному из клеток Меркеля, рак мочевого пузыря, рак щитовидной железы, шванному, рак надпочечников, рак анального канала, опухоль центральной нервной системы, опухоль нейроэндокринной ткани, рак полового члена, опухоль плевры, слюнные железы опухоль железы, рак вульвы, тимому, лимфому, миелоидный лейкоз, детский рак (опухоль Вильмса, нейробластому, саркому, гепатобластому и опухоль зародышевых клеток), но перечень ими не ограничивается. Более предпочтительные типы рака включают рак желудка, колоректальный рак, рак легких, мезотелиому, рак печени, рак молочной железы, рак кожи, лимфому и миелоидный лейкоз, но перечень ими не ограничивается (*Tumori*, 2012, 98:478-484; *Tumor Biol.*, 2015, 36:4671-4679; *Am J Clin Pathol*, 2008, 130:224-230; *Adv Anat Pathol*, 2014, 21:450-460; *Med Oncol*, 2012, 29:663-669; *Clinical Cancer Research*, 2004, 10:6612-6621; *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2009, 17:40-46; *Eur J Pediatr Surg*, 2015, 25:138-144; *J Clin Pathol*, 2011, 64:587-591; *Am J Surg Pathol*, 2006, 30:1570-1575; *Oncology*, 2007, 73:389-394; *Diagnostic Pathology*, 2010, 64:1-6; *Diagnostic Pathology*, 2015, 34:1-6; *Am J Clin Pathol*, 2008, 129:899-906; *Virchows Arch*, 2015, 466:67-76). Более предпочтительные типы рака включают рак желудка, рак легкого, мезотелиому, рак печени, рак молочной железы, рак кожи, лимфому и миелоидный лейкоз.

Противораковое средство, содержащее анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению, можно использовать для лечения пациента с раком, резистентным к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа. Например, пациента, у которого введение ингибитора контрольной точки иммунного ответа не привело к желаемой эффективности, можно лечить противораковым средством по настоящему изобретению. «Рак, резистентный к лечению ингибитором иммунных контрольных точек» также может быть выражен как «рак, который уже подвергался лечению ингибитором иммунных контрольных точек», «рак, который ухудшился во время или после лечения ингибитором иммунных контрольных точек», «рак, для которого ингибитор контрольной точки иммунного ответа неэффективен», «рак, рецидивировавший после лечения ингибитором контрольной точки иммунного ответа», «рак, устойчивый к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа», «рак, для которого лечение ингибитором контрольной точки иммунного ответа неадекватно эффективно» или «рак, для которого лечение ингибитором контрольной точки иммунного ответа оказалось безуспешным».

Вышеупомянутые виды рака, которые не поддаются лечению ингибитором иммунных контрольных точек, включают рак с мутацией в гене JAK1, JAK2 и/или B2M (см., например, Shin, Daniel Sanghoon с соавт., *Cancer Discovery*, 2017, 7(2):188–201; или Sade-Feldman, Moshe с соавт., *Nature Communications*, 2017, 8(1):1136), но этой формой рака не ограничиваются.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтические препараты, содержащие анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела, которые предназначены для использования в описанных выше способах лечения, применяют в лечении, и лекарственные средства могут содержать эффективное количество анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела, которое имеет пониженный уровень иммунологической активации в неопухолевой ткани по сравнению с анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой, которая не обладает CD137 антигенсвязывающей активностью, зависящей от низкомолекулярного соединения.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения неопухолевые ткани включают лимфатические узлы, селезенку и/или печень.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтические препараты, содержащие анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело для применения в описанных выше способах лечения, применения в лечении и лекарственные средства, могут содержать эффективное количество анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела, которое по существу не связывается с CD137, экспрессируемым в неопухолевой ткани.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтические препараты, содержащие анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело для применения в описанных выше способах лечения, применения в лечении и лекарственные препараты могут содержать эффективное количество анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела, которое имеет увеличенный период полужизни в крови по сравнению с анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела, которая не обладает связывающей активностью CD137, зависящей от низкомолекулярного соединения.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтические препараты, содержащие анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу или антитело для применения в описанных выше способах лечения, применения в лечении и лекарственные препараты могут содержать эффективное количество анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы или антитела, которое имеет низкий уровень побочных эффектов по сравнению с анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой или антителом, которое не обладает связывающей активностью с CD137, зависящей от низкомолекулярного соединения.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения к побочным явлениям относят повышенный AST, повышенный ALT, лихорадку, тошноту, острый гепатит, повреждение печени, спленомегалию, энтерит, гнойное воспаление кожи, нейтропению, лимфопению, тромбопению, экспрессию трансаминаз и/или гипербилирубинемию.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулой по настоящему изобретению имеют низкие побочные эффекты, и, таким образом, дозировка может быть увеличена без опасения по поводу побочных эффектов, поэтому в результате они могут проявлять более высокую лекарственную эффективность (цитотоксическую активность или противоопухолевую активность).

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают фармацевтические составы, содержащие любую из анти-CD137 антигенсвязывающих молекул или антител, предусмотренных в настоящем изобретении, например, для использования в любом из вышеуказанных терапевтических методов. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения фармацевтический состав содержит любую из анти-CD137 антигенсвязывающих молекул или антител, предусмотренных в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель.

Антигенсвязывающую молекулу или антитело по настоящему изобретению можно вводить любыми подходящим способом, включая парентеральный, внутрилегочный и интраназальный, и, если необходимо местное лечение, внутриочаговое введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Дозирование может осуществляться любым подходящим путем, например, инъекциями, такими как внутривенные или подкожные инъекции, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или хроническим. В настоящем изобретении предусматривают различные схемы дозирования, включая, но не ограничиваясь ими, однократное или многократное введение в различные моменты времени, болюсное введение и пульсовую инфузию.

Антитела по настоящему изобретению могут быть сформированы, дозированы и введены способом, соответствующим надлежащей медицинской практике. Факторы, которые следует учитывать в этом контексте, включают конкретное заболевание, которое лечат, конкретное млекопитающее, которое лечат, клиническое состояние отдельного пациента, причину расстройства, место доставки агента, метод введения, график введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Антитело необязательно, но может быть составлено с одним или несколькими агентами, которые в настоящее время используются для предотвращения или лечения рассматриваемого нарушения. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антитела, присутствующего в составе, типа расстройства или лечения и других факторов, обсуждаемых выше. Их обычно используют в тех же дозах и вводят способами, которые описаны в настоящем изобретении, или примерно от 1 до 99% дозировок, описанных в настоящем изобретении, или в любой дозировке и любым способом, который эмпирически/клинически определен как применимый.

Для профилактики или лечения заболевания подходящая доза антитела по настоящему изобретению может зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа антитела, тяжести и течения заболевания, от того, вводят ли антитело для профилактики или в целях терапии, от предыдущей терапии, истории болезни пациента и реакции на антитело, а также на усмотрение лечащего врача. Антитело обычно вводят пациенту за один раз или в течение ряда курсов лечения. В зависимости от типа и тяжести заболевания от 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1мг/кг-10мг/кг) антитела может быть начальной дозой антитела-кандидата для введения пациенту, например, в виде одного или нескольких отдельных введений, или путем непрерывной инфузии. Одна типичная суточная доза может составлять примерно от 1 микрограмма/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение обычно будет продолжаться до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Одна примерная дозировка антитела может находиться в диапазоне от примерно 0,05 мг/кг до примерно 10 мг/кг. Таким образом, пациенту можно вводить одну или более доз, составляющих примерно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг или 10 мг/кг (или любую их комбинацию). Такие дозы можно вводить с перерывами, например, каждую неделю или каждые три недели (например, когда пациент получает от примерно двух до примерно двадцати, или например, примерно шести доз антитела). Может быть введена начальная более высокая ударная доза, а затем одна или несколько более низких доз. Прогресс этой терапии легко подвергать мониторингу с помощью обычных методов и анализов.

Очевидно, что любой из вышеуказанных составов или терапевтических способов может быть осуществлен с использованием иммуноконъюгата по настоящему описанию вместо или в дополнение к анти-CD137 антигенсвязывающей молекуле или антителу. Используемые анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы или антитела представляют собой антитела, содержащие аминокислотные последовательности A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551. /B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 или A549/B167, показанные в табл. 37, как комбинация вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи. В предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающая молекула анти-CD137 представляет собой антитело к CD137, содержащее HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые имеют одинаковые аминокислотные последовательности, что и HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, содержащиеся в A375/B167. В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула может представлять собой антитело против CD137, содержащее A375/B167 в виде комбинации вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула представляет собой анти-CD137 антитело, содержащее HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые имеют такие же аминокислотные последовательности, что и HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, содержащиеся в A551/B379. В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула может представлять собой анти-CD137 антитело, содержащее A551/B379 в виде комбинации вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи. Кроме того, используемое анти-CD137 антитело может представлять собой любое анти-CD137 антитело, выбранное из антител, перечисленных в табл. 72.

3. Получаемые изделия

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено получение изделия, содержащего материалы, полезные для лечения, профилактики и/или диагностики нарушений, описанных выше. Изделие включает контейнер и связанную с ним этикетку или вкладыш в упаковку, связанный с контейнером. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты с раствором для внутривенного введения и т.д. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит состав и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может быть пакетом с раствором для внутривенного введения или флаконом с пробкой, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций). По крайней мере, один активный ингредиент в композиции представляет собой антитело по настоящему изобретению. Этикетка или вкладыш в упаковку указывает, что композицию используют для лечения выбранного состояния. Изделие в этом варианте осуществления настоящего изобретения может дополнительно содержать вкладыш в упаковку, указывающий, что композиции можно использовать для лечения определенного состояния. В другом варианте или дополнительно изделие может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI, bacteriostatic water for injection), фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Он может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Термин «вкладыш в упаковку» используют для обозначения инструкций, обычно включаемых в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях относительно использования таких терапевтических продуктов.

Очевидно, что любое из вышеуказанных промышленных изделий может включать иммуноконъюгат по настоящему изобретению вместо или в дополнение к анти-CD137 антигенсвязывающей молекуле или антителу.

III. Комбинированная терапия

A. Комбинированная терапия и терапевтические композиции для комбинированной терапии

Настоящее изобретение относится к способам лечения и/или профилактики рака, которые включают использование комбинации вышеупомянутой анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы и другого противоракового средства. В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает фармацевтические композиции, содержащие анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу, которая предназначена для применения в комбинированной терапии с другим противораковым средством. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям для применения в комбинированной терапии с анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой по настоящему изобретению, которые содержат другое противораковое средство. Настоящее изобретение относится к способам лечения или профилактики рака у индивида и/или активации иммунитета в опухолевой ткани, включающим введение анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы и другого противоракового средства. Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула и/или другое противораковое средство лечат рак и/или проявляют синергетический или аддитивный эффект в лечении рака при использовании в комбинации.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комбинированная терапия по настоящему изобретению обеспечивает способ усиления терапевтического или профилактического действия другого противоракового средства при лечении или профилактике рака путем применения другого противоракового средства вместе с анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой, описанной выше. Кроме того, комбинированная терапия по настоящему изобретению обеспечивает способ усиления терапевтического или профилактического действия вышеупомянутой анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы при лечении рака путем использования анти-CD137 антигенсвязывающей молекул вместе с другим противораковым средством. В настоящем изобретении усиление терапевтического или профилактического эффекта означает, например, увеличение скорости ответа на лечение, уменьшение количества противоракового средства, вводимого для лечения, и/или сокращение периода лечения противораковым средством, но ими перечень не ограничивается. Кроме того, комбинированная терапия по настоящему изобретению обеспечивает способ повышения выживаемости без прогрессирования заболевания у индивида, включающий введение эффективного количества описанной выше анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы и другого противоракового средства.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комбинированная терапия по настоящему изобретению включает введение анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы, описанной выше, и другого противоракового средства. Анти-CD137 антигенсвязывающая молекула и другое противораковое средство можно вводить любым подходящим способом, известным в данной области. Например, анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу и другое противораковое средство можно вводить параллельно (т.е. одновременно) или последовательно (т.е. в разное время). Когда анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу и другое противораковое средство вводят последовательно (то есть в разное время), интервал введения между анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой и другим противораковым средством конкретно не ограничивается и может быть установлен с учетом способа введения, лекарственной формы и других факторов. Например, он составляет от 0 до 168 ч, предпочтительно от 0 до 72 ч, предпочтительно от 0 до 24 ч и более предпочтительно от 0 до 12 ч, но не ограничивается этим.

Вышеупомянутая анти-CD137 антигенсвязывающая молекула и другое противораковое средство могут вводиться совместно. Анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу также можно вводить периодически (т.е. через нерегулярные интервалы времени). Анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу можно вводить до введения другого противоракового агента. В другом варианте анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу можно вводить после введения другого противоракового средства.

Кроме того, другое противораковое средство можно вводить периодически (т.е. через нерегулярные интервалы времени). Другое противораковое средство также можно вводить перед введением антигенсвязывающей молекулы против CD137. Альтернативно, другое противораковое средство можно вводить после введения анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы, описанные в настоящем изобретении, и другие известные или описанные в настоящем изобретения противораковые средства можно использовать в вышеупомянутой комбинированной терапии анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы и другого противоракового агента.

В дополнение к вышеупомянутой комбинированной терапии анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой и другим противораковым средством могут быть проведены дополнительные терапии. Терапия, добавленная к комбинированной терапии по настоящему изобретению, может включать дополнительное введение анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы и/или другого противоракового средства.

В качестве объекта, не ограничивающего области охвата настоящего изобретения, предусматривают активатор иммунного ответа, противораковое терапевтическое средство или средство для профилактики рака (далее «фармацевтическая композиция» и т.п.), направленное против раковых клеток или опухолевых тканей с раковыми клетками, которые содержат описанную выше анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу, другое противораковое средство или комбинацию анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы и другого противоракового средства. Фармацевтические композиции и т.п. по настоящему изобретению можно использовать в комбинированной терапии по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения при использовании анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы, описанной выше, в комбинации с другим противораковым средством, фармацевтические композиции и другие по настоящему изобретению оказывают более сильное действие на подавление клеточной пролиферации, активацию иммунитета против раковых клеток или опухолевых тканей, содержащих раковые клетки, или лечение или предотвращение рака, по сравнению с лечением, использующим только их. Кроме того, при использовании описанной выше анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы в комбинации с другим противораковым средством фармацевтические композиции по настоящему изобретению обладают синергетическим или аддитивным эффектом в подавлении роста клеток, активации иммунитета против раковых клеток или опухолевых тканей, содержащих раковые клетки, или в лечении или профилактике рака.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция или тому подобный объект, «содержащий комбинацию анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы и другого противоракового средства» по настоящему изобретению относится к фармацевтической композиции или тому подобному объекту, в котором указанную выше анти-CD137 антигенсвязывающая молекулу и другое противораковое средство объединяют для одновременного, раздельного или последовательного введения при лечении или предупреждении заболевания. Например, фармацевтические композиции и тому подобные объекты по настоящему изобретению могут быть представлены в форме комбинированного лекарственного средства, содержащего как анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу, так и другое противораковое средство. Кроме того, например, в фармацевтических композициях и тому подобных объектах по настоящему изобретению лекарственное средство, содержащее анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу и лекарственное средство, содержащее другой противораковый агент, могут быть представлены отдельно, и эти лекарственные средства могут применяться одновременно или последовательно. Заболевание конкретно не ограничено, но предпочтительно является раком.

Настоящее изобретение предусматривает фармацевтические композиции и тому подобные объекты для применения в комбинации с другими противоопухолевыми агентами, которые содержат в качестве активного ингредиента вышеупомянутую анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям и тому подобным объектам для применения в комбинации с вышеупомянутой анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой, которые содержат другой противораковый агент в качестве активного ингредиента.

Настоящее изобретение предусматривает фармацевтические композиции или тому подобные объекты для усиления терапевтического эффекта другого противоракового средства при лечении рака с другим противораковым средством путем объединения вышеупомянутой анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы с другим противораковым средством. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям и и тому подобным объектам для усиления терапевтического эффекта анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы при лечении рака с помощью анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы путем комбинирования другого противоракового агента с вышеупомянутой анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает применение анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы и/или другого противоракового агента для получения фармацевтической композиции или тому подобного объекта, упомянутого выше, содержащих анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу и/или другое противораковое средство в качестве активного ингредиента (ингредиентов).

В настоящем изобретении включение вышеупомянутой анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы и/или другого противоракового средства в качестве активного ингредиента (ингредиентов) означает, что анти-CD137 антигенсвязывающая молекула и/или другой противораковый агент содержится в качестве основного действующего ингредиента. Следовательно, доля анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы и/или другого противоракового агента не ограничена.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающие молекулы, описанные в настоящем изобретении, и другие известные или описанные в настоящем изобретении противораковые агенты можно использовать в вышеупомянутых фармацевтических композициях и тому подобных объектах.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, которое не ограничивает области охвата настоящего изобретения, другие противораковые агенты, используемые в сочетании с анти-CD137 антигенсвязывающими молекулами, включают аналоги азотистого иприта, алкилсульфонаты, этиленимины, нитрозомочевины, эпоксиды, другие алкилирующие агенты, аналоги фолиевой кислоты, аналоги пуринов, аналоги пиримидинов, другие антагонисты метаболизма, алкалоиды или аналоги барвинка, производные подофиллотоксина, аналоги камптотецина, производные колхицина, таксаны, другие растительные алкалоиды или природные вещества, актиномицины, антрациклины или родственные вещества, другие цитотоксические антибиотики, соединения платины, метилгидразины, ингибиторы киназы, ингибиторы ангиогенеза, гормоны, ингибиторы ДНК-модифицирующих ферментов, иммуностимуляторы, ингибиторы протеосом, ферменты, ингибиторы гистондеацетилазы, ингибиторы ДНК-модифицирующих ферментов, препараты цитокинов, ретиноиды, активирующие Т-клетки агонисты, ингибиторы иммунных контрольных точек, ингибиторы индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), ко-стимулирующие молекулы-активаторы, активаторы природных клеток-киллеров, перенаправляющие Т-клетки антигенсвязывающие молекулы, антифиброзные агенты, истощающие регуляторные Т-клетки агенты, агенты, истощающие $CD4^{+}$Т-клетки агенты, истощающие В-клетки агенты, истощающие природные клетки-киллеры агенты, истощающие макрофаги агенты, моноклональные антитела, другие молекулярные целевые лекарственные средства или другие противораковые средства, но ими перечень не ограничивается.

Понятие «иммунная контрольная точка» в настоящем описании относится к молекуле, которая экспрессируется на иммунокомпетентной клетке (включая Т-клетку) и передает иммунокомпетентной клетке сигнал для ингибирования иммунных ответов путем связывания с лигандом. Иммунные контрольные точки и их лиганды включают, например, молекулы PD-1, CTLA-4, TIM3, LAG3, PD-L1, PD-L2, BTNL2, B7-H3, B7-H4, CD48, CD80, 2B4, BTLA, CD160, CD60, CD86, VISTA или TIGIT, но ими перечень не ограничивается. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения «ингибитор контрольной точки иммунного ответа» относится к средству, которое ингибирует передачу сигнала контрольной точкой иммунного ответа путем ингибирования связывания контрольной точки иммунного ответа с ее лигандом. Предпочтительно ингибитор контрольной точки иммунного ответа представляет собой антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с контрольной точкой иммунного ответа или ее лигандом и ингибирует передачу сигнала контрольной точкой иммунного ответа, предпочтительно антитело или фрагментм антитела.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, который не ограничивает области охвата настоящего изобретения, предусматривают фармацевтическую композицию, в которой указанный выше другой противораковый агент представляет химиотерапевтическое средство, активирующий Т-клетки агент, ингибитор контрольной точки иммунного ответа, перенаправляющую Т-клетки антигенсвязывающую молекулу, антифиброзный агент, ингибитор ангиогенеза, истощающий регуляторные Т-клетки агент, истощающий $CD4^{+}$ Т-клетки агент, истощающий В-клетки агент, истощающий природные клетки-киллеры агент или истощающий макрофаги агент.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, который не ограничивает области охвата настоящего изобретения, предусматривают химиотерапевтическое средство, которое включает, но ими не ограничивается, антиметаболит, растительный алкалоид или соединение платины. Предпочтительные примеры антиметаболитов включают, но ими не ограничиваются, эноцитабин, капецитабин, кармофур, гемцитабин, цитарабин, тегафур, тегафур урацил, неларабин, фторурацил, флударабин, пеметрексед, пентостатин и метотрексат. Особенно предпочтительным примером антиметаболитов является капецитабин. Предпочтительные примеры растительных алкалоидов включают, но не ограничиваются ими, иринотекан, этопозид, собузоксан, доцетаксел, ногитекан, паклитаксел, винорелбин, винкристин, виндезин и винбластин. Пример особенно предпочтительного растительного алкалоида включает паклитаксел. Предпочтительные примеры соединений платины включают, но ими не ограничиваются, оксалиплатин, карбоплатин, цисплатин и недаплатин. Примеры особенно предпочтительных соединений платины включают цисплатин, карбоплатин или их комбинацию.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, который не ограничивает области охвата настоящего изобретения, предусматривают Т-клетки активирующее агонистическое средств включает, но ими настоящее изобретение не ограничивается, агонистическое антитело к надсемейству рецепторов TNF (TNFRSF) или агонистическое антитело к ко-стимулирующей молекуле.

Молекулы, на которые нацелены «агонистические антитела для костимулирующих молекул», включают TMIGD2, HHLA2, ICOS, лиганд ICOS, CD28, CD80, CD86 и другие. Примером предпочтительной ко-стимулирующей молекулы агонистического антитела является анти-CD28-антитело.

Молекулы, на которые нацелены «агонистические антитела надсемейства рецепторов TNF», существенно не ограничиваются до тех пор, пока они являются факторами, которые активируют клетки, экспрессирующие надсемейство рецепторов TNF (например, T-клетки и NK-клетки), но предпочтительно являются факторами, принадлежащими «к надсемейству TNF» или «надсемейству рецепторов TNF». В качестве факторов, относящихся к «надсемейству TNF» или «надсемейству рецепторов TNF», известны лиганды с тримерной структурой и рецепторы с тримерной структурой, с которыми связываются лиганды, способствующие активации различных иммунных клеток (*Nat. Rev. Immunol.*, 2012, 12, 339-351). Факторы, принадлежащие к надсемейству TNF или надсемейству рецепторов TNF, включают, например, CD137, CD137L, CD40, CD40L, OX40, OX40L, CD27, CD70, HVEM, LIGHT, RANK, RANKL, CD30, CD153, GITR, GITRL, TNFRSF25 и TL1A. Примеры агонистических антител к OX40 включают MOXR0916, MEDI6469, MEDI0562, MEDI6383, PF-04518600, GSK-3174998 и различные известные агонистические антитела к OX40. Примеры агонистических антител к CD40 включают RG-7876, ADC-1013, SEA-CD40, APX005M, декатузумаб и различные известные агонистические антитела к CD40. Примеры агонистических антител к GITR включают AMG228, AMK-1248, MK-4166, BMS-986156, TRX518 и различные известные агонистические антитела к GITR. Примеры агонистических антител к CD27 включают варлилумаб (регистрационный номер CAS: 1393344-72-3) и различные известные агонистических антител к CD27. Примеры агонистических антител к CD137 включают урелумаб (регистрационный номер CAS: 934823-49-1), PF-05082566 и различные известные агонистических антител к CD137. Агонистическое антитело к CD137 может представлять собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с CD137 (например, биспецифическое антитело, которое связывается с CD137 и раковым антигеном, или слитый белок или подобный объект, который связывается с лигандом CD137 (4-1BBL) и раковым антигеном).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, который не ограничивает области охвата настоящего изобретения, предусматривают примеры ингибиторов иммунных контрольных точек, к которым относятся антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к CTLA-4, антитела к TIM3, антитела к LAG3 или антитела к TIGIT, но ими перечень не ограничивается. Например, примеры анти-PD-1 антител включают пембролизумаб (регистрационный номер CAS: 1374853-91-4), ниволумаб (регистрационный номер CAS: 946414-94-4), MEDI0680, PDR001, BGB-A317, REGN2810, SHR-1210, PF-06801591 и различные известные анти-PD-1 антитела. Примеры анти-PD-L1 антител включают атезолизумаб (регистрационный номер CAS: 1380723-44-3), авелумаб (регистрационный номер CAS: 1537032-82-8), дурвалумаб (регистрационный номер CAS: 1428935-60-7), MDX-1105 и различные известные анти-PD-L1 антитела. Примеры анти-CTLA-4 антител включают ипилимумаб (регистрационный номер CAS: 477022-00-9), тремелимумаб (регистрационный номер CAS: 745013-59-6) и различные известные анти-CTLA-4 антитела. Примеры анти-TIM3 антител включают MBG452 и различные известные анти-TIM3 антитела. Примеры анти-LAG3 антител включают BMS-986016, LAG525 и различные известные анти-LAG3 антитела. Примеры анти-TIGIT антител включают тираголумаб (RG6058) и различные известные анти-TIGIT антитела. Ингибитор иммунной контрольной точки может также представлять собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с (1) молекулой иммунной контрольной точки и (2) членом надсемейства рецепторов TNF (TNFRSF) или костимулирующей молекулой. В одном варианте осуществления настоящего изобретения комбинированная терапия по настоящему изобретению может представлять собой комбинацию из трех агентов, включающую анти-CD137антигенсвязывающую молекулу, анти-PD-1 антитело и анти-TIGIT антитело или комбинацию из трех агентов: анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы, анти-PD-L1 антитела и анти-TIGIT антитела.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению и ингибитор контрольной точки иммунного ответа (предпочтительно анти-PD-L1 антитело) при использовании в комбинации лечат рак и/или проявляют синергический или аддитивный эффект при лечении рака и имеют временные или незначительные побочные эффекты. Хотя это не связано с определенной теорией, введение анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы индивиду активирует иммунные клетки в опухолевой ткани индивида. Экспрессия PD-L1 индуцируется такой активацией иммунных клеток, и клетки PD-L1$^+$ играют роль в подавлении активированного иммунного ответа. Таким образом, при комбинированной терапии анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой и анти-PD-L1 антителом действие клеток PD-L1$^+$ ингибируется анти-PD-L1 антителом, и может проявляться более сильный противоопухолевый эффект. Примеры побочных эффектов включают, помимо прочего, потерю веса и дисфункцию печени (повышение уровней ASL и/или ALT).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, который не ограничивает области охвата настоящего изобретения, предусматривают «перенаправляющую Т-клетки антигенсвязывающую молекулу», которая представляет собой мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую «домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую активностью связывания комплекса Т-клеточного рецептора» и «домен, содержащий вариабельная область антитела, обладающую антигенсвязывающей активностью по отношению к раковому антигену». Предпочтительно это мультиспецифическое антитело и более предпочтительно биспецифическое антитело. Мультиспецифическое (или биспецифическое) антитело может иметь одноцепочечную структуру антитела, например структуру, в которой вариабельные области антитела связываются линкером. Перенаправляющая Т-клетки антигенсвязывающая молекула может дополнительно содержать Fc-область, в которой активность связывания с рецептором Fcγ снижена.

«Домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую активностью связывания ракового антигена», относится к части антитела, содержащей область, которая специфически связывается с частью ракового антигена или со всем раковым антигеном и комплементарна ему. Используемый в настоящем изобретении термин «специфический раковый антиген» означает антиген, экспрессируемый раковой клеткой, который позволяет отличить раковую клетку от здоровой клетки, и, например, включает антиген, экспрессируемый по мере того, как клетка становится злокачественной, или аномальную сахарную цепочку, которая появляется на поверхности клеток и белковых молекул, когда клетки становятся раковыми. Примерами являются различные антигены, описанные в настоящем изобретении (например, в разделе «II. Композиции и способы (анти-CD137 агонистические антигенсвязывающие молекулы), А. Примеры антигенсвязывающих молекул или антител против CD137, 6. Мультиспецифические антитела»), но ими перечень не ограничивается. Специфический раковый антиген, на который направлен специфический к раку антиген-связывающий домен по настоящему изобретению, особенно предпочтительно представляет собой такой антиген, который экспрессируется на клеточной поверхности, и такие антигены включают, например, GPC3, CD19, CD20, EGFR, HER2, EpCAM, EREG, FAP, CEA, DLL3, Claudin-6 и FGFR3.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения молекула, связывающая антиген Т-клеток, представляет собой мультиспецифическое антитело, предпочтительно биспецифическое антитело, содержащее (1) домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую глипикан-3-связывающей активностью, (2) домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую активностью связывания комплекса Т-клеточного рецептора, и (3) домен, содержащий Fc-область, у которой снижена активность связывания с рецептором Fcγ. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, что касается вариабельной области L-цепи антитела, содержащейся в вариабельной области антитела, обладающей активностью связывания глипикан-3, и вариабельной области антитела, обладающей активностью связывания комплекса Т-клеток, предпочтительно получить общую L-цепь, способную придавать связывающую способность как H-цепи, обладающей связывающей активностью в отношении глипикана-3, так и H-цепи, обладающей связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, и использовать ее в качестве общей вариабельной области L-цепи вышеупомянутого биспецифического антитела.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения анти-Т-клеточный антиген связывающая молекула представляет собой ERY974. ERY974 является биспецифическим антителом, содержащим (1) домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую активностью связывания глипикана-3, (2) домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую активностью связывания комплекса Т-клеточного рецептора, и (3) домен, содержащий Fc-область, у которой активность связывания с рецептором Fcγ снижена, и содержит:

- TR01H113, описанный в WO 2016/047722 как вариабельная область тяжелой цепи на стороне CD3,

- E2702sKsc, описанный в WO 2016/047722 как константная область тяжелой цепи на стороне CD3,

- GCH065, описанный в WO 2016/047722 как вариабельная область тяжелой цепи на стороне GPC3,

- E2704sEpsc, описанный в WO 2016/047722 как константная область тяжелой цепи на стороне GPC3,

- L0011, описанный в WO 2016/047722 как вариабельная область общей легкой цепи, и

- k0, описанный в WO 2016/047722 как константная область общей легкой цепи.

«Домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую активностью связывания комплекса с Т-клеточным рецептором», предпочтительно представляет собой домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую активностью связывания с Т-клеточным рецептором, и более предпочтительно представляет собой домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую активностью связывания с CD3. Мероприятия. Кроме того, упомянутый выше «домен, содержащий вариабельную область антитела», получен из вариабельного домена одного или множества антител, и предпочтительно домен, содержащий вариабельную область антитела, содержит вариабельную область легкой цепи антитела (VL) и вариабельная область тяжелой цепи антитела (VH). Примеры доменов, содержащих такие вариабельные области антител, включают различные фрагменты антител, такие как «scFv (одноцепочечный Fv)», «одноцепочечное антитело», «Fv» и «scFv2 (одноцепочечный Fv 2)», «Fab» или «F (ab')2” и т.п.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, который не ограничивает области охвата настоящего изобретения, «антифиброзное лекарственное средство» представляет собой лекарственное средство, которое ингибирует или подавляет фиброз, и его примеры включают, но не ограничиваются ими, пирфенидон и нинтеданиб. Кроме того, противофиброзное лекарственное средство может представлять собой лекарственное средство на основе гиалуронидазы, такое как PEGPH20.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, который не ограничивает области охвата настоящего изобретения, примеры ингибитора ангиогенеза включают, но не ограничиваются ими, анти-VEGF антитела и анти-

VEGFR2 антитела. Примеры ингибиторов ангиогенеза включают бевацизумаб, рамуцирумаб, сорафениб, эверолимус, темсиролимус, ленватиниб, афлиберцепт и различные известные ингибиторы ангиогенеза.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, который не ограничивает области охвата настоящего изобретения, «агент, истощающий регуляторные Т-клетки», представляет собой агент, который истощает регуляторные Т-клетки, например, анти-CD4 антитело, анти-CD25 антитело, анти-CCR4 антитело и анти-CTLA4 антитело, но ими перечень не ограничивается.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, который не ограничивает области охвата настоящего изобретения, «агент, истощающий $CD4^{+}$ клетки», представляет собой агент, который истощает клетки $CD4^{+}$, и примерами такого агента являются, но ими не ограничиваются, анти-CD4 антитела.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, который не ограничивает области охвата настоящего изобретения, «агент, истощающий В-клетки», «агент, истощающий природные клетки-киллеры» и «агент, истощающий макрофаги», означают агентов, которые истощают В-клетки, природные клетки-киллеры и макрофаги, соответственно. Например, агенты, истощающие В-клетки, включают, но ими перечень не ограничивается, ритуксимаб и обинутузумаб, а агенты, разрушающие макрофаги, включают, но ими не ограничиваются, анти-CSF1R антитела.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, который не ограничивает области охвата настоящего изобретения, «моноклональное антитело» включает, например, анти-TGF-бета антитело, анти-латентный TGF-бета антитело, анти-IL-8 антитело и т.п., но ими перечень не ограничивается.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения другим противораковым средством по настоящему изобретению может быть любое противораковое средство без конкретных ограничений, при условии, что при использовании в комбинации с анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой по настоящему изобретению его терапевтический или профилактический эффект усиливается или он усиливает терапевтический или профилактический эффект анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, который не ограничивает области охвата настоящего изобретения, комбинированная терапия по настоящему изобретению может включать анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу, описанную выше, и по меньшей мере одно другое терапевтическое средство, иммуномодулирующее средство, противораковую терапевтическую вакцину, адаптированную Т-клеточную терапию и другие средства. Применимыми противораковыми терапевтическими вакцинами являются, но ими не ограничиваются, вакцины из цельных опухолевых клеток, вакцины с опухолевым антигеном, вакцины на основе вектора, онколитические вирусные вакцины и вакцины из дендритных клеток. В дополнение к вышеупомянутым методам лечения может проводиться мультидисциплинарное лечение в сочетании с хирургическим вмешательством, лучевой терапией и т.п.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, который не ограничивает области охвата настоящего изобретения, комбинированная терапия по настоящему изобретению может проводиться путем сочетания вышеупомянутой анти-CD137антигенсвязывающей молекулы и цитокиновой терапии с использованием цитокина в качестве усилителя противоопухолевого иммунного ответа. Примеры таких цитокинов включают IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, IL-27, GM-CSF, IFNα (интерферон-α), IFNα-2b, IFNβ и IFNγ, но ими не ограничиваются.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, который не ограничивает области охвата настоящего изобретения, объект изобретения относится к супрессору клеточного роста, ингибитору клеточного роста, активатору иммунного ответа, противораковому терапевтическому средству или противораковому средству, которое содержит вышеупомянутую фармацевтическую композицию.

«Индивид», которому вводят вышеупомянутую анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу и/или другое противораковое средство, может быть человек. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения индивидум представляет собой пациента с раковыми клетками или опухолевой тканью, содержащей раковые клетки. Предпочтительные типы рака в настоящем изобретении включают, например, рак желудка, рак головы и шеи, рак пищевода, колоректальный рак, рак легких, мезотелиому, рак печени, рак яичников, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак почки, рак кожи, опухоль мышц, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак семенников, рак матки, холангиокарциному, карциному из клеток Меркеля, рак мочевого пузыря, рак щитовидной железы, шванному, рак надпочечников, рак анального канала, опухоль центральной нервной системы, опухоль нейроэндокринной ткани, рак полового члена, опухоль плевры, слюнные железы опухоль железы, рак вульвы, тимому, лимфому, миелоидный лейкоз, детский рак (опухоль Вильмса, нейробластому, саркому, гепатобластому и опухоли зародышевых клеток), но ими перечень не ограничивается. Более предпочтительные типы рака включают рак желудка, колоректальный рак, рак легких, мезотелиому, рак печени, рак молочной железы, рак кожи, лимфому и миелоидный лейкоз, но ими перечень не ограничивается (*Tumori*, 2012, 98, 478-484; *Tumor Biol.* 2015, 36, 4671-4679; *Am J Clin Pathol.*, 2008, 130, 224-230; *Adv Anat Pathol*, 2014, 21, 450-460; *Med Oncol*, 2012, 29, 663-669; *Clinical Cancer Research*, 2004, 10, 6612-6621; *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2009, 17, 40-46; *Eur J Pediatr Surg*, 2015, 25, 138-144; *J Clin Pathol*, 2011, 64, 587-591; *Am J Surg Pathol*, 2006, 30, 1570-1575; *Oncology*, 2007, 73, 389-394; *Diagnostic Pathology*, 2010, 64, 1-6; *Diagnostic Pathology*, 2015, 34, 1-6; *Am J Clin Pathol*, 2008, 129, 899-906; *Virchows Arch*, 2015, 466, 67-76). Более предпочтительные типы рака включают рак желудка, колоректальный рак, рак легких, мезотелиому, рак печени, рак молочной железы, рак кожи, лимфому и миелоидный лейкоз.

В настоящем изобретении индивидом может быть пациент, который получил лечение вышеупомянутой анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой и/или любым противораковым средством перед комбинированной терапией анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой и другим противораковым средством. В другом варианте индивид может получать стандартную терапию, которая для него неэффективна. В некоторых вариантах осуществления рак у индивида находится на ранней или поздней стадии.

Комбинированная терапия, включающая анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению и другое противораковое средство, или фармацевтическую композицию для применения в комбинированной терапии, можно использовать для лечения пациента с раком, резистентным к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа. Например, комбинированную терапию (фармацевтическую композицию) по настоящему изобретению можно использовать для лечения пациента, у которого желаемая эффективность не наблюдалась при введении ингибитора контрольной точки иммунного ответа. «Рак, резистентный к ингибитору иммунных контрольных точек» также может быть выражен как «рак, уже пролеченный ингибитором иммунных контрольных точек», «рак, который обострился во время или после лечения ингибитором иммунных контрольных точек», «рак, для которого ингибитор контрольных точек неэффективен», «рак, который рецидивировал после лечения ингибитором иммунных контрольных точек», «рак, устойчивый к лечению ингибитором иммунных контрольных точек», «рак, при котором лечение ингибитором иммунных контрольных точек недостаточно эффективно» или «рак, при котором лечение ингибитором контрольной точки иммунного ответа оказалось безуспешным». Предпочтительные примеры других противораковых агентов, содержащихся в комбинированной терапии (фармацевтической композиции), включают, но не ограничиваются ими, ингибиторы иммунных контрольных точек или перенаправляющие Т-клетки антигенсвязывающие молекулы.

Вышеупомянутые виды рака, не поддающиеся лечению ингибитором иммунных контрольных точек, включают рак с мутацией генов JAK1, JAK2 и/или B2M (Shin, Daniel Sanghoon с соавт., *Cancer discovery*, 2017, 7(2): 188-201; или Sade-Feldman, Moshe с соавт., *Nature Communications*, 2017, 8(1)1, 1136; и др.), но ими перечень не ограничивается.

В другом варианте комбинированная терапия (фармацевтическая композиция) по настоящему изобретению может быть использована для лечения индивида больного раком, резистентным к лечению противораковым средством по настоящему изобретению. Например, комбинированную терапию (фармацевтическую композицию) по настоящему изобретению применяют для лечения индивидуума, у которого после введения противоракового агента по настоящему изобретению развивается резистентность к противораковому агенту, или индивидуума, у которого желаемая эффективность не наблюдалась при введение противоракового агента по настоящему изобретению. Другими словами, рак, который уже лечили противораковым средством по настоящему изобретению, можно лечить комбинированной терапией (фармацевтической композицией) по настоящему изобретению. Предпочтительные примеры другого противоракового агента, содержащегося в фармацевтической композиции, включают, но ими не ограничиваются, ингибиторы иммунных контрольных точек или перенаправляющие Т-клетки антигенсвязывающие молекулы.

В еще одном объекте настоящее изобретение обеспечивает способ активации иммунных клеток в опухолевой ткани индивидуума с помощью комбинированной терапии, описанной выше. В одном варианте осуществления способ включает введение индивидууму эффективного количества противоракового средства, содержащего анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу и другое противораковое средство. В другом варианте осуществления в настоящем изобретении такие иммунные клетки включают В-клетки, дендритные клетки, природные клетки-киллеры, макрофаги и/или $CD8^+$ Т-клетки (более конкретно, это иммунные клетки, внедряющиеся в опухолевые ткани). В этом способе, когда уровень экспрессии по крайней мере одного гена, выбранного из Cd3e, CD8b1, Gzmb, Prf1 и Ifng, повышается в опухолевой ткани, можно судить об усилении активации Т-клеток в опухолевой ткани.

В еще одном объекте настоящего изобретения предложен способ активации иммунных клеток в опухолевой ткани индивидуума, в частности $CD8^+$ Т-клеток, или стимуляции их пролиферации с помощью комбинированной терапии, описанной выше. В одном варианте осуществления настоящего изобретения способ включает введение индивидууму эффективного количества противоракового средства, содержащего анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу, и другое противораковое средство. В способе активации $CD8^+$ Т-клеток, когда наблюдается увеличение положительной доли по крайней мере одного маркера активации $CD8^+$ Т-клеток, выбранного из тетрамера OVA, гранзима B, PD-1, KLRG-1 и ICOS (положительная доля (%) = количество $CD8^+$ Т-клеток, положительных по маркеру активации в опухолевой ткани/количество $CD8^+$ Т-клеток в опухолевой ткани × 100), можно судить, что $CD8^+$ Т-клетки в опухолевой ткани активированы.

Очевидно, что любую из вышеупомянутых комбинированных терапий или терапевтических композиций для комбинированной терапии можно проводить с использованием иммуноконъюгата по настоящему изобретению вместо или в дополнение к анти-CD137 антигенсвязывающей молекуле или антителу по настоящему изобретению. Используемая анти-CD137 антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело, содержащее аминокислотные последовательности A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167,

A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 или A549/B167, показанные в табл. 37 как комбинация вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи. В предпочтительном варианте осуществления анти-CD137 антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело к CD137, содержащее HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые имеют такие же аминокислотные последовательности, что и HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, содержащиеся в A375/B167. В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула может представлять собой антитело против CD137, содержащее A375/B167 в виде комбинации вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело к CD137, содержащее HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые имеют такие же аминокислотные последовательности, что и у HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, содержащихся в A551/B379. В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CD137 антигенсвязывающая молекула может представлять собой антитело против CD137, содержащее A551/B379 в виде комбинации вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи. Кроме того, используемое анти-CD137-антитело может представлять собой любое анти-CD137-антитело, выбранное из антител, перечисленных в табл. 72.

Б. Набор

В другом объекте настоящее изобретение обеспечивает наборы для применения при лечении или профилактике различных заболеваний или нарушений, например опухолей или рака, подробно описанных в разделе «Ж. Терапевтические способы и терапевтические композиции», описанные выше, в которых лечение или профилактика анти-CD137 антигенсвязывающей молекулой (или ее иммуноконъюгатом) или содержащей их фармацевтической композицией по настоящему изобретению объединено по меньшей мере с одним другим противораковым средством, как подробно описано выше в разделе «А. Комбинированная терапия и терапевтические композиции для комбинированной терапии». Такой набор в настоящем изобретении может быть предоставлен, например, как набор для лечения или профилактики рака (или опухоли).

Набор по настоящему изобретению содержит анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу (или ее иммуноконъюгат) по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента или фармацевтическую композицию (или фармацевтический состав), содержащую их, и (2) листок-вкладыш или этикетку с указанием введение по меньшей мере одного другого противоракового средства до, одновременно с или после введения пациенту фармацевтической композиции.

В наборе по настоящему изобретению активный ингредиент может быть помещен в контейнер.

Набор по настоящему изобретению может включать этикетку на контейнере или вкладыш в упаковку, прикрепленный к контейнеру.

Набор по настоящему изобретению предоставляется в виде коммерческой упаковки, например, в виде терапевтического продукта.

Контейнер в настоящем изобретении предпочтительно включает, например, бутылку, флакон, шприц, пакет с раствором для внутривенного введения и т.п. Контейнер может быть изготовлен из различных материалов, таких как стекло и пластик. Контейнер может содержать только активный ингредиент или может иметь стерильное отверстие для доступа (например, контейнер может представлять собой пакет или флакон, содержащий раствор для внутривенного введения, с пробкой, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций).

Этикетка или листок-вкладыш в настоящем изобретении обычно включены в коммерческую упаковку вышеупомянутого терапевтического продукта, который является одним из примеров набора согласно настоящему изобретению, и используются для ссылки на инструкции по применению таких терапевтических продуктов, содержит информация о показаниях, способе применения, дозировке, способе введения, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях. Например, для комбинированной терапии они могут содержать инструкции по применению анти-CD137 антигенсвязывающей молекулы (или ее иммуноконъюгата) или фармацевтической композиции (или фармацевтического состава), включающей их в настоящем изобретении, в комбинации по меньшей мере с одним другим противораковым средством, как подробно описано выше в разделе «А.

Комбинированная терапия и терапевтические композиции для комбинированной терапии».

Набор по настоящему изобретению может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, включающий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Наборы по настоящему изобретению могут дополнительно включать другое оснащение, желательное с коммерческой точки зрения или с точки зрения пользователя, например, другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

ПРИМЕРЫ

Ниже приведены примеры способов и композиций по настоящему изобретению. Учитывая приведенное выше описание изобретения, очевидно, что могут быть реализованы различные другие варианты его осуществления.

Пример 1. Оценка противоопухолевой активности анти-CD137-антитела на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (клетки LLC1/OVA/GPC3 клон C5)

(1-1) Получение клеточной линии и мышиной модели трансплантации сингенной опухоли и оценка противоопухолевой активности

В этом исследовании используют собственную линию клеток рака легких мышей LLC1/OVA/GPC3 клон C5 (описано в контрольном примере 9-4-1) и мышей hCD137 KI (описано в справочном примере 6-3). Клеточную линию LLC1/OVA/GPC3 клон C5 трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, которых группируют, когда объем опухоли достигает 164-465 мм^3. Группирование проводят через 10 дней после трансплантации. Антитело A551-MB110/B379-ml0r вводят в хвостовую вену мышей через 11 дней и 14 дней после трансплантации, как показано в табл. 6 ниже. Буфер ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют в качестве контроля разбавителя.

Таблица 6.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	Сутки введения	Способ введения
1	7	Контроль разбавителя (ФСб с 0,05% Tween 20)	-	11 и 14 день после трансплантации	В хвостовую вену
2	7	A551-MB110/B379-ml0r	0,83		
3	7	A551-MB110/B379-ml0r	2,5		
4	7	A551-MB110/B379-ml0r	7,5		

Объем опухоли измеряют через 10 дней, 14 дней, 17 дней и 21 день после трансплантации.

Объем опухоли рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли (мм^3) = длина (мм) × ширина (мм) × ширина (мм)/2

Ингибирование роста опухоли (TGI – Tumor growth inhibition (%)) рассчитывают по следующим формулам:

Изменение объема опухоли (мм^3) = объем опухоли на момент измерения – объем опухоли на момент группирования

TGI (%) = (1- (Среднее значение изменения объема опухоли для каждой группы/Среднее значение изменения объема опухоли для контрольной группы разбавителя)) × 100

В результате антитело A551-MB110/B379-ml0r показало скорость подавления роста опухоли 103, 101 и 106% при 7,5, 2,5 и 0,83 мг/кг против клеток LLC1/OVA/GPC3 клона C5 (фиг. 1, табл. 7). То есть антитело A551-MB110/B379-ml0r показывает сопоставимую высокую противоопухолевую активность при всех дозах этого примера. Одного индивида в группе введения 2,5 мг/кг пришлось подвергнуть эвтаназии из-за ухудшения общего состояния из-за внутрибрюшинной диссеминации опухолевых клеток через 15 дней после трансплантации опухоли.

Таблица 7.

Введенное антитело	Доза (мг/кг)	TGI (%) на 21 день после трансплантации опухоли
A551-MB110/B379-ml0r	0,83	106
	2,5	101
	7,5	103

<u>(1-2) Получение клеточной линии и мышиной модели с трансплантацией сингенной опухоли и оценка внутриопухолевого ответа (уровень экспрессии генов)</u>

В этом исследовании используют полученные авторами настоящего изобретения клетки клона C5 LLC1/OVA/GPC3 (описанные в справочном примере 9-4-1) и мышей hCD137 KI (описанных в справочном примере 6-3). Клеточную линию LLC1/OVA/GPC3 клон C5 трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, которых группировали, когда объем опухоли достигал 100-180 мм^3. Группирование проводят через 10 дней после трансплантации. Контрольный разбавитель и антитело A551-MB110/B379-ml0r вводят в хвостовую вену мышей через 11 дней и 14 дней после трансплантации, как показано в табл. 8 ниже. В качестве носителя используют ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20.

Таблица 8.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	Способ введения
1	5	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-	11 и 14 день после трансплантации	В хвостовую вену
2	5	A551-MB110/B379-ml0r	0,83		
3	5	A551-MB110/B379-ml0r	2,5		
4	5	A551-MB110/B379-ml0r	7,5		

Опухоли отделяют через 15 дней после трансплантации. Собранные опухоли погружают в РНК-лейтер (фирма QIAGEN) и хранят. Тотальную РНК экстрагируют из образцов опухолей. Уровень экспрессии гена тотальной РНК измеряют с использованием панели иммунопрофилирования мыши nCounter Pancancer (фирма NanoString Technologies) и анализатора nCounter Digital (фирма NanoString Technologies).

Измеренный уровень экспрессии генов анализируют с помощью nSolver (фирма NanoString Technologies) и Microsoft Excel 2013 (корпорация Microsoft). Для генов, уровни экспрессии которых были измерены, наносят на график уровни экспрессии Cd8b1, Gzmb, Prf1 и Ifng, которые связаны с цитотоксической активностью Т-клеток (фиг. 2). По сравнению с контрольной группой, получавшей носитель, группа, получавшая только A551-MB110/B379-ml0r, показывает повышение уровня экспрессии всех генов (критерий Даннета, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$).

Из вышеизложенного было показано, что в условиях данного исследования A551-MB110/B379-ml0r индуцирует сильную внутриопухолевую реакцию на нокинных мышах CD137 человека с клоном C5 LLC1/OVA/GPC3, несущих рак.

<u>(1-3) Оценка внутриопухолевого действия (положительные показатели различных маркеров активации в $CD8^+$ Т-клетках)</u>

<u>(1-3-1) Получение клеточной линии, мышиной модели трансплантации сингенной опухоли и метод оценки внутриопухолевого действия</u>

В настоящем исследовании используют полученные авторами настоящего изобретения клеточную линию рака легких мышей LLC1/OVA/GPC3, линию клеток клона C5 (описанных в контрольном примере 9-4-1) и мышей hCD137 KI (описанных в контрольном примере 6-3). Клеточную линию LLC1/OVA/GPC3 клон C5 трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, которых группируют, когда объем опухоли достигет 69-195 мм^3. Группирование проводят через 12 дней после трансплантации. Как показано в табл. 9 ниже, A551-MB110/B379-ml0r вводят в хвостовую вену мышей через 13 и 16 дней после трансплантации. ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют в качестве контроля разбавителя.

Через четыре дня после первого введения ткань опухоли удаляют и получают фракцию лимфоцитов методом, подробно описанным ниже, оценивают внутриопухолевую реакцию, определяя положительную частоту различных маркеров активации в CD8$^+$ T-клетках с помощью проточной цитометрии (FCM – flow cytometry). При оценке каждого из этих показателей было установлено, что активация T-клеток в опухолевой ткани усиливается, когда показатели, свидетельствующие о внутриопухолевой реакции, выше в группе, получавшей A551-MB110/B379-ml0r, чем в группе, получавшей разбавитель.

Таблица 9.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	День взятия образцов
1	4	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-	13 и 16 день после трансплан-тации	17й день после трансплантации
2	4	A551-MB110/B379-ml0r	2,5	13 и 16 день после трансплан-тации	17й день после трансплантации

<u>(1-3-2) Иссечение опухолевой ткани у мышей с трансплантированной клеточной линией LLC1/OVA/GPC3 клона C5 и получение фракции лимфоцитов</u>

В иссеченной опухолевой ткани измеряют количество клеток во фракциях лимфоцитов. Фракции лимфоцитов, полученные с использованием набора для диссоциации опухоли, мышь (Tumor Dissociation Kit, mouse; фирма Miltenyi Biotec), используют для измерения количества клеток во фракциях лимфоцитов.

<u>(1-3-3) Оценка с помощью FCM положительные доли различных маркеров активации во фракциях лимфоцитов, полученных из мышей с трансплантированной клеточной линией LLC1/OVA/GPC3 клона C5</u>

Для оценки с помощью FCM используют положительные уровни различных маркеров активации в CD8$^+$ T-клетках. Для этого в анализе методом FCM используют флуоресцентно-меченое анти-CD8 антитело (фирма MBL), реагент OVA-тетрамер (фирма MBL), анти-гранзим B антитело (фирма BioLegend), анти-PD-1 антитело (фирма BioLegend), анти-KLRG-1 антитело (фирма BD Biosciences) и анти-ICOS антитело (фирма Invitrogen). Измерения проводят на проточном цитофлуориметре BD LSRFortessaTM X-20 (фирма BD Biosciences).

Оценка положительной доли различных маркеров активации в $CD8^+$ Т-клетках с использованием FCM показала, что нет увеличения положительной доли различных маркеров активации в опухолевой ткани в группе, получавшей A551-MB110/B379-ml0r, по сравнению с группой, получавшей разбавитель (фиг. 3).

Из вышеизложенного следует, что A551-MB110/B379-ml0r усиливает активацию $CD8^+$ Т-клеток в опухоли.

Пример 2. Оценка противоопухолевой активности анти-CD137-антитела на модели трансплантации сингенных опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (клетки E.G7-OVA)

(2-1) Получение клеточной линии и модели мышей, трансплантированных сингенной опухолью, и оценка противоопухолевой активности антитела A551-MB110/B379-ml0r

В этом исследовании используют клетки мыши линии лимфомы E.G7-OVA (ATCC, CRL-2113) и мышей hCD137 KI (описанных в контрольном примере 6-3). Клеточную линию E.G7-OVA трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, которых объединяли в группы, когда объем опухоли достиг приблизительно 200 мм^3. Группирование проводят через 7 дней после трансплантации. Антитело A551-MB110/B379-ml0r вводят в хвостовую вену мышей через 7 и 10 дней после трансплантации, как показано в табл. 10 ниже. ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют в качестве контроля разбавителя.

Таблица 10.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	Способ введения
1	10	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-	7 и 10 день после трансплантации	Через хвостовую вену
2	10	A551-MB110/B379-ml0r	0,83		
3	10	A551-MB110/B379-ml0r	2,5		

Объем опухоли измеряют через 7 дней, 10 дней, 14 дней, 17 дней, 21 день, 24 дня и 28 дней после трансплантации.

Объем опухоли (TV – Tumor volume) рассчитывают по следующей формуле.

Объем опухоли (мм^3) = длина (мм) × ширина (мм) × ширина (мм)/2

В результате в модели с трансплантацией клеток E.G7-OVA средний объем опухоли в контрольной группе, получавшей носитель, составил 2611,8 мм^3 через 21 день после трансплантации. Средние объемы опухоли в группах введения 0,83 мг/кг и 2,5 мг/кг A551-MB110/B379-ml0r составили 1755,7 мм^3 и 1322,1 мм^3, соответственно. По сравнению с контрольной группой, получавшей разбавитель, группы, в которых вводили A551-MB110/B379-ml0r 0,83 мг/кг и 2,5 мг/кг, показали значительно более низкие значения через 28 дней после трансплантации (критерий Вильямса). Изменения объема опухоли в контрольной группе, получавшей носитель, и в группе, получавшей 2,5 мг/кг A551-MB110/B379-ml0r, показаны на фиг. 4.

<u>(2-2) Получение клеточной линии и мышиной модели сингенной трансплантации опухоли, а также способ оценки противоопухолевой активности антитела A375-mIgG1/B167-ml0r</u>

В настоящем исследовании используют клетки мышиной линии лимфомы E.G7-OVA (CRL-2113) от мышей ATCC и hCD137 KI (описанных в контрольном примере 6-3). Клетки E.G7-OVA трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, которых группируют, когда объем опухоли достигает примерно 200-400 мм^3. Группирование проводят через 7 дней после трансплантации. Антитело A375-mIgG1/B167-ml0r вводят в хвостовую вену мышей через 7 и 10 дней после трансплантации, как показано в табл. 11 ниже. ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют в качестве контроля разбавителя.

Таблица 11.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	Способ введения
1	5	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-	7 и 10 день после трансплантации	Через хвостовую вену
2	5	A375-mIgG1/B167-ml0r	2,5		

Объем опухоли измеряют через 7 дней, 10 дней, 15 дней, 18 дней, 21 день, 25 дней, 29 дней и 36 дней после трансплантации.

Объем опухоли (TV) рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли (мм^3) = длина (мм) × ширина (мм) × ширина (мм)/2

В результате антитело A375-mIgG1/B167-ml0r показывает сильное противоопухолевое действие на клетки E.G7-OVA, а полная регрессия опухоли наблюдается у 4 из 5 мышей (фиг. 5).

Пример 3: Оценка противоопухолевой активности анти-CD137-антитела на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (клетки C1498)

В этом исследовании используют линию клеток мыши AML (острый миелоидный лейкоз) C1498 (ATCC, ITEM Number: TIB-49) от мышей ATCC и hCD137 KI (описанных в контрольном примере 6-3). Линию клеток C1498 трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, которых объединяли в группы, когда объем опухоли достигает приблизительно 270 мм^3. Группирование проводят через 7 дней после трансплантации. Антитело A551-MB110/B379-ml0r вводят в хвостовую вену мышей через 7 и 10 дней после трансплантации, как показано в табл. 12 ниже. ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют в качестве контроля разбавителя.

Таблица 12.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	Способ введения
1	10	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-	7 и 10 день после трансплантации	Через хвостовую вену
2	10	A551-MB110/B379-ml0r	2,5		

Объем опухоли измеряют через 7 дней, 10 дней, 14 дней, 16 дней, 21 день, 25 дней и 28 дней после трансплантации.

Объем опухоли (TV) рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли (мм^3) = длина (мм) × ширина (мм) × ширина (мм)/2

В результате антитело A375-mIgG1/B167-ml0r показывает сильное противоопухолевое действие на клетки E.G7-OVA, а полная регрессия опухоли наблюдается у 4 из 5 мышей (фиг. 5).

В результате в модели с трансплантацией клеток C1498 средний объем опухоли в контрольной группе, получавшей разбавитель, составил 3405,3 мм^3 через 17 дней после трансплантации. Средний объем опухоли в группе 2,5 мг/кг A551-MB110/B379-ml0r составил 2181,3 мм^3. По сравнению с контрольной группой, получавшей разбавитель, группа, получавшая 2,5 мг/кг A551-MB110/B379-ml0r, показала более низкое значение через 17 дней после трансплантации. Изменения объема опухоли в контрольной группе, получавшей разбавитель, и в группе, получавшей 2,5 мг/кг A551-MB110/B379-ml0r, показаны на фиг. 6.

Пример 4. Оценка противоопухолевой активности анти-CD137-антитела на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (клетки Hepa1-6/hGPC3)

(4-1) Получение клеточной линии и мышиной модели сингенной трансплантации опухоли, а также оценка противоопухолевой активности антитела A551-MB110/B379-ml0r

В этом исследовании клеточные линии клеток рака печени мыши Hepa1-6/hGPC3 (*Science Translational Medicine*, 2017, 9: 410, eaal4291), получают путем введения экспрессионной плазмиды глипикана-3 человека (GPC3) в клетки Hepa1-6 (CRL-1830), полученные от ATCC, и используют мышей hCD137 KI (описанных в контрольном примере 6-3). Линию клеток Hepa1-6/hGPC3 трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, которых группируют, когда объем опухоли достигает приблизительно 200 мм^3. Группирование проводят через 10 дней после трансплантации. Антитело A551-MB110/B379-ml0r вводят в хвостовую вену мышей через 10 дней и 13 дней после трансплантации, как показано в табл. 13 ниже. ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют в качестве контроля разбавителя.

Таблица 13.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	Способ введения
1	10	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-	10 и 13 день после трансплан-тации	Через хвостовую вену
2	10	A551-MB110/B379-ml0r	2,5		

Объем опухоли измеряют через 10 дней, 13 дней, 17 дней, 20 дней, 24 дня, 27 дней и 31 день после трансплантации.

Объем опухоли (TV) рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли (мм^3) = длина (мм) × ширина (мм) × ширина (мм)/2

В результате в модели с трансплантацией клеток Hepa1-6/hGPC3 средний объем опухоли в контрольной группе, получавшей разбавитель, составил 1525,3 мм^3 через 31 день после трансплантации. Средний объем опухоли в группе 2,5 мг/кг A551-MB110/B379-ml0r составил 471,6 мм^3. По сравнению с контрольной группой, получавшей разбавитель, группа, получавшая 2,5 мг/кг A551-MB110/B379-ml0r, показала пониженное значение через 31 день после трансплантации. Изменения объема опухоли в контрольной группе, получавшей разбавитель, и в группе, получавшей 2,5 мг/кг A551-MB110/B379-ml0r, показаны на фиг. 7.

<u>(4-2) Получение клеточной линии и мышиной модели сингенной трансплантации опухолевых клеток, а также оценка противоопухолевой активности антитела A375-mIgG1/B167-ml0r</u>

В этом исследовании клеточные линии клеток рака печени мыши Hepa1-6/GPC3 (*Science Translational Medicine*, 2017, 9: 410, eaal4291), получают путем введения экспрессионной плазмиды глипикана-3 человека (GPC3) в клетки Hepa1-6 (CRL-1830), полученные от ATCC, и используют мышей hCD137 KI (описанных в контрольном примере 6-3). Линию клеток Hepa1-6/GPC3 трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, которых группируют, когда объем опухоли достигает приблизительно 200-300 мм^3. Группирование проводят через 7 дней после трансплантации. Антитело A375-mIgG1/B167-ml0r вводят в хвостовую вену мышей через 7 и 10 дней после трансплантации, как показано в табл. 14 ниже. ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют в качестве контроля разбавителя.

Таблица 14.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	Способ введения
1	5	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-	7 и 10 день после трансплантации	Через хвостовую вену
2	5	A375-mIgG1/B167-ml0r	7,5		

Объем опухоли измеряют через 7 дней, 10 дней, 13 дней, 18 дней и 20 дней после трансплантации.

Объем опухоли (TV) рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли (мм^3) = длина (мм) × ширина (мм) × ширина (мм)/2

В результате антитело A375-mIgG1/B167-ml0r проявляет противоопухолевый эффект в отношении клеток Hepa1-6/GPC3 (фиг. 8).

Пример 5: Оценка влияния различных иммунных клеток на противоопухолевую активность анти-CD137 антитела на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (LLC1/OVA/GPC3, клон C5)

В этом исследовании используют собственную линию клеток рака легких мышей LLC1/OVA/GPC3 клон C5 (описано в контрольном примере 9-4-1) и мышей hCD137 KI (описано в контрольном примере 6-3). Линию клеток клона LLC1/OVA/GPC3 C5 трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, которых объединяют в группы, когда объем опухоли достиг приблизительно 200-300 мм^3. Группирование проводят через 9 дней после трансплантации. Антитело A551-MB110/B379-ml0r вводят в хвостовую вену мышей через 10 и 14 дней после трансплантации, как показано в табл. 15 ниже. ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют в качестве контроля разбавителя. Кроме того, вводят агентов для истощения различных иммунных клеток, как показано в табл. 16 ниже.

Таблица 15.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	Способ введения
1	5	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-	10 и 14 день после трансплантации	Через хвостовую вену
С 2 по 8	5	A551-MB110/B379-ml0r	2,5		

Таблица 16.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза	День введения	Способ введения
3	5	Anti-mouse CD4 антитело (фирма BioXCell, BP0003-1)	500 мкг	9, 13 и 17 день после трансплантации	Через хвостовую вену
4	5	Anti-mouse CD8α антитело (фирма BioXCell, BP0061)	500 мкг	9, 13 и 17 день после трансплантации	
5	5	Anti-mouse CD20 антитело (фирма BioLegend, 152104)	250 мкг	9 день после трансплантации	
6	5	Anti-mouse NK1.1 антитело (фирма BioXCell, BP0036)	500 мкг	9, 13 и 17 день после трансплантации	
7	5	Anti-mouse Ly-6G антитело (фирма BioXCell, BP0075-1)	500 мкг	9, 13 и 17 день после трансплантации	
8	5	Клодроновые липосомы (фирма LIPOSOMA research)	300 мкг	9 и 13 день после трансплантации	

Объем опухоли измеряют через 9 дней, 14 дней, 17 дней и 20 дней после трансплантации.

Объем опухоли (TV) рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли (мм^3) = длина (мм) × ширина (мм) × ширина (мм)/2

В результате эффективность антитела A551-MB110/B379-ml0r против клеток клона C5 LLC1/OVA/GPC3 значительно снижена из-за истощения T-клеток CD8 (фиг. 9). Из этого был сделан вывод, что эффективность лекарственного средства в этой модели в основном проявляется T-клетками CD8. С другой стороны, истощение CD4 T-клеток, B-клеток, NK-клеток и макрофагов проявляет тенденцию к повышению эффективности препарата (фиг. 9). Исходя из этого, было высказано предположение, что комбинированное применение антитела A551-MB110/B379-ml0r с агентами, истощающими эти иммунные клетки, эффективно для повышения эффективности лекарственного средства.

Пример 6: Оценка монотерапии анти-CD137 антителом или комбинированной терапии с анти-PD-L1 антителом на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (клетки MC38)

(6-1) Получение клеточной линии и мышиной модели сингенной трансплантации опухоли, а также оценка степени изменения противоопухолевой активности и массы тела A551-MB110/B379-ml0r (применение одного средства или комбинации)

В этом исследовании используют клетки MC38 линии клеток рака толстой кишки мыши, лицензированные Национальным институтом рака США, и мышей hCD137 KI (описанных в контрольном примере 6-3). Линию клеток MC38 трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, и модель считается установленной, когда объем опухоли достиг приблизительно 100-240 мм^3. После создания модели мышей с трансплантированной клеточной линией MC38 объединяют в группы, а затем в дозах, показанных в табл. 17, вводят A551-MB110/B379-ml0r и/или антитело против мышиного PD-L1 (BioXcell, клон 10F.9G2). Введение A551-MB110/B379-ml0r осуществляют дважды, через 15 и 18 дней после трансплантации, через хвостовую вену. Введение антител против мышиного PD-L1 проводят дважды, через 15 и 18 дней после трансплантации, внутрибрюшинно. ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют для контроля разбавителя.

Таблица 17.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	Способ введения
1	6	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-	15 и 18 день после трансплантации	Через хвостовую вену и внутрибрюшинно
2	6	A551-MB110/B379-ml0r	2,5		Через хвостовую вену
		Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-		Внутрибрюшинно
3	6	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-		Через хвостовую вену
		Anti-mouse PD-L1 антитело	10		Внутрибрюшинно
4	6	A551-MB110/B379-ml0r	2,5		Через хвостовую вену
		Anti-mouse PD-L1 антитело	10		Внутрибрюшинно

Объем опухоли и массу тела измеряют через 14 дней, 18 дней, 21 день и 25 дней после трансплантации.

Объем опухоли (TV) рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли (мм^3) = длина (мм) × ширина (мм) × ширина (мм)/2

Ингибирование роста опухоли (TGI (%)) рассчитывают по следующим формулам:

Изменение TV (мм3) = объем опухоли через 25 дней после трансплантации - объем опухоли на момент формирования группы

TGI (%) = (1- (Среднее значение изменения TV для каждой группы/Среднее значение изменения TV для группы контроля разбавителя)) × 100

Степень изменения массы рассчитывают по следующей формуле:

Степень изменения массы (%) = 100 × масса на дату измерения/масса на 14 дней после трансплантации

В результате в отношении клеток MC38 наблюдают усиление эффекта подавления роста опухоли для группы, получающей комбинацию A551-MB110/B379-ml0r и антитела против мышиного PD-L1, по сравнению с группой, получавшей только A551-MB110/B379-ml0r, или с группой, получавшей только антитело против мышиного PD-L1. В частности, степень подавления роста опухоли в группе, получавшей одно средство A551-MB110/B379-ml0r, составила 82%, тогда как в группе, получавшей комбинацию A551-MB110/B379-ml0r с антителом против мышиного PD-L1, она составила 117% (фиг. 10, табл. 18). Во всех группах введения наблюдают преходящую потерю массы тела в пределах

6,5% по сравнению с началом введения, но после этого наблюдают тенденцию к восстановлению (фиг. 11).

Таблица 18. Подавление роста опухоли на 25 день после трансплантации.

	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	A551-MB110/B379-ml0r	Anti-mouse PD-L1 антитело	A551-MB110/B379-ml0r + Anti-mouse PD-L1 антитело
Подавление роста опухоли (TGI)	-	82%	85%	117%

(6-2) Составление тепловой карты, показывающей изменения в экспрессии генов, связанных с иммунитетом, до и после введения лекарственного средства (особенно в комбинированной группе анти-PD-L1антитела) на основе данных секвенирования РНК сингенной модели мыши

Величину экспрессии FPKM рассчитывают методом RSEM (версия 1.2.31) на основе данных секвенирования РНК мышиной модели сингенной трансплантации опухоли с использованием мышей hCD137 KI (описано в контрольном примере 6-3). Список эталонных мРНК (список генов) представлен GRCm38. В качестве клеточной линии используют MC38. Было 4 группы: контрольный разбавитель, группа, получавшая A551-MB110/B379-ml0r, группа, в которой вводили антитело против мышиного PD-L1 (BioXcell, клон 10F.9G2), комбинированная группа, получавшая A551-MB110/B379-ml0r и антитело против мышиного PD-L1.

Единица была преобразована из [FPKM] в [FPKM + 1] путем добавления 1 к уровню экспрессии на единицу FPKM. Это связано с тем, что логарифмическое преобразование невозможно, если величина экспрессии равна 0, поэтому добавляют минимальное значение. После этого осуществляют конверсию log2.

Затем гены мыши были определены ортологи человека. В принципе, они были определены в соответствии с набором данных NCBI HomoloGene. Однако, хотя силами NCBI HomoloGene ортология не определялась, ортология отдельно рассматривалась для CXCL9 человека и Cxcl9 мыши, а также GZMB человека и Gzmb мыши, и была присвоена на веб-странице NCBI gene по состоянию на сентябрь 2019 г. Затем группа генов, связанных с иммунитетом к опухоли (все 54 гена, включая CD3D, CD8A и т.д.), была собрана из литературных источников, связанных с иммунитетом к опухоли. Затем для исследования был выбран 51 ген из 54 генов, исключая гены без мышиных ортологов.

Затем из списка генов GRCm38 (списка мРНК), полученного из RNA-seq, были выбраны только гены из вышеуказанной группы генов, связанных с иммунологией опухолей. Поскольку RNA-seq представляет собой данные мыши, а группа генов, связанных с иммунитетом к опухоли, представляет собой группу генов человека, она была преобразована ортологом для получения группы генов мыши. Затем была построена тепловая карта с помощью программы на языке программирования R. В работе тепловая карта была стандартизирована таким образом, что среднее значение всех образцов равнялось 0, а дисперсия равнялась 1 для каждого гена. Изменение среднего уровня экспрессии каждого гена отображается путем градации (фиг. 12).

(6-3) Оценка внутриопухолевого действия анти-CD137 антитела в качестве отдельного агента или в комбинации с анти-PD-L1 антителом (экспрессия CD8 и экспрессия PD-L1 в опухолевой ткани)

(6-3-1) Получение клеточной линии и мышиной модели сингенной трансплантации опухоли, а также метод оценки внутриопухолевого действия

В этом исследовании используют клетки MC38 линии клеток рака толстой кишки мыши, лицензированные Национальным институтом рака США, и мышей hCD137 KI (описанных в контрольном примере 6-3). Линию клеток MC38 трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, и модель считают сформированной, когда объем опухоли достиг приблизительно 100 мм^3. После создания модели мышей с трансплантированной клеточной линией MC38 объединяют в группы, а затем в дозах, показанных в табл. 19, вводят A551-MB110/B379-ml0r и антитело против мышиного PD-L1 (BioXcell, клон 10F.9G2). Введение A551-MB110/B379-ml0r вводят однократно через 14 дней после трансплантации через хвостовую вену. Введение антител против мышиного PD-L1 проводили однократно через 14 дней после трансплантации внутрибрюшинно. ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют для контроля разбавителя.

Оценку внутриопухолевого действия анализируют, используя в качестве индикатора увеличение экспрессии CD8 и экспрессии PD-L1 в опухолевой ткани. Экспрессию CD8 и экспрессию PD-L1 оценивают с помощью иммуногистохимического окрашивания. В этих оценках, если уровень экспрессии CD8 или уровень экспрессии PD-L1 в опухолевой ткани в группе животных, которым вводили один агент A551-MB110/B379-ml0r, в группе животных, которым вводили один агент против мышиного PD-L1, или в группе введения животным комбинации агента A551-MB110/ B379-ml0r и антитела против мышиного PD-L1, было выше по сравнению с контрольной группой, получавшей разбавитель, или было выше в комбинированной группе по сравнению с группами, получавшими каждый агент по отдельности, причем установлено, что количество клеток CD8+ или PD-1 экспрессирующих клеток стало больше.

Таблица 19.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза	День введения	Способ введения	День взятия образцов
1	3	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-	14 день после трансплантации	Через хвостовую вену и внутрибрюшинно	16 день после трансплантации
2	3	A551-MB110/B379-ml0r	2,5	14 день после трансплантации	Через хвостовую вену	16 день после трансплантации
3	3	Anti-mouse PD-L1 антитело	10	14 день после трансплантации	Внутрибрюшинно	16 день после трансплантации
4	3	A551-MB110/B379-ml0r	2,5	14 день после трансплантации	Через хвостовую вену	16 день после трансплантации
		Anti-mouse PD-L1 антитело	10		Внутрибрюшинно	

<u>(6-3-2) Иссечение опухолевой ткани у мышей с трансплантированной клеточной линией MC38 и подготовка образцов опухолевой ткани</u>

Иссеченные ткани опухоли погружают в 10% нейтральный забуференный раствор формалина на 1 сутки. Опухолевые ткани заливают в парафин, затем делают срезы и подвергают иммуногистохимическому окрашиванию.

<u>(6-3-3) Иммуногистохимическое окрашивание образцов опухолевой ткани от мышей с трансплантированной клеточной линией MC38 и оценка инфильтрации клеток CD8+ и клеток PD-L1+ в ткань опухоли</u>

Для иммуногистохимического окрашивания CD8 используют анти-CD8α антитело (Cell Signaling Technology, клон D4W2Z) и набор OptiView DAB (Ventana Medical Systems). Anti-rabbit-HQ антитело и HRP-меченное анти-HQ антитело используют в качестве вторичного антитела для детекции и третичного антитела для детекции. Поликлональное анти-PD-L1 антитело (фирма R&D) и набор UltraView DAB (фирма Ventana Medical Systems) используют для иммуногистохимического окрашивания PD-L1. HRP-меченое антикозье антитело используют в качестве вторичного антитела для обнаружения. Для окрашивания используют автокраситель BenchMark XT (фирма Ventana Medical Systems).

Результаты иммуногистохимического окрашивания CD8 показаны на фиг. 13, а результаты иммуногистохимического окрашивания PD-L1 показаны на фиг. 14. В группе комбинации A551-MB110/B379-ml0r и антитела против мышиного PD-L1 наблюдают повышенную экспрессию CD8 и PD-L1 в опухолевых тканях по сравнению с группой введения контрольного разбавителя и группами введения каждого агента по отдельности. Кроме того, в группе введения только одного агента A551-MB110/B379-ml0r и в группе введения только одного антитела против мышиного PD-L1 экспрессия CD8 и PD-L1 в опухолевой ткани была повышена по сравнению с контрольной группой введения разбавителя.

Кроме того, цифровые изображения высокого разрешения всех тканей иммуногистохимически окрашенных образцов получают с использованием системы сканера патологии для светлопольных микроскопов (сканер слайдов Aperio ScanScope CS2, Leica Biosystems) и 20-кратных линз. Для измерения положительных по иммуногистохимическому окрашиванию клеток CD8 или PD-L1 в опухолях используют алгоритм анализа «Immune Cell v1.3» или «Membrane v1.7» в программном обеспечении для анализа изображений HALO (Indica Labs, v2.3), соответственно. Области опухоли в каждой ткани вручную отмечает патологм и исследует. Количество всехз положительных клеток указываютотносительно площади опухоли (мм^2). Качество положительного порога по анализу цифрового изображения проверяют визуально (фиг. 82, 83 и 84).

Из приведенных выше результатов следует, что однократное введение агента A551-MB110/B379-ml0r и антитела против мышиного PD-L1 увеличивает количество клеток CD8+ и клеток PD-L1+ в опухолевой ткани. Кроме того, показано, что комбинированное введение A551-MB110/B379-ml0r и антитела против мышиного PD-L1 дополнительно увеличивает количество клеток CD8+ и клеток PD-L1+ в опухолевой ткани по сравнению с введением каждого из них по отдельности. Поскольку клетки CD8$^+$ обладают цитотоксической активностью в отношении раковых клеток, предположительно более сильный противоопухолевый эффект проявляется при увеличении числа клеток $CD8^+$ в опухолевой ткани. В данном исследовании экспрессия PD-L1 индуцируется генами, связанными с противоопухолевым иммунитетом, такими как IFN-γ (см. фиг. 12), и клетки $PD\text{-}L1^+$ играют роль в подавлении аномально активированного иммунного ответа. Как упоминалось выше, показано, что гены, связанные с противоопухолевым иммунитетом, повышены в группе введения A551-MB110/B379-ml0r (пример 6-2, фиг. 12). Предположительно в комбинированной группе A551-MB110/B379-ml0r и антитела против мышиного PD-L1 получают более сильный противоопухолевый эффект, поскольку антитело против мышиного PD-L1 ингибирует действие PD-L1. Полагают, что эти события способствуют сильной эффективности комбинированного введения, показанного в примере 6-1.

(6-4) Оценка действия на печень и внутриопухолевого действия анти-CD137-антитела в качестве отдельного агента или в комбинации с анти-PD-L1-антителом

(6-4-1) Получение клеточной линии и мышиной модели сингенной трансплантации опухоли, а также метод оценки действия на печень и внутриопухолевого действия

В этом исследовании используют клетки MC38 линии клеток рака толстой кишки мыши, лицензированные Национальным институтом рака США, и мышей hCD137 KI (описанных в контрольном примере 6-3). Линию клеток MC38 трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, и модель считалась сформированной, когда объем опухоли достиг приблизительно 111-200 мм^3. После формирования модели мышей с трансплантированной клеточной линией MC38 объединяют в группы, а затем в дозах, показанных в табл. 20, вводят A551-MB110/B379-ml0r и антитело против мышиного PD-L1 (BioXcell, клон 10F.9G2). Введение A551-MB110/B379-ml0r осуществляют дважды, через 11 и 14 дней после трансплантации через хвостовую вену. Введение антител против мышиного PD-L1 проводят дважды, через 11 и 14 дней после трансплантации, внутрибрюшинно. ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют для контроля разбавителя.

Действие на печень оценивают с использованием крови, собранной через 4 дня после первого введения. Полученную кровь центрифугируют и отделяют плазму. Измерения различных маркеров в плазме оценивают методами, подробно описанными ниже. При оценке каждого из этих показателей, когда показатели, свидетельствующие о дисфункции печени выше в группе монотерапии A551-MB110/B379-ml0r, в группе монотерапии антителом против мышиного PD-L1 или в группе комбинированного применения A551-MB110/B379-ml0r и антитела против мышиного PD-L1, при сравнении с контрольной группой с разбавителем, оценивают, что функция печени повреждена.

Для оценки внутриопухолевой реакции опухолевые ткани удаляют через 4 дня после первоначального введения методом, подробно описанным ниже, и измеряют количество клеток во фракциях лимфоцитов. В этой оценке, если количество клеток $CD8^+$ в опухолевых тканях выше в группе с одним агентом A551-MB110/B379-ml0r, в группе с одним агентом против мышиного PD-L1 или в комбинированной группе с агентом A551-MB110/B379-ml0r и антителом против мышиного PD-L1 по сравнению с контрольной группой разбавителя, было установлено, что пролиферация $CD8^+$ T-клеток в опухолевой ткани стимулируется.

Таблица 20.

<table>
<tr><th>Группа</th><th>Число</th><th>Фармацевтическое средство</th><th>Доза (мг/кг)</th><th>День введения</th><th>Способ введения</th><th>День отбора образцов</th></tr>
<tr><td>1</td><td>5</td><td>Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)</td><td>-</td><td rowspan="7">11 и 14 дней после трансплантации</td><td>Через хвостовую вену и внутрибрюшинно</td><td>15 дней после трансплантации</td></tr>
<tr><td rowspan="2">2</td><td rowspan="2">5</td><td>A551-MB110/ B379-ml0r</td><td>2.5</td><td>Через хвостовую вену</td><td rowspan="2">15 дней после трансплантации</td></tr>
<tr><td>Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)</td><td>-</td><td>Внутрибрюшинно</td></tr>
<tr><td rowspan="2">3</td><td rowspan="2">5</td><td>Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)</td><td>-</td><td>Через хвостовую вену</td><td rowspan="2">15 дней после трансплантации</td></tr>
<tr><td>Anti-mouse PD-L1 антитело</td><td>10</td><td>Внутрибрюшинно</td></tr>
<tr><td rowspan="2">4</td><td rowspan="2">5</td><td>A551-MB110/ B379-ml0r</td><td>2.5</td><td>Через хвостовую вену</td><td rowspan="2">15 дней после трансплантации</td></tr>
<tr><td>Anti-mouse PD-L1 антитело</td><td>10</td><td>Внутрибрюшинно</td></tr>
</table>

(6-4-2) Оценка значений маркеров функции печени путем тестирования крови мышей с трансплантированной клеточной линией MC38

Маркеры функции печени в образцах крови измеряют с помощью системы для тестирования образцов TBA-120FR (фирма Canon Medical Systems).

В результате такого измерения маркера функции печени с помощью анализа крови не наблюдают изменений значений АСТ и АЛТ ни в одной из групп, получавших только A551-MB110/B379-ml0r, только антитела против мышиного PD-L1, и комбинированно A551-MB110/B379-ml0r с антителом против мышиного PD-L1, по сравнению с группой, получавшей разбавитель (фиг. 15).

Из вышеизложенного следует, что ни A551-MB110/B379-ml0r, ни антитело против мышиного PD-L1 не нарушают функцию печени.

(6-4-3) Иссечение опухолевой ткани у мышей с трансплантированной клеточной линией MC38 и подготовка фракций лимфоцитов

Количество клеток во фракциях лимфоцитов измеряют для иссеченных опухолевых тканей. Фракции лимфоцитов, полученные с использованием набора для диссоциации опухоли мышей (фирма Miltenyi Biotec), используют для измерения количества клеток во фракциях лимфоцитов.

(6-4-4) Оценка фракций лимфоцитов, полученных от мышей с трансплантированной клеточной линией MC38

В результате измерения количества клеток во фракциях лимфоцитов с помощью FCM было отмечено увеличение количества $CD8^+$ T-клеток в опухолевой ткани для группы, получавшей комбинацию A551-MB110/B379-ml0r и антитела против мышиного PD-L1 по сравнению с группой, получавшей разбавитель (фиг. 16).

Исходя из вышеизложенного, комбинированное применение A551-MB110/B379-ml0r и антитела против мышиного PD-L1 способствует пролиферации $CD8^+$ T-клеток в опухоли.

Пример 7. Оценка противоопухолевой активности анти-CD137-антитела в качестве отдельного агента или в комбинации с анти-PD-L1-антителом на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (клетки LLC1/OVA/GPC3 клона C5)

В этом исследовании используют собственную линию клеток рака легких мышей LLC1/OVA/GPC3 клон C5 (описание в контрольном примере 9-4-1) и мышей hCD137 KI (описание в контрольном примере 6-3). Линию клеток LLC1/OVA/GPC3 клона C5 трансплантируют подкожно мышам, которых объединяют в группы, когда объем опухоли достигает 148-495 мм^3. Формирование групп проводят через 11 дней после трансплантации. Контрольный разбавителя и A551-MB110/B379-ml0r вводят в хвостовую вену мышей через 11 дней и 14 дней после трансплантации, как показано в табл. 21 ниже. Кроме того, контрольный разбавитель и антитело против мышиного PD-L1 (BioXcell, клон: 10F.9G2) вводят мышам внутрибрюшинно через 11 дней и 14 дней после трансплантации, как показано в табл. 21 ниже. ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют в качестве контроля разбавителя.

Таблица 21.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	Способ введения
1	5	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-	11 и 14 дней после трансплантации	Через хвостовую вену и внутрибрюшинно
2	5	A551-MB110/B379-ml0r	0,093		Через хвостовую вену
		Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-		Внутрибрюшинно
3	5	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-		Через хвостовую вену
		Anti-mouse PD-L1 антитело	10		Внутрибрюшинно
4	5	A551-MB110/B379-ml0r	0,093		Через хвостовую вену
		Anti-mouse PD-L1 антитело	10		Внутрибрюшинно

Объем опухоли измеряют через 11 дней, 14 дней, 17 дней, 20 дней, 25 дней, 28 дней, 31 день и 35 дней после трансплантации. Объем опухоли (TV) рассчитывали по следующей формуле:

Объем опухоли (мм^3) = длина (мм) × ширина (мм) × ширина (мм)/2

В результате средний объем опухоли в группе, получавшей комбинацию A551-MB110/B379-ml0r и антитела против мышиного PD-L1, через 35 дней после трансплантации составил 782 мм^3, а средний объем опухоли в группе введения только A551-MB110/B379-ml0r составила 1812 мм^3 (табл. 22). Таким образом, группа, получавшая комбинацию A551-MB110/B379-ml0r и антитела против мышиного PD-L1, продемонстрировала более сильный эффект подавления роста опухоли, чем группа, получавшая только одно средство A551-MB110/B379-ml0r или группа, получавшая только одно средство антитело против мышиного PD-L1. В частности, даже несмотря на то, что эффект подавления роста опухоли в группе монотерапии антителом против мышиного PD-L1 практически отсутствует по сравнению с контрольным разбавителем, наблюдается сильный эффект подавления роста опухоли в группе комбинированного введения A551-MB110/B379-ml0r и антитела против мышиного PD-L1 (фиг. 17). Следовательно, это свидетельствует о том, что комбинированное использование A551-MB110/B379-ml0r и ингибитора иммунных контрольных точек эффективно для тех типов рака, для которых лечение ингибиторами иммунных контрольных точек, такими как ингибиторы PD1 и/или PD-L1, недостаточно эффективно.

Таблица 22

Введенное антитело	Доза (мг/кг)	Объем опухоли (мм^3) на 35 день после трансплантации опухоли
A551-MB110/B379-ml0r	0,093	1812
A551-MB110/B379-ml0r	0,093	782
Anti-mouse PD-L1 антитело	10	

Пример 8-1. Оценка противоопухолевой активности анти-CD137-антитела в качестве отдельного агента или в комбинации с анти-PD-L1-антителом на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (клетки C1498)

В этом исследовании используют мышиную линию клеток AML (острый миелоидный лейкоз) C1498 (ATCC, ITEM Number: TIB-49) и мышей hCD137 KI (описанных в контрольном примере 6-3). Клеточную линию C1498 трансплантируют подкожно мышам, которых объединяют в группы, когда объем опухоли достигает 173-381 мм^3. Формирование групп проводят через 8 дней после трансплантации. Контрольный разбавитель, антитело A375-mIgG1/B167-ml0r и антитело против мышиного PD-L1 (BioXcell, клон 10F.9G2) вводят в хвостовую вену мышей через 8 и 12 дней после трансплантации, как показано ниже в таблице 23. ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют в качестве контроля растворителя.

Таблица 23.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	Способ введения
1	5	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-	8 и 12 дней после трансплантации	Через хвостовую вену
2	5	A375-mIgG1/B167-ml0r	7,5		
3	5	Anti-mouse PD-L1 антитело	5		
4	5	A375-mIgG1/B167-ml0r	7,5		
		Anti-mouse PD-L1 антитело	5		

Объем опухоли (TV) измеряют через 8 дней, 10 дней, 12 дней и 15 дней после трансплантации.

Объем опухоли рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли (мм^3) = длина (мм) × ширина (мм) × ширина (мм)/2

Ингибирование роста опухоли (TGI (%)) рассчитывают по следующим формулам.

Изменение TV (мм^3) = объем опухоли на момент измерения - объем опухоли на момент формирования группы

TGI (%) = (1- (Среднее значение изменения TV для каждой группы/Среднее значение изменения TV для группы контроля разбавителя)) × 100

В результате в отношении клеток C1498 наблюдают усиление эффекта подавления роста опухоли для группы, получавшей комбинацию A375-mIgG1/B167-ml0r и антитела против мышиного PD-L1, по сравнению с группой, получавшей только один агент A375-mIgG1/B167-ml0r, или с группой, получавшей только антитело против мышиного PD-L1. В частности, степень подавления роста опухоли в группе, получавшей только одно средство A375-mIgG1/B167-ml0r, составляет 62%, тогда как в группе, получавшей комбинацию A375-mIgG1/B167-ml0r и антитела против мышиного PD-L1, она составляет 82% (фиг. 18, табл. 24).

Таблица 24.

Введенное антитело	Доза (мг/кг)	TGI (%) на 15 день после трансплантации опухоли
A375-mIgG1/B167-ml0r	7,5	62
A375-mIgG1/B167-ml0r	7,5	82
Anti-mouse PD-L1 антитело	5	

Пример 8-2. Оценка противоопухолевой активности отдельного агента переключающего анти-CD137-антитела или комбинации переключающего анти-CD137-антитела и анти-TIGIT антитела на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (клетки C1498)

В этом исследовании используют мышиную линию клеток AML (острый миелоидный лейкоз) C1498 (номер ATCC ITEM: TIB-49) и мышей hCD137 KI (описанных в контрольном примере 6-3). Линию клеток C1498 трансплантируют подкожно в правую часть брюшной полости мышей и группируют через 7 дней после трансплантации. Для группировки используют индивидов с объемом опухоли приблизительно от 270 до 546 мм^3. Разбавитель и антитело A551-MB110/B379-ml0r вводят в хвостовую вену мышей через 7 дней после трансплантации. Разбавитель и анти-TIGIT антител (клон: 1G9; каталожный номер: BE0274; BioXcell) вводят внутрибрюшинно мышам через 7 дней, 9 дней, 11 дней, 13 дней, 15 дней и 18 дней после трансплантации, как показано в таблице ниже. В качестве разбавителя используют ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20.

Таблица 86.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза или введенное количество на одно животное	День введения (после трансплантации)	Способ введения
1	5	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-	7	Через хвостовую вену
		Разбавитель	-	7, 9, 11, 13, 15, 18	Внутрибрюшинно
2	5	A551-MB110/B379-ml0r	2,5 мг/кг	7	Через хвостовую вену
		Разбавитель	-	7, 9, 11, 13, 15, 18	Внутрибрюшинно
3	5	Разбавитель	-	7	Через хвостовую вену
		Anti-mouse TIGIT антитело	200 мкг/мышь	7, 9, 11, 13, 15, 18	Внутрибрюшинно
4	5	A551-MB110/B379-ml0r	2,5 мг/кг	7	Через хвостовую вену
		Anti-mouse TIGIT антитело	200 мкг/мышь	7, 9, 11, 13, 15, 18	Внутрибрюшинно

Объем опухоли измеряют через 7 дней, 9 дней, 11 дней, 13 дней, 15 дней, 17 дней, 19 дней, 22 дня, 25 дней, 27 дней, 29 дней и 32 дня после трансплантации. Индивидов подвергают эвтаназии в соответствии с внутренними стандартами эвтаназии, когда объем опухоли превышал 10% от массы тела, превращая объем опухоли 1000 мм^3 в 1 г. Для каждой группы рассчитывают средний объем опухоли, пока все индивиды были живы.

Объем опухоли рассчитывали по следующей формуле:

Объем опухоли (мм^3) = длина (мм) × ширина (мм) × ширина (мм)/2

В результате подавляющий рост опухоли эффект наблюдают как для обоих случаев применения единственного агента переключаемого анти-CD137-антитела A551-MB110/B379-ml0r, так и для комбинации переключающего анти-CD137-антитела A551-MB110/B379-ml0r и анти-TIGIT антитела.

Через 22 дня после трансплантации средний объем опухоли в группе, получавшей однократное введение анти-CD137-антитела A551-MB110/B379-ml0r, составил 1588 мм^3, а средний объем опухоли в группе комбинации анти-CD137-переключаемого антитела A551-MB110/B379-ml0r и анти-TIGIT антитела составляет 734 мм^3. Эффект подавления роста опухоли, как правило, сильнее в группе, которой вводили комбинацию переключающего анти-CD137 антитела и анти-TIGIT антитела, по сравнению с группой, которой вводили только одно переключающее анти-CD137антитело (фиг. 105).

<u>Пример 9. Оценка противоопухолевой активности анти-CD137-антитела в качестве отдельного агента или в комбинации с анти-PD-L1-антителом на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (клетки AE17)</u>

В этом исследовании используют мышиные клетки злокачественной мезотелиомы AE17 (фирма DS Pharma Biomedical) и мыши hCD137 KI (описанные в контрольном примере 6-3). Пассированные *in vivo* опухоли AE17 трансплантируют подкожно мышам, которых объединяют в группы, когда объем опухоли достигает 70-306 мм^3. Формирование групп проводят через 9 дней после трансплантации. Контроль разбавителя, A375-mIgG1/B167-ml0r и антитело против мышиного PD-L1 (фирма BioXcell, клон 10F.9G2) вводят в хвостовую вену мышей через 9 и 12 дней после трансплантации, как показано в табл. 25 ниже. ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют в качестве контроля разбавителя.

Таблица 25.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения (после трансплантации)	Способ введения
1	5	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-	9 и 12 дней после трансплантации	Через хвостовую вену
2	5	A375-mIgG1/B167-ml0r	7,5		
3	5	Anti-mouse PD-L1 антитело	5		
4	5	A375-mIgG1/B167-ml0r	7,5		
		Anti-mouse PD-L1 антитело	5		

Объем опухоли измеряют через 9 дней, 12 дней, 15 дней и 19 дней после трансплантации.

Объем опухоли рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли (мм^3) = длина (мм) × ширина (мм) × ширина (мм)/2

Ингибирование роста опухоли (TGI (%)) рассчитывают по следующим формулам:

Изменение TV (мм^3) = объем опухоли в момент измерения - объем опухоли на момент формирования группы

TGI (%) = (1- (Среднее значение изменения TV для каждой группы/Среднее значение изменения TV для группы контроля разбавителя)) × 100

В результате в отношении клеток AE17 наблюдают усиление эффекта подавления роста опухоли для группы, получавшей комбинацию A375-mIgG1/B167-ml0r и антитела против мышиного PD-L1, по сравнению с группой, получавшей только один агент A375-mIgG1/B167-ml0r, или с группой только одного агента против мышиного антитела PD-L1. В частности, степень подавления роста опухоли в группе, получавшей только одно средство A375-mIgG1/B167-ml0r, составляет 39 %, в то время как в группе, получавшей комбинацию A375-mIgG1/B167-ml0r и антитела против мышиного PD-L1, она составляет 60 % (фиг. 19, табл. 26).

Таблица 26.

Введенное антитело	Доза (мг/кг)	TGI (%) на 19 день после трансплантации опухоли
A375-mIgG1/B167-ml0r	7,5	39
A375-mIgG1/B167-ml0r	7,5	60
Anti-mouse PD-L1 антитело	5	

Пример 10. Оценка анти-CD137 антитела в качестве единственного агента или в комбинации с анти-hGPC3-mCD антителом с помощью модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (клетки LLC1/hGPC3)

(10-1) Получение клеточной линии и мышиной модели трансплантации сингенной опухоли и оценка противоопухолевой активности A551-MB110/B379-ml0r (один агент или комбинация)

В этом исследовании используют собственную линию клеток рака легких мышей LLC1/hGPC3 (*Science Translational Medicine*, 2017 г., 9 (410), eaal4291) и мышей hCD137 KI (описанных в контрольном примере 6-3). Линию клеток LLC1/hGPC3 трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, из которых формируют группы, когда объем опухоли достигает примерно 287 мм^3. Формирование групп проводят через 11 дней после трансплантации. Контрольный разбавитель, антитело A551-MB110/B379-ml0r и антитело против hGPC3-mCD3 (биспецифическое антитело, которое связывается с GPC3 человека и CD3 мыши) вводят в хвостовую вену мышей через 11 дней после трансплантации, как показано в табл. 27 ниже. ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют в качестве контроля разбавителя.

Таблица 27.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	Способ введения
1	5	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-	11 дней после трансплантации	Через хвостовую вену
2	5	A551-MB110/B379-ml0r антитело	2,5		
3	5	Anti-hGPC3-mCD3 антитело	1,0		
4	5	A551-MB110/B379-ml0r антитело	2,5		
		Anti-hGPC3-mCD3 антитело	1,0		

Объем опухоли измеряют через 11 дней, 14 дней, 17 дней и 21 день после трансплантации.

Объем опухоли рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли (мм^3) = длина (мм) × ширина (мм) × ширина (мм)/2

Результаты показаны на фиг. 20. Средний объем опухоли в контрольной группе, получавшей разбавитель, составляет 2393 мм^3 через 21 день после трансплантации. Средние объемы опухоли в группе, получавшей только одно антитело против hGPC3-mCD3, в группе, получавшей только одно антитело A551-MB110/B379-ml0r, и в группе, получавшей комбинацию анти-hGPC3-mCD3 антитела и A551-MB110/B379-ml0r, составляет 1592 мм^3, 1340 мм^3 и 35 мм^3, соответственно. По сравнению с контрольной группой, получавшей разбавитель, группа, получавшая только одно средство A551-MB110/B379-ml0r, и группа, получавшая только одно средство антитела против hGPC3-mCD3, показали меньший средний объем опухоли. Кроме того, средний объем опухоли был значительно уменьшен в группе, получавшей комбинацию анти-hGPC3-mCD3 антитела и A551-MB110/B379-ml0r, по сравнению с группой, получавшей только одно средство A551-MB110/B379-ml0r, и группой, получавшей только одно средство антитела против hGPC3-mCD3.

Из вышеизложенного следует, что комбинированное применение антитела против hGPC3-mCD3 и A551-MB110/B379-ml0r синергетически усиливает противоопухолевое воздействие на мышей с нокином CD137 человека, несущих раковую опухоль LLC1/hGPC3.

<u>(10-2) Получение клеточной линии и мышиной модели с трансплантацией сингенной опухоли и способ оценки внутриопухолевой реакции</u>

В этом исследовании используют собственную линию клеток рака легких мышей LLC1/hGPC3 (*Science Translational Medicine*, 2017 г., 9 (410), eaal4291). Линию клеток LLC1/hGPC3 трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, из которых формируют группы, когда объем опухоли достигает примерно 230 мм^3. Формирование групп проводят через 10 дней после трансплантации. Контрольный разбавитель, антитело A551-MB110/B379-ml0r и антитело против hGPC3-mCD3 (биспецифическое антитело, которое связывается с GPC3 человека и CD3 мыши) вводят в хвостовую вену мышей через 10 дней после трансплантации, как показано в табл. 28 ниже. ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют в качестве контроля разбавителя.

Таблица 28.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	Способ введения
1	3	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-	10 дней после трансплан-тации	Через хвостовую вену
2	3	A551-MB110/B379-ml0r антитело	2,5		

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	Способ введения
3	3	Anti-hGPC3-mCD3 антитело	1,0		
4	3	A551-MB110/B379-ml0r антитело	2,5		
		Anti-hGPC3-mCD3 антитело	1,0		

Объем опухоли, учитываемый при указанном выше формировании групп, рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли (мм^3) = длина (мм) × ширина (мм) × ширина (мм)/2

Опухоли собирают через 13 дней после трансплантации. Собранные опухоли погружают в РНК-лейтер (QIAGEN) для хранения. Тотальную РНК экстрагировали из образцов опухоли с использованием набора RNeasy Mini (фирма QIAGEN). Уровень экспрессии гена тотальной РНК измеряют с использованием nCounter Pancancer Mouse Immune Profiling Panel (фирма NanoString Technologies) и анализатора nCounter Digital (фирма NanoString Technologies).

Измеренный уровень экспрессии генов анализируют с помощью nSolver (фирмаNanoString Technologies) и Microsoft Excel 2013 (фирма Microsoft). Среди генов, уровни экспрессии которых измерены, на график наносят уровни экспрессии Cd3e, Cd8b1, Gzmb, Prf1, Ifng, которые связаны с цитотоксической активностью Т-клеток (фиг. 21). По сравнению с контрольной группой, получавшей разбавитель, в группе, получавшей комбинацию A551-MB110/B379-ml0r и анти-hGPC3-mCD3 антитела, наблюдают повышенные уровни экспрессии генов Cd3e, Cd8b1, Gzmb и Prf1 (критерий Даннета, * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}001$)). По сравнению с группой, получавшей разбавитель, уровень экспрессии в группе, получавшей комбинацию A551-MB110/B379-ml0r и анти-hGPC3-mCD3, проявляется тенденция к увеличению даже для Ifng. По сравнению с группой, получавшей только одно средство A551-MB110/B379-ml0r, и группой, получавшей только одно средство антитело против hGPC3-mCD3, уровни экспрессии в группе комбинации A551-MB110/B379-ml0r и анти-hGPC3-mCD3 проявляется тенденция к увеличению для всех генов. Кроме того, уровни экспрессии генов, связанных с цитотоксической активностью, в каждой отдельной группе агентов имеют тенденцию к увеличению по сравнению с разбавителем.

Из вышеизложенного следует, что комбинированное применение A551-MB110/B379-ml0r и анти-hGPC3-mCD3 антитела индуцирует сильную внутриопухолевую реакцию в отношении мышей с опухолью LLC1/hGPC3 и с нокином CD137 человека.

Пример 11. Оценка противоопухолевой активности анти-CD137-антитела на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (клеточная линия рака молочной железы)

В этом исследовании используют общедоступную или устанавливаемую клеточную линию рака молочной железы и мышей hCD137 KI (с нокином). Линию клеток рака молочной железы трансплантируют мышам, которых объединяют в группы, когда объем опухоли достигает определенного уровня. Затем мышам вводят анти-CD137 антитело и разбавитель.

Объем опухоли измеряют несколько раз после трансплантации. Когда группа, которой вводили анти-CD137-антитело, показывает более высокую скорость подавления роста опухоли по сравнению с группой, которой вводили носитель, можно оценить, что анти-CD137-антитело обладает противоопухолевой активностью в отношении клеточной линии рака молочной железы.

Пример 12. Оценка монотерапии анти-CD137-антителом или комбинированной терапии с анти-PD-L1-антителом на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (клеточная линия рака молочной железы)

В этом исследовании используют общедоступную или устанавливаемую клеточную линию рака молочной железы и мышей hCD137 KI. Линию клеток рака молочной железы трансплантируют мышам, которых объединяют в группы, когда объем опухоли достигает определенного уровня. Затем мышам вводят только анти-CD137 антитело, только анти-PD-L1 антитело, комбинацию анти-CD137 антитела и анти-PD-L1 антитела или разбавитель.

Объем опухоли измеряют несколько раз после трансплантации. Когда группа, которой вводили анти-CD137 антитело, показывает более высокую скорость подавления роста опухоли по сравнению с группой, которой вводили разбавитель, можно сделать вывод, что анти-CD137-антитело обладает противоопухолевой активностью в отношении клеточной линии рака молочной железы. Кроме того, когда группа, получавшая комбинированное введение анти-

CD137-антитела и анти-PD-L1-антитела, демонстрирует более высокую степень подавления роста опухоли, чем группы, получавшая только одно средство, соответственно можно отметить синергетическое или аддитивное усиление подавления роста опухоли при комбинированном применении.

Пример 13. Оценка монотерапии анти-CD137 антителом или комбинированной терапии с анти-PD-L1 антителом и/или анти-TIGIT антителом на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (клеточная линия рака молочной железы)

В этом исследовании используют общедоступную или устанавливаемую клеточную линию рака молочной железы и мышей hCD137 KI. Линию клеток рака молочной железы трансплантируют мышам, которых объединяют в группы, когда объем опухоли достигает определенного уровня. После этого мышам вводят: (1) анти-CD137 антитело, (2) анти-PD-L1 антитело, (3) комбинацию двух агентов – анти-CD137 антитела и анти-PD-L1 антитела, (4) комбинацию двух агентов – анти-CD137 антитела и анти-TIGIT антитела, (5) комбинацию трех агентов – анти-CD137-антитела, анти-PD-L1-антитела и анти-TIGIT антитела, или (6) разбавитель.

Объем опухоли измеряют несколько раз после трансплантации. Когда группа, которой вводили анти-CD137-антитело, показывает более высокую степень подавления роста опухоли по сравнению с группой, которой вводили разбавитель, можно сделать вывод, что анти-CD137-антитело обладает противоопухолевой активностью в отношении клеточной линии рака молочной железы. Кроме того, если группа, получающая комбинированное введение двух агентов – анти-CD137 антитела и анти-PD-L1 антитела, или группа, получающая комбинированное введение двух агентов – анти-CD137 антитела и анти-TIGIT антитела, имеет более высокую степень подавления роста опухоли, чем при введении только одного агента, можно сделать вывод, что имеет место синергетическое или аддитивное усиление эффекта подавления роста опухоли при комбинированном применении. Кроме того, если комбинированная группа из трех агентов, состоящая из анти-CD137-антитела, анти-PD-L1-антитела и анти-TIGIT антитела, демонстрирует более высокую степень подавления роста опухоли, чем вышеупомянутые группы с одним агентом или комбинированные группы из двух агентов, можно сделать вывод, что имеет место синергетическое или аддитивное усиление эффекта подавления роста опухоли комбинацией трех агентов.

Пример 14. Оценка монотерапии анти-CD137 антителом или комбинированной терапии с анти-PD-L1 антителом и/или анти-TIGIT антителом на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (клеточная линия рака легких)

В этом исследовании используют общедоступную или устанавливаемую клеточную линию рака легкого и мышей hCD137 KI. Линию клеток рака легкого трансплантируют мышам, которых объединяют в группы, когда объем опухоли достигает определенного уровня. После этого мышам вводят: (1) анти-CD137 антитело, (2) анти-PD-L1 антитело, (3) комбинацию двух агентов – анти-CD137 антитела и анти-PD-L1 антитела, (4) комбинацию двух агентов – анти-CD137 антитела и анти-TIGIT антитела, (5) комбинацию трех агентов – анти-CD137-антитела, анти-PD-L1-антитела и анти-TIGIT антитела, или (6) разбавитель.

Объем опухоли измеряют несколько раз после трансплантации. Когда группа, которой вводили анти-CD137-антитело, показывает более высокую степень подавления роста опухоли по сравнению с группой, которой вводили разбавитель, можно сделать вывод, что анти-CD137-антитело обладает противоопухолевой активностью в отношении клеточной линии рака легкого. Кроме того, если группа, получающая комбинированное введение двух агентов – анти-CD137 антитела и анти-PD-L1 антитела, или группа, получающая комбинированное введение двух агентов – анти-CD137 антитела и анти-TIGIT антитела, имеет более высокую степень подавления роста опухоли, чем при введении только одного агента, можно сделать вывод, что имеет место синергетическое или аддитивное усиление эффекта подавления роста опухоли при комбинированном применении. Кроме того, если комбинированная группа из трех агентов, состоящая из анти-CD137-антитела, анти-PD-L1-антитела и анти-TIGIT антитела, демонстрирует более высокую степень подавления роста опухоли, чем вышеупомянутые группы с одним агентом или комбинированные группы из двух агентов, можно сделать вывод, что имеет место синергетическое или аддитивное усиление эффекта подавления роста опухоли комбинацией трех агентов.

Пример 15. Оценка монотерапии анти-CD137 антителом или комбинированной терапии с анти-PD-L1 антителом и/или анти-TIGIT антителом на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (линия клеток меланомы)

В этом исследовании используют общедоступную или устанавливаемую клеточную линию меланомы и мышей hCD137 KI. Линию клеток меланомы трансплантируют мышам, которых объединяют в группы, когда объем опухоли достигает определенного уровня. После этого мышам вводят: (1) анти-CD137 антитело, (2) анти-PD-L1 антитело, (3) комбинацию двух агентов – анти-CD137 антитела и анти-PD-L1 антитела, (4) комбинацию двух агентов – анти-CD137 антитела и анти-TIGIT антитела, (5) комбинацию трех агентов – анти-CD137-антитела, анти-PD-L1-антитела и анти-TIGIT антитела, или (6) разбавитель.

Объем опухоли измеряют несколько раз после трансплантации. Когда группа, которой вводили анти-CD137-антитело, показывает более высокую степень подавления роста опухоли по сравнению с группой, которой вводили разбавитель, можно сделать вывод, что анти-CD137-антитело обладает противоопухолевой активностью в отношении клеточной линии меланомы. Кроме того, если группа, получающая комбинированное введение двух агентов – анти-CD137 антитела и анти-PD-L1 антитела, или группа, получающая комбинированное введение двух агентов – анти-CD137 антитела и анти-TIGIT антитела, имеет более высокую степень подавления роста опухоли, чем при введении только одного агента, можно сделать вывод, что имеет место синергетическое или аддитивное усиление эффекта подавления роста опухоли при комбинированном применении. Кроме того, если комбинированная группа из трех агентов, состоящая из анти-CD137-антитела, анти-PD-L1-антитела и анти-TIGIT антитела, демонстрирует более высокую степень подавления роста опухоли, чем вышеупомянутые группы с одним агентом или комбинированные группы из двух агентов, можно сделать вывод, что имеет место синергетическое или аддитивное усиление эффекта подавления роста опухоли комбинацией трех агентов.

Пример 16: Оценка монотерапии анти-CD137-антителом или комбинированной терапии с анти-TIGIT-антителом на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (клеточная линия колоректального рака)

В этом исследовании используют общедоступную или устанавливаемую клеточную линию колоректального рака и мышей hCD137 KI. Линию клеток колоректального рака трансплантируют мышам, которых объединяют в группы, когда объем опухоли достигает определенного уровня. Затем мышам вводят какое-то одно из антител (анти-CD137 антитело или анти-TIGIT антител), комбинацию анти-CD137 антитела и анти-TIGIT антитела, или разбавитель.

Объем опухоли измеряют несколько раз после трансплантации. Когда группа, которой вводили анти-CD137-антитело, показывает более высокую степень подавления роста опухоли по сравнению с группой, которой вводили носитель, можно оценить, что анти-CD137-антитело обладает противоопухолевой активностью в отношении клеточной линии колоректального рака. Кроме того, когда группа, получавшая комбинированное введение анти-CD137-антитела и анти-TIGIT-антитела, демонстрирует более высокую степень подавления роста опухоли по сравнению с группой, получавшей любое одно средство, соответственно можно оценить, что имеет место синергетическое или аддитивное усиление подавления роста опухоли.

Пример 17: Оценка монотерапии анти-CD137 антителом или комбинированной терапии с анти-PD-L1 антителом и/или анти-TIGIT антителом на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (линия раковых клеток с нокаутом JAK1)

В этом исследовании используют общедоступную или устанавливаемую нокаутную линию раковых клеток JAK1 и мышей hCD137 KI. Линию раковых клеток с нокаутом JAK1 трансплантируют мышам, которых объединяют в группы, когда объем опухоли достигает определенного уровня. После этого мышам вводят: (1) анти-CD137 антитело, (2) анти-PD-L1 антитело, (3) комбинацию двух агентов – анти-CD137 антитела и анти-PD-L1 антитела, (4) комбинацию двух агентов – анти-CD137 антитела и анти-TIGIT антитела, (5) комбинацию трех агентов – анти-CD137-антитела, анти-PD-L1-антитела и анти-TIGIT антитела, или (6) разбавитель.

Объем опухоли измеряют несколько раз после трансплантации. Когда группа, которой вводили анти-CD137 антитело, демонстрирует более высокую степень подавления роста опухоли по сравнению с группой, которой вводили носитель, можно сделать заключение, что анти-CD137 антитело обладает противоопухолевой активностью в отношении нокаутной линии раковых клеток JAK1. Кроме того, при комбинированном введении двух агентов анти-CD137-антитела и анти-PD-L1-антитела или двух агентов в комбинации анти-CD137-антитела и анти-TIGIT-антитела наблюдается более высокая степень подавления роста опухоли, чем в этих группах введения только одного из этих агентов, поэтому можно сделать вывод о синергетическом или аддитивном усилении эффекта подавления роста опухоли при комбинированном применении. Кроме того, если комбинированная группа из трех агентов, состоящая из анти-CD137 антитела, анти-PD-L1 антитела и анти-TIGIT антитела, проявляет повышенную степень подавления роста опухоли, чем вышеупомянутые группы лечения с одним агентом или группы комбинированного лечения двумя агентами, можно сделать вывод, что имеет место синергетическое или аддитивное усиление эффекта подавления роста опухоли комбинацией из трех агентов.

Пример 18-1. Оценка монотерапии анти-CD137 антителом или комбинированной терапии с анти-PD-L1 антителом и/или анти-TIGIT антителом на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (линия раковых клеток с нокаутом B2M)

В этом исследовании используют общедоступную или устанавливаемую линию раковых клеток с нокаутом B2M и мышей hCD137 KI. Линию раковых клеток с нокаутом B2M трансплантируют мышам, которых объединяют в группы, когда объем опухоли достигает определенного уровня. После этого мышам вводят: (1) анти-CD137 антитело, (2) анти-PD-L1 антитело, (3) комбинацию двух агентов – анти-CD137 антитела и анти-PD-L1 антитела, (4) комбинацию двух агентов – анти-CD137 антитела и анти-TIGIT антитела, (5) комбинацию трех агентов – анти-CD137-антитела, анти-PD-L1-антитела и анти-TIGIT антитела, или (6) разбавитель.

Объем опухоли измеряют несколько раз после трансплантации. Когда группа, которой вводили анти-CD137 антитело, показывает более высокую степень подавления роста опухоли по сравнению с группой, которой вводили разбавитель, можно сделать заключение, что анти-CD137 антитело обладает противоопухолевой активностью в отношении клеточной линии раковых клеток с нокаутом B2M. Кроме того, когда группа, получавшая комбинированное введение анти-CD137 антитела и анти-TIGIT антитела, демонстрирует более высокую степень подавления роста опухоли по сравнению с группой, получавшей любое одно из этих средств, соответственно можно оценить, что имеет место синергетическое или аддитивное усиление подавления роста опухоли при комбинированном применении. А также, если комбинированная группа из трех агентов, состоящая из анти-CD137 антитела, анти-PD-L1 антитела и анти-TIGIT антитела, демонстрирует более высокую степень подавления роста опухоли, чем вышеупомянутые группы лечения одним агентом или группы комбинированного лечения с двумя агентами, можно сделать вывод, что имело место синергетическое или аддитивное усиление эффекта подавления роста опухоли комбинацией из трех агентов.

<u>Пример 18-2. Оценка противоопухолевой активности анти-CD137-антитела-переключателя на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI</u>

<u>(18-2-1) Получение линии опухолевых клеток, мышиной модели сингенной трансплантации опухоли и способ оценки противоопухолевой активности</u>

Известно, что опухоли с мутацией в гене β2-микроглобулина (B2M) (мутация b2m) устойчивы к лечению антителами к PD-1, антителами к PD-L1 и т.д. (Sharma P. с соавт., *Cell*, 2017, 168(9), 707-723; Zaretsky J.M. с соавт., *N Engl J Med.*, 2016, 375(9):819-829).

В этом исследовании используют собственную линию клеток рака толстой кишки мыши MC38-hGPC3#G64 B2M KO клон 5 с нокаутом гена микроглобулина β2 (B2M) и мышей hCD137 KI (описанных в контрольном примере 6-3). Клеточную линию MC38-hGPC3#G64 B2M KO клон 5 трансплантируют подкожно в правую брюшную полость мышей и группируют через 14 дней после трансплантации. Для формирования групп используют мышей с объемом опухоли от 111 до 228 мм^3. Переключающее анти-CD137 антитело A551-MB110/B379-ml0r вводят в хвостовую вену мышей через 14 дней и 21 день после трансплантации. В качестве носителя используют ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20.

Таблица 87.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	Способ введения
1	5	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-	14 и 21 день после трансплантации	Через хвостовую вену
2	5	A551-MB110/B379-ml0r	2,5		

Объем опухоли измеряют через 14 дней, 17 дней, 21 день, 24 дня, 27 дней и 31 день после трансплантации.

Объем опухоли рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли (TV) мм^3) = длина (мм) × ширина (мм) × ширина (мм)/2

Ингибирование роста опухоли (TGI (%)) рассчитывают по следующим формулам:

Изменение TV (мм^3) = объем опухоли на момент измерения - объем опухоли на момент формирования групп

TGI (%) = (1 - (Среднее значение изменения TV для каждой группы/Среднее значение изменения TV для группы контроля разбавителя)) × 100

В результате переключающее анти-CD137 антитело A551-MB110/B379-ml0r проявляет действие по подавлению роста опухоли с клетками MC38-hGPC3#G64 B2M KO клон 5 в течение всего периода наблюдения после трансплантации опухоли по сравнению с контролем; через 31 день после трансплантации опухоли степень подавления роста опухоли 29% (фиг. 106).

Было показано, что переключающее анти-CD137 антитело по настоящему изобретению обладает чрезвычайно значительной противоопухолевой активностью в отношении опухолей, имеющих мутацию b2m, которые, как известно, устойчивы к лечению анти-PD-1 антителами, анти- PD-L1 антителами и т.п.

<u>Пример 19. Оценка противоопухолевой активности анти-CD137-антитела в качестве отдельного агента или в комбинации с анти-PD-L1-антителом на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (клетки MC38)</u>

<u>(19-1) Получение линии опухолевых клеток, мышиной модели трансплантации сингенной опухоли и оценка противоопухолевой активности</u>

A551-MB110/B379-ml0r и UreH-MB110/UreL-mk1 (по отдельности или в комбинации с anti-mouse PD-L1 антителом)

В этом исследовании используют линии клеток MC38 рака толстой кишки мыши, лицензированные Национальным институтом рака США, и мышей hCD137 KI (описанных в контрольном примере 6-3). Линию клеток MC38 трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, и модель считают сформированной, когда объем опухоли достигет 106-200 мм^3. После того, как модель сформирована, мышей с трансплантированной клеточной линией MC38 объединяют в группы и затем вводят в разных дозах (табл. 77) переключающее антитело A551-MB110/B379-ml0r или непереключающее антитело UreH-MB110/UreL-mk1 (положительный контроль), и/или вводят anti-mouse PD-L1 антитело (фирма BioXcell, клон 10F.9G2). Введение переключающего антитела A551-MB110/B379-ml0r или непереключающего антитела UreH-MB110/UreL-mk1 осуществляют дважды, через 11 и 14 дней после трансплантации, через хвостовую вену. Anti-mouse PD-L1 антитело вводят внутрибрюшинно дважды, через 11 и 14 дней после трансплантации. ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют для контроля носителя.

Непереключающее антитело UreH-MB110/UreL-mk1, используемое в качестве положительного контроля, представляет собой непереключающее анти-CD137 антитело, которое имеет вариабельную область известного анти-CD137 антитела урелумаба (регистрационный номер CAS: 934823-49-1) в качестве вариабельной области, и MB110 (SEQ ID NO: 145), описанную в WO2014030750, как константную область тяжелой цепи, а также мышиную к-цепь mk1 (та же аминокислотная последовательность, что и у мышиной к-цепи mk0 (SEQ ID NO: 147)) в качестве константной области легкой цепи.

Таблица 77.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	Способ введения
1	8	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-	11 и 14 дней после трансплантации	Через хвостовую вену
		Разбавитель	-		Внутрибрюшинно
2	8	A551-MB110/B379-ml0r	2,5		Через хвостовую вену
		Разбавитель	-		Внутрибрюшинно
3	8	UreH-MB110/UreL-mk1	7,5		Через хвостовую вену
		Разбавитель	-		Внутрибрюшинно
4	8	Разбавитель	-		Через хвостовую вену
		Anti-mouse PD-L1 антитело	10		Внутрибрюшинно
5	8	A551-MB110/B379-ml0r	2,5		Через хвостовую вену
		Anti-mouse PD-L1 антитело	10		Внутрибрюшинно

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	Способ введения
6	8	UreH-MB110/UreL-mk1	7,5		Через хвостовую вену
		Anti-mouse PD-L1 антитело	10		Внутрибрюшинно

Объем опухоли измеряют через 10 дней, 14 дней, 18 дней, 22 дня, 25 дней, 29 дней и 32 дня после трансплантации.

Объем опухоли рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли (TV) мм^3) = длина (мм) × ширина (мм) × ширина (мм)/2

Ингибирование роста опухоли (TGI (%)) рассчитывают по следующим формулам:

Изменение TV (мм^3) = объем опухоли на момент измерения - объем опухоли на момент формирования групп

TGI (%) = (1 - (Среднее значение изменения TV для каждой группы/Среднее значение изменения TV для группы контроля разбавителя)) × 100

В результате, против клеток MC38, группа введения только одного агента, а именно переключающего антитела A551-MB110/B379-ml0r, группа комбинированного введения переключающего антитела A551-MB110/B379-ml0r и антитела против мышиного PD-L1, а также группа комбинированного введения непереключающего антитела UreH-MB110/UreL-mk1 и антитела против мышиного PD-L1 продемонстрировали значительный эффект по подавлению роста опухоли по сравнению с группой, получавшей разбавитель, причем показатели подавления роста опухоли составляют 78%, 109% и 81% соответственно (фиг. 85, табл. 78). Таким образом, показано, что , группа комбинированного введения переключающего антитела A551-MB110/B379-ml0r и антитела против мышиного PD-L1 обладает таким же или более высоким противоопухолевым эффектом, что и группа комбинированного введения переключающего антитела A551-MB110/B379-ml0r и антитела против мышиного PD-L1.

Таблица 78. Подавление роста опухоли на 32й день после трансплантации.

	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	A551-MB110/ B379-ml0r	UreH-MB110/UreL-mk1	Anti-mouse PD-L1 антитело	A551-MB110/ B379-ml0r + Anti-mouse PD-L1 антитело	UreH-MB110/UreL-mk1 + Anti-mouse PD-L1 антитело
Подавление роста опухоли (TGI)	-	78	77	63	109	81

Пример 20. Оценка системного действия анти-CD137 антитела в качестве отдельного агента или в комбинации с анти-PD-L1 антителом на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI

(20-1) Получение линии опухолевых клеток, мышиной модели трансплантации сингенной опухоли и способ оценки внутриопухолевого действия

В настоящем исследовании используют клетки MC38 линии клеток рака толстой кишки мыши, лицензированные Национальным институтом рака США, и мышей hCD137 KI (описанных в контрольном примере 6-3). Линию клеток MC38 трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, причем модель считалась установленной, когда объем опухоли достиг приблизительно 200 мм^3. После создания модели мышей с трансплантированной клеточной линией MC38 формируют группы и вводят в дозе, показанной в табл. 79, переключающее антитело A551-MB110/B379-ml0r и антитело против мышиного PD-L1 (BioXcell, клон 10F.9G2). В качестве положительного контроля вводят непереключающее анти-CD137 антитело UreH-MB110/UreL-mk1 (см. выше) и anti-mouse PD-L1 антитело.

Введение переключающего антитела A551-MB110/B379-ml0r или непереключающего антитела UreH-MB110/UreL-mk1 осуществляют дважды, через 15 и 18 дней после трансплантации в хвостовую вену. Введение anti-mouse PD-L1 антитела проводят внутрибрюшинно дважды через 15 и 18 дней после трансплантации. ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют для контроля разбавителя.

(20-2) Иссечение селезенки, опухолевых регионарных лимфатических узлов (DLN) и печени, подготовка фракции лимфоцитов и забор периферической крови у мышей с трансплантированной клеточной линией MC38

Периферическую кровь берут из нижней полой вены для забора крови. Выделение фракции лимфоцитов проводили из резецированной селезенки, регионарных лимфатических узлов опухоли и печени. Для резецированной селезенки и опухолевых регионарных лимфатических узлов измеряют массу органа перед выделением фракции лимфоцитов. Для регионарных лимфатических узлов селезенки и опухоли используют фракцию лимфоцитов, полученную с помощью клеточного фильтра после разрушения ткани. Для печени используют фракцию лимфоцитов, полученную путем разрушения ткани с использованием набора для диссоциации печени, мыши (фирма Miltenyi Biotec), а затем с помощью клеточного фильтра. Полученную периферическую кровь анализируют с помощью анализатора клеток крови, а полученную селезенку, опухолевые регионарные лимфатические узлы и фракции печеночных лимфоцитов анализируют с помощью жидкостной цитометрии (FCM).

Таблица 79.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	Способ введения	День отбора образцов
1	5	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-	15 и 18 день после трансплантации	Через хвостовую вену и внутрибрюшинно	19 дней после трансплантации
2	5	A551-MB110/B379-ml0r	2,5		Через хвостовую вену	
3	5	UreH-MB110/UreL-mk1	7,5		Через хвостовую вену	
4	5	Anti-mouse PD-L1 антитело	10		Внутрибрюшинно	
5	5	A551-MB110/B379-ml0r	2,5		Через хвостовую вену	
		Anti-mouse PD-L1 антитело	10		Внутрибрюшинно	
6	5	UreH-MB110/UreL-mk1	7,5		Через хвостовую вену	
		Anti-mouse PD-L1 антитело	10		Внутрибрюшинно	

(20-3) Оценка значений параметров крови с помощью анализа крови мышей с трансплантированной клеточной линией MC38.

Параметры крови измеряют с помощью тест-системы XT-2000iV (фирма Sysmex corp.) для проб крови.

Измерение параметров крови путем анализа крови не выявило изменений концентрации лейкоцитов, концентрации тромбоцитов и концентрации лимфоцитов в группе, в которой живогтным вводят только одно средство A551-MB110/B379-ml0r. В группе монотерапии anti-mouse PD-L1 антителом наблюдают незначительные колебания концентрации лейкоцитов и концентрации лимфоцитов, тогда как в группе введения комбинации A551-

MB110/B379-ml0r и anti-mouse PD-L1 антитела отмечают незначительные колебания концентрации лейкоцитов и концентрации лимфоцитов, сходные с таковыми в группе введения одного средства, а именно anti-mouse PD-L1 антитела (фиг. 86).

С другой стороны, в группе монотерапии UreH-MB110/UreL-mk1 наблюдают значительное снижение концентрации лейкоцитов и концентрации лимфоцитов (фиг. 86). Кроме того, в группе введения комбинации UreH-MB110/UreL-mk1 и anti-mouse PD-L1 антитела наблюдают снижение концентрации тромбоцитов в дополнение к значительному снижению концентрации лейкоцитов и концентрации лимфоцитов (фиг. 86).

Из вышеизложенного следует, что по сравнению с UreH-MB110/UreL-mk1, A551-MB110/B379-ml0r не вызывает колебаний параметров крови даже при использовании в комбинации с anti-mouse PD-L1 антителом, и его влияние на периферическую кровь крайне ограничено.

<u>(20-4) Оценка активации иммунных клеток путем измерения массы органов и анализа проточной цитометрии (FCM) с использованием мышей с трансплантированной клеточной линией MC38</u>

Оценка массы органов селезенки и регионарных лимфатических узлов опухоли (DLN) не показывает увеличения массы каждого органа в группе с одним агентом A551-MB110/B379-ml0r, в группе с одним агентом против мышиного PD-L1 и в группе комбинированного применения A551-MB110/B379. -ml0r и anti-mouse PD-L1 антитела (фиг. 87).

С другой стороны, в группе применения одного средства UreH-MB110/UreL-mk1 наблюдают увеличение массы каждого органа. Кроме того, в группе комбинации UreH-MB110/UreL-mk1 и anti-mouse PD-L1 антитела наблюдают более заметное увеличение массы каждого органа по сравнению с группой, получавшей только одно средство, а именно UreH-MB110/UreL-mk1 (фиг. 87).

Затем активацию T-клеток, полученных из селезенки, опухолевого регионарного лимфатического узла и печени, анализируют методом FCM. При оценке активации иммунных клеток с помощью FCM используют степень экспрессии маркеров активации в $CD8^+$ T-клетках, степень увеличения регуляторных T-клеток $Foxp3^+$ в $CD4^+$ T-клетках и степень увеличения регуляторных T-клеток $Foxp3^+$ в $CD45^+$ клетках. KLRG-1, ICOS, PD-1 и LAG-3 используют в качестве маркеров активации в CD8+ T-клетках. В анализе FCM применяют анти-CD45 антитело (фирма BD Biosciences), анти-CD3 антитело (фирма BioLegend), анти-CD8 антитело (фирма BioLegend), анти-CD4 антитело (фирма BioLegend), анти-KLRG-1 антитело (фирма BD Biosciences), анти-ICOS антитело (фирма BioLegend), анти-PD-1 антитело (BioLegend), анти-LAG-3 антитело (фирма BD Biosciences) и анти-Foxp3 антитело (фирма BD Biosciences). Для измерения используют BD LSR Fortessa X-20 (фирма фирма BD Biosciences).

В результате оценки в селезенке не было отмечено заметного повышения уровня экспрессии KLRG-1, ICOS, PD-1, LAG-3 в $CD8^+$ T-клетках, соотношения $CD8^+$ T-клеток, положительных по каждому из маркеров активации среди CD45+ клеток, а также соотношение регуляторных T-клеток Foxp3+ в T-клетках CD4+ и соотношение регуляторных T-клеток Foxp3+ в клетках CD45+ в группе, получавшей комбинацию A551-MB110/B379-ml0r и антитела против мышиного PD-L1, по сравнению с группой, получавшей комбинацию UreH-MB110/UreL-mk1 и антитела против мышиного PD-L1 (фиг. 88 и 89).

В результате оценки в опухолевых регионарных лимфатических узлах не было отмечено заметного повышения уровня экспрессии и абсолютного количества KLRG-1, ICOS, PD-1, LAG-3 в $CD8^+$ T-клетках, а также доли и абсолютного количества $Foxp3^+$ регуляторных T-клеток в $CD4^+$ T-клетках в группе, получавшей комбинацию A551-MB110/B379-ml0r и антитела против мышиного PD-L1, по сравнению с группой, получавшей комбинацию UreH-MB110/UreL-mk1 и антитела против мышиного PD-L1 (Фиг. 90). и 91).

В результате оценки в печени не было отмечено заметного повышения уровня экспрессии KLRG-1, ICOS, PD-1, LAG-3 среди CD8+ T-клеток, доли $CD8^+$ T-клеток, положительных по каждому маркеру активации, а также доли регуляторных T-клеток Foxp3+ среди $CD4^+$ T-клеток и доли регуляторных T-клеток $Foxp3^+$ среди $CD45^+$ клеток в группе введения комбинации A551-MB110/B379-ml0r и антитела против мышиного PD-L1 по сравнению с группой введения комбинации UreH-MB110/UreL-mk1 и антитела против мышиного PD-L1 (фиг. 92 и 93)

На основании вышеизложенного, несмотря на то, что переключающее антитело A551-MB110/B379-ml0r демонстрирует эффект подавления роста опухоли, сравнимый с непереключающим антителом UreH-MB110/UreL-mk1, даже при использовании в комбинации с антителом против мышиного PD-L1, его влияние на иммунные клетки в нормальных органах, таких как периферическая кровь, селезенка, опухолевые регионарные лимфатические узлы и печень, было крайне ограниченным.

Пример 21: Оценка распределения в тканях анти-CD137 антитела

(21-1) Получение линии опухолевых клеток и мышиной модели сингенной трансплантации опухоли, а также способ оценки распределения антител в тканях

В этом исследовании используют клетки MC38 линии клеток рака толстой кишки мыши, лицензированные Национальным институтом рака США, и мышей hCD137 KI (описанных в контрольном примере 6-3). Линию клеток MC38 трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, и модель считают установленной, когда объем опухоли достиг приблизительно 200 мм^3. После создания модели мышей с трансплантированной клеточной линией MC38 объединяют в группы, а затем в дозах, показанных в табл. 80, вводят Alexa488-меченное A551-MB110/B379-ml0r. В качестве вещества отрицательного контроля вводят Alexa 488-меченное IC17HdK-MB110/IC17L-mk. В качестве положительного контроля вводят непереключающее анти-CD137 антитело Alexa488-меченное UreH-MB110/UreL-mk1. Для мечения Alexa488 каждого антитела используют набор для мечения антител Alexa Fluor 488 (фирма Thermo Fisher Scientific). Введение Alexa488-меченого IC17HdK-MB110/IC17L-mk, или Alexa488-меченого A551-MB110/B379-ml0r, или Alexa488-меченого UreH-MB110/UreL-mk1 проводят один раз через 14 дней после трансплантации путем введения в хвостовую вену.

(21-2) Иссечение опухоли, селезенки и печени у мышей с трансплантированной линией клеток MC38 и подготовка фракций лимфоцитов

Выделение фракций лимфоцитов производят из резецированных опухоли, селезенки и печени. Для селезенки используют фракцию лимфоцитов, полученную с помощью клеточного фильтра после разрушения ткани. Для опухолей или печени используют фракции лимфоцитов, полученные путем разрушения ткани с использованием набора для диссоциации опухоли мыши Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec) или набора для диссоциации печени мыши Liver Dissociation Kit (Miltenyi Biotec), а затем с использованием клеточного фильтра. Анализ полученных фракций лимфоцитов опухоли, печени и селезенки проводят методом жидкостной цитометрии (FCM).

Таблица 80.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	Способ введения	День отбора образцов
1	4	Alexa488-меченное IC17HdK-MB110/IC17L-mK	2,5	Через 14 дней после трансплантации	Через хвостовую вену	Через 15 дней после трансплантации
2	4	Alexa488- меченное A551-MB110/B379-ml0r	2,5		Через хвостовую вену	
3	4	Alexa488-меченное UreH-MB110/UreL-mk1	2,5		Через хвостовую вену	

(21-3) Оценка распределения антител в тканях у мышей с трансплантированной клеточной линией MC38 методом проточной цитометрии (FCM)

Анализ проводят методом FCM для каждого Alexa488-меченного антитела, связанного с опухолью, селезенкой и фракциями лимфоцитов, происходящих из печени. Степень экспрессии Alexa488 в CD8+ T-клетках используют для оценки методом FCM. В анализе FCM используют анти-CD45 антитело (фирма BD Biosciences), анти-CD3 антитело (фирма BioLegend), анти-CD8 антитело (фирма BioLegend), анти-CD19 антитело (фирма BioLegend) и анти-CD11b антитело (фирма BioLegend). Для измерения используют цитофлуориметр BD LSR Fortessa X-20 (фирма BD Biosciences).

В результате оценки каждого Alexa488-меченного антитела, связанного с $CD8^+$ T-клетками, проникающими в опухоль, высокая степень связывания наблюдается в группе, получавшей Alexa488-меченное A551-MB110/B379-ml0r или Alexa488-меченное UreH-MB110/UreL-mk1, по сравнению с группой, в которой вводили Alexa488-меченное IC17HdK-MB110/IC17L-mk (фиг. 94). В селезенке и печени в группе, в которой животным вводили Alexa488-меченное переключающее антитело A551-MB110/B379-ml0r, степень связывания CD8+ T-клеток почти эквивалентна показателю в группе, в которой вводили Alexa488-меченное отрицательное контрольное вещество IC17HdK-MB110/IC17L-mk (фиг. 94).

С другой стороны, в группе, в которой вводили Alexa488-меченное UreH-MB110/UreL-mk1, которое не является переключающим антителом, степень связывания CD8$^+$ Т-клеток была очень высокой (фиг. 94) по сравнению с группой, в которой вводили Alexa488-меченное IC17HdK-MB110/IC17L-mk, и группой, в которой вводили Alexa488-меченное A551-MB110/B379-ml0r.

Из вышеизложенного следует, что переключающее антитело A551-MB110/B379-ml0r связывает только лимфоциты, присутствующие в опухолевой ткани, а связывание с лимфоцитами, присутствующими в нормальных органах, селезенке и печени, ограничено.

Пример 22. Проверка группы генов, демонстрирующих изменения экспрессии в связи с внеклеточным АТФ в опухолевой ткани

(22-1) Сравнение тепловых карт генов, показывающих изменения экспрессии в связи с внеклеточным АТФ на основе данных секвенирования РНК в мышиной модели с сингенной трансплантацией опухоли.

Из данных секвенирования РНК, полученных от каждой мышиной модели сингенной трансплантации опухоли, полученной путем трансплантации клеточной линии MC38, клеточной линии LLC/OVA/hGPC3, клеточной линии LLC/OVA или клеточной линии Hepa1-6/hGPC3 мышам C57BL/6, величину экспрессии (единица измерения: FPKM) рассчитывают методом RSEM (версия 1.2.31). Списком эталонных мРНК (список генов) является GRCm38. Кроме того, значение экспрессии аналогичным образом рассчитывают методом RSEM на основе данных секвенирования РНК, полученных из каждой нормальной ткани мышей C57BL/6. Для необработанных данных RNA-seq (файл .fastq) используют 12 видов нормальных органов, данные опубликованы в литературе (Sollner, *Sci Data*, 2017, 4: 170185).

Единица была преобразована из [FPKM] в [FPKM + 1] путем добавления 1 к уровню экспрессии гена в единицах FPKM. Это связано с тем, что преобразование log невозможно, если 0 существует в качестве величины экспрессии. После этого было выполняют конверсию log2.

Затем мышиным генам определяют ортологи человека. В принципе, их назначают в соответствии с набором данных NCBI HomoloGene.

Затем из литературы были собраны гены, связанные с внеклеточной АТФ (Hu, *Clin Cancer Res*, 2019, 25(4), 1318-1330; Li, *Cancer Discov*, 2019, 9(12), 1754-1773; Yang, *Cancer Sci*, 2019, 110(8), 2456-2470; Gombault, *Front Immunol*, 2013, 3:414).

Кроме того, из литературы была собрана группа связанных с EMT генов, экспрессия которых увеличивается при добавлении АТФ (Yang, *Cancer Sci*, 2019, 110(8), 2456-2470) (EMT – epithelial-mesenchymal transition (эпителиально-мезенхимальный переход)).

Затем из списка генов GRCm38 (списка мРНК), полученного по данным секвенирования РНК (RNA-seq), были выбраны только гены из вышеуказанной группы генов, связанных с АТФ, и группы генов, связанных с EMT. Поскольку RNA-seq представляет собой данные мыши, а группа генов, связанных с АТФ, и группа генов, связанных с EMT, представляют собой группы генов человека, они были преобразованы ортологами для получения групп генов мыши. Затем были отобраны гены со значительно более высокой экспрессией в каждой линии раковых клеток, чем в группе нормальных тканей ($p<0,05$) по t-критерию.

Затем с помощью программы на языке программирования R составляют карту теплоотдачи. В настоящем изобретении тепловая карта стандартизирована таким образом, что среднее значение всех выборок равняется 0, а дисперсия равняется 1 для каждого гена. Изменение среднего уровня экспрессии каждого гена отображают в виде градации (фиг. 95).

В результате показано, что в опухолевой ткани имеется множество значительно более экспрессированных генов в группе генов, связанных с АТФ, и в группе генов, связанных с EMT, по сравнению с 12 типами нормальных органов. Для этого считалось, что A551-MB110/B379-ml0r связывается с иммунными клетками только в опухолевой ткани и не связывается с иммунными клетками в нормальных тканях, таких как печень и селезенка (пример 21). Кроме того, предположительно, переключающее антитело, которое связывается с антигеном в присутствии АТФ, индуцирует сильный иммунный ответ только в опухолевой ткани (пример 20) и не вызывает иммунного ответа в нормальных органах, таких как печень, селезенка, опухолевые регионарные лимфатические узлы и периферическая кровь (пример 20).

<u>Пример 23. Оценка экспрессии CD73 и CD39 в различных раковых клетках методом жидкостной цитометрии (FCM)</u>

<u>(23-1) Оценка экспрессии CD73 в различных линиях раковых клеток</u>

В этом исследовании применяют линию клеток острого миелоидного лейкоза мыши C1498 (описаны в примере 3) и линию клеток мышиного лейкоза E.G7-OVA (описаны в примере 2), приобретенные в ATCC; линию клеток рака толстой кишки мыши MC38 (описанные в примере 6), лицензированную Национальным институтом рака США; и линию клеток рака печени мыши клетки Hepa1-6/hGPC3 (описаны в примере 4), линию клеток рака легких мыши LLC1/OVA/GPC3 клон C5 (описаны в контрольном примере 9-4-1) и линию клеток рака легких мыши 17 LLC1/OVA клон 17, созданные заявителем настоящего изобретения.

Линию клеток рака легких мыши 17 LLC1/OVA клон 17 получали путем введения плазмиды экспрессии куриного овальбумина (OVA) в линию клеток рака легких мышей LLC1 (LL/2 (также известную как LLC1), дистрибьютор: ATCC, каталожный номер : CRL-1642). Анти-CD73 антитело (фирма BioLegend) используют для анализа методом FCM каждой клеточной линии. Для измерения используют цитофлуориметр FACS Lyric (фирма BD Biosciences).

В результате оценки экспрессии CD73 на поверхности мембран каждой клеточной линии отмечают, что экспрессия CD73 практически не наблюдается на клеточной мембране клеток C1498 и клеток E.G7-OVA, тогда как она наблюдалась на мембранах клеток MC38, клеток Hepa1-6/hGPC3, клеток, LLC1/VA/GPC3 клон C5 и клеток LLC1/OVA клон 17 (фиг. 96). Известно, что CD73 представляет собой фермент мембранного типа, расщепляющий АМФ до аденозина. Таким образом, несмотря на то, что клетки MC38, клетки Hepa1-6/hGPC3, клетки LLC1/OVA/GPC3 клона C5 и клетки LLC1/OVA клон 17 обладают свойством расщеплять АМФ, который необходим для связывания антигена с помощью переключающего антитела, до аденозина, переключающее антитело способно проявлять противоопухолевый эффект (примеры 1-10), что свидетельствует о том, что переключающее антитело влияет на опухолевую ткань, не завися от экспрессии CD73.

<u>(23-2) Оценка экспрессии CD39 и CD73 в опухолевых тканях мышей с трансплантированной клеточной линией LLC1/OVA/GPC3 клон C5</u>

<u>(23-2-1) Получение клеточной линии, мышиной модели сингенной трансплантации опухоли и способ оценки экспрессии CD39 и CD73 внутриопухолевыми инфильтрирующимися иммунными клетками и опухолевыми клетками</u>

В настоящем исследовании используют собственную линию клеток рака легких мышей LLC1/OVA/GPC3 клон C5 и hCD137 KI мыши (описанные в контрольном примере 6-3). Линию клеток LLC1/OVA/GPC3 клон C5 трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, и образцы берут, когда объем опухоли достигает приблизительно 500 мм^3 или более. Отбор проб проводят через 14 дней после трансплантации. После взятия образца опухолевую ткань удаляют и подготавливают фракцию опухолевых клеток или фракцию лимфоцитов с помощью метода, подробно описанного ниже, а затем оценивают экспрессию CD39 или CD73 на опухолевых клетках, на CD4$^+$ Т-клетках, на CD8$^+$ Т-клетках, а также на клетках, не являющихся Т-клетками, методом жидкостной цитометрии (FCM).

<u>(23-2-2) Иссечение опухолевой ткани у мышей с трансплантированной клеточной линией LLC1/OVA/GPC3 клон C5 и получение фракции опухолевых клеток или фракции лимфоцитов</u>

Для иссеченной опухолевой ткани подготавливают фракции опухолевых клеток или фракции лимфоцитов. Набор для диссоциации опухоли Tumor Dissociation Kit, mouse (фирма Miltenyi Biotec) используют для приготовления клеток, а полученную фракцию опухолевых клеток или фракцию лимфоцитов используют для анализа FCM.

<u>(23-2-3) Оценка экспрессии CD39 и CD73 методом FCM во фракции опухолевых клеток или фракции лимфоцитов мышей с трансплантированной клеточной линией LLC1/OVA/GPC3 клон C5</u>

Для оценки методом FCM используют положительные уровни CD39 и CD73 на опухолевых клетках, на CD4$^+$ Т-клетках, на CD8$^+$ Т-клетках и на фракциях, отличных от Т-клеток. Для этого в анализе FCM используют анти-CD45 антитела (фирма BD Biosciences), анти-CD3 антитела (фирма BioLegend), анти-CD8 антитела (фирма BioLegend), анти-CD4 антитела (фирма BioLegend), анти-CD39 антитела (фирма BioLegend) и анти-CD73 антитела (фирма BioLegend). Для измерения используют цитофлуориметр BD LSR Fortessa X-20 (фирма BD Biosciences).

В результате анализа экспрессии CD39 установлено, что в каждой фракции экспрессия CD39 на опухолевых клетках, CD4$^+$ Т-клетках, CD8$^+$ Т-клетках и клетках, не являющихся Т-клетками, такова, что экспрессию наблюдают в некоторых опухолевых клетках и почти во всех CD4$^+$ Т-клетках, CD8$^+$ Т-клетках и клетках, не являющихся Т-клетками (фиг. 97). Затем, в результате анализа экспрессии CD73 в каждой фракции наблюдают экспрессию в некоторых опухолевых клетках, в некоторых CD8$^+$ Т-клетках, и в некоторых клетках, не являющихся Т-клетками, но экспрессию CD73 наблюдают почти во всех $CD4^+$ Т-клетках (фиг. 97). Репрезентативные примеры всех данных показаны на фиг. 98.

(23-3) Оценка экспрессии CD39 и CD73 в опухолевых тканях мышей с трансплантированной клеточной линией MC38

(23-3-1) Получение клеточной линии, мышиной модели сингенной трансплантации опухоли и способ оценки экспрессии CD39 и CD73 внутриопухолевых инфильтрирующих иммунных клеток и опухолевых клеток

В этом исследовании используют клетки MC38 линии клеток рака толстой кишки мыши, лицензированные Национальным институтом рака США, и мышей hCD137 KI (описанных в контрольном примере 6-3). Линию клеток MC38 трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, которых группируют, когда объем опухоли достигет 163-204 мм^3. Формирование групп проводят через 14 дней после трансплантации, а отбор образцов — через 16 дней после трансплантации. Опухолевую ткань удаляют для получения фракции опухолевых клеток или фракции лимфоцитов по методике, подробно описанной ниже, и далее с помощью жидкостной цитометрии (FCM) оценивают экспрессию CD39 или CD73 на опухолевых клетках, на $CD4^+$ Т-клетках, на $CD8^+$ Т-клетках. и на клетках во фракциях, не являющихся Т-клетками.

(23-3-2) Иссечение опухолевой ткани у мышей с трансплантированной линией клеток MC38 и получение фракции опухолевых клеток или фракции лимфоцитов

Для иссеченной опухолевой ткани получают фракции опухолевых клеток или фракции лимфоцитов. Набор для диссоциации опухоли Tumor Dissociation Kit, mouse (фирма Miltenyi Biotec) используют для приготовления клеток, а полученную фракцию опухолевых клеток или фракцию лимфоцитов используют для анализа FCM.

(23-3-3) Оценка экспрессии CD39 и CD73 методом FCM фракции опухолевых клеток или фракции лимфоцитов мышей с трансплантированной клеточной линией MC38

Положительные доли CD39 и CD73 на опухолевых клетках, на $CD4^+$ Т-клетках, на $CD8^+$ Т-клетках и на клетках, не относящихся к фракциям Т-клеток, используют для оценки методом FCM. Для этого в анализе FCM используют анти-CD45 антитела (фирма BD Biosciences), анти-CD3 антитела (фирма BioLegend), анти-CD8 антитела (фирма BioLegend), анти-CD4 антитела (фирма

BioLegend), анти-CD39 антитела (фирма BioLegend) и анти-CD73 антитела (фирма BioLegend). Для измерения используют цитофлуориметр BD LSR Fortessa X-20 (фирма BD Biosciences).

В результате анализа экспрессии CD39 в каждой фракции экспрессия CD39 на опухолевых клетках, $CD4^+$ T-клетках, $CD8^+$ T-клетках и клетках, не относящихся к T-клеткам, была таковой, что экспрессию наблюдают в некоторых $CD4^+$ T-клетках и в некоторых $CD8^+$ T-клетках, а также в большинстве клеток не относящихся к T-клеткам (фиг. 99). Экспрессия в клетках, не относящихся к T-клеткам, практически отсутствует. Репрезентативные примеры всех данных показаны на фиг. 100.

На основании приведенных выше результатов показано, что в опухолевых тканях мышей, трансплантированных клетками мышиной клеточной линии рака толстой кишки MC38 и мышиной клеточной линии рака легкого LLC1/OVA/GPC3 клон C5, CD39 и CD73 широко экспрессируются во внутриопухолевых инфильтрирующихся иммунных клетках помимо опухолевых клеток. Известно, что ферменты мембранного типа CD39 и CD73 представляют собой ферменты, расщепляющие АТФ до аденозина. Антитела-переключатели проявляют антигенсвязывающую способность в присутствии АТФ, АДФ и АМФ, но не в присутствии аденозина (см. WO2020/032230). Однако, поскольку было продемонстрировано, что антитело-переключатель связывается с иммунными клетками (пример 21) и проявляет противоопухолевый эффект (примеры 1-10) даже в опухолевых тканях, в которых широко экспрессируются CD39 и CD73, таких как опухолевые ткани мышей, которым трансплантировали линии клеток рака толстой кишки мыши MC38 и линии клеток рака легкого мыши LLC1/OVA/GPC3 клон C5, показано, что переключающее антитело действует на опухолевые ткани, не подвергаясь влиянию экспрессии CD39 и CD73.

Пример 24. Оценка противоопухолевой активности анти-CD137-антитела в качестве монотерапии или в комбинации с анти-PD-L1-антителом на модели сингенной трансплантации опухоли с использованием мышей hCD137KI (подкожная трансплантация клеток LLC1/OVA клон 17)

(24-1) Получение линии опухолевых клеток, мышиной модели сингенной трансплантации опухоли и оценка противоопухолевой активности A551-MB110/B379-ml0r (один агент или в комбинации с антителом против мышиного PD-L1)

В этом исследовании используют собственную созданную линию клеток рака легких мышей LLC1/OVAклон 17 (описанную в примере 23, далее сокращенно обозначаемую как клеточная линия LLC1/OVA в этом примере) и мыши hCD137 KI (описанные в справочном примере 6-3). Линию клеток LLC1/OVA трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, и модель считают установленной, когда объем опухоли достигает 79-199 мм^3. После создания модели мышей с трансплантированной клеточной линией LLC1/OVA формируют группы и затем вводят в дозах, показанных в табл. 81, переключающее антитело A551-MB110/B379-ml0r и антитело против мышиного PD-L1 (BioXcell, Inc., клон 10F.9G2). В качестве положительного контроля вводили непереключающее антитело UreH-MB110/UreL-mk1 и антитело против мышиного PD-L1. Введение переключающего антитела A551-MB110/B379-ml0r или непереключающего антитела UreH-MB110/UreL-mk1 осуществляют дважды, через 10 дней и 13 дней после трансплантации, через хвостовую вену. Введение антител против мышиного PD-L1 проводят дважды, через 10 и 13 дней после трансплантации, внутрибрюшинно. ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют для контроля разбавителя.

Таблица 81

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	Способ введения
1	8	Контроль разбавителя (ФСБ с 0,05% Tween 20)	-	10 и 13 день после трансплантации	Через хвостовую вену и внутрибрюшинно
2	8	A551-MB110/B379-ml0r	2,5		Через хвостовую вену
3	8	UreH-MB110/UreL-mk1	7,5		Через хвостовую вену
4	8	Anti-mouse PD-L1 антитело	10		Внутрибрюшинно
5	8	A551-MB110/B379-ml0r	2,5		Через хвостовую вену
		Anti-mouse PD-L1 антитело	10		Внутрибрюшинно
6	8	UreH-MB110/UreL-mk1	7,5		Через хвостовую вену
		Anti-mouse PD-L1 антитело	10		Внутрибрюшинно

Объем опухоли измеряют через 10 дней, 13 дней, 17 дней и 20 дней после трансплантации.

Объем опухоли рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли (TV) мм^3) = длина (мм) × ширина (мм) × ширина (мм)/2

Ингибирование роста опухоли (TGI (%)) рассчитывают по следующим формулам:

Изменение TV (мм^3) = объем опухоли на момент измерения - объем опухоли на момент формирования групп

TGI (%) = (1 - (Среднее значение изменения TV для каждой группы/Среднее значение изменения TV для группы контроля разбавителя)) × 100

В результате, против опухоли LLC1/OVA комбинированная группа антитела A551-MB110/B379-ml0 и антитела против мышиного PD-L1, комбинированная группа непереключающего антитела UreH-MB110/UreL-mk1 и антитела против мышиного PD-L1 и группа монотерапии с переключающим антителом A551-MB110/B379-ml0r проявляют почти одинаковый эффект подавления роста опухоли.

В частности, степень подавления роста опухоли в группе комбинированного введения переключающего антитела A551-MB110/B379-ml0 и антитела против мышиного PD-L1 составляет 95%, в то время как в группе комбинированного введения непереключающего антитела UreH-MB110/UreL-mk1 и антитела против мышиного PD-L1 степень подавления роста опухоли составляет 93%, а группа с единственным агентом переключающим антителом A551-MB110/B379-ml0r показывает степень подавления роста опухоли 101% (фиг. 101, табл. 82).

Из приведенных выше результатов следует, что комбинированная группа переключающего антитела A551-MB110/B379-ml0 и антитела против мышиного PD-L1 оказывает эффект подавления роста опухоли, сходный с эффектом, который оказывает комбинированная группа непереключающего антитела UreH-MB110/UreL-mk1 и антител против мышиного PD-L1 (фиг. 101, табл. 82).

Таблица 82. Подавление роста опухоли (%) на 20 деньпосле трансплантации

	Контроль (разбавитель)	A551-MB110/B379-ml0r	UreH-MB110/UreL-mk1	Anti-mouse PD-L1 антитело	A551-MB110/B379-ml0r + Anti-mouse PD-L1 антитело	UreH-MB110/UreL-mk1 + Anti-mouse PD-L1 антитело
Пода-вление роста опухоли (%)	-	101	78	42	95	93

Пример 25: Оценка системного действия анти-CD137-антитела в качестве отдельного агента или в комбинации с анти-PD-L1-антителом на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мышей hCD137KI (клетки LLC1/OVA)

(25-1) Получение линии опухолевых клеток, мышиной модели трансплантации сингенной опухоли и способ оценки внутриопухолевого действия

В этом исследовании используют клетки LLC1/OVA клеточной линии рака легких мышей собственного производства (описано в примере 23) и мышей hCD137 KI (описано в контрольном примере 6-3). Линию клеток LLC1/OVA трансплантируют подкожно в брюшную полость мышей, и модель считают установленной, когда объем опухоли достигал 91-205 мм^3. После создания модели мышей с трансплантированной клеточной линией LLC1/OVA формируют группы группы, а затем в дозах, показанных в табл. 83, вводят переключающее антитело A551-MB110/B379-ml0r и антитело против мышиного PD-L1 (BioXcell, Inc., клон 10F.9G2).

В качестве положительного контроля вводят непереключающее анти-CD137 антитело UreH-MB110/UreL-mk1 и антитело к мышиному PD-L1. Введение переключающего антитела A551-MB110/B379-ml0r или непереключающего антитела UreH-MB110/UreL-mk1 осуществляют дважды, через 14 дней и 17 дней после трансплантации, через хвостовую вену. Введение антител против мышиного PD-L1 проводят дважды, через 14 и 17 дней после трансплантации, внутрибрюшинно. ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют для контроля носителя.

(25-2) Иссечение опухолевых регионарных лимфатических узлов у мышей с трансплантированной клеточной линией LLC1/OVA и приготовление фракции лимфоцитов

Для иссеченных регионарных лимфатических узлов опухоли используют фракцию лимфоцитов, полученную с помощью клеточного фильтра после разрушения ткани. Метод жидкостной цитометрии (FCM) проводят с полученной фракцией лимфоцитов, выделенных из регионарных лимфатических узлов опухоли.

Таблица 83.

Группа	Число животных	Фармацевтическое средство	Доза (мг/кг)	День введения	Способ введения	День отбора образцов
1	3	Контроль (разбавитель: ФСБ с 0,5% Tween 20)	-	14й и 17й день после трансплантации	Через хвостовую вену и внутрибрюшинно	18й день после трансплантации
2	3	A551-MB110/B379-ml0r	2,5		Через хвостовую вену	
3	3	UreH-MB110/UreL-mk1	7,5		Через хвостовую вену	
4	3	Anti-mouse PD-L1 антитело	10		Внутрибрюшинно	
5	3	A551-MB110/B379-ml0r	2,5		Через хвостовую вену	
		Anti-mouse PD-L1 антитело	10		Внутрибрюшинно	
6	3	UreH-MB110/UreL-mk1	7,5		Через хвостовую вену	
		Anti-mouse PD-L1 антитело	10		Внутрибрюшинно	

(25-3) Оценка активации иммунных клеток методом жидкостной цитометрии (FCM) у мышей с трансплантированной клеточной линией LLC1/OVA.

Анализ проводят методом FCM для активации Т-клеток, полученных из регионарных лимфатических узлов опухоли. Для оценки степени экспрессии маркеров активации в $CD8^+$ Т-клетках применяют метод FCM. В анализе FCM используют анти-CD45 антитело (фирма BD Biosciences), анти-CD3 антитело (фирма BioLegend), анти-CD8 антитело (фирма BioLegend), анти-KLRG-1 антитело (фирма BD Biosciences), анти-ICOS антитело (фирма BioLegend) и анти-PD-1 антитело (фирма BioLegend). Для измерения используют цитофлуориметр BD LSR Fortessa X-20 (фирма BD Biosciences).

В результате оценки в опухолевых регионарных лимфатических узлах не было отмечено повышения всех уровней экспрессии и абсолютного количества KLRG-1, ICOS, PD-1 в $CD8^+$ Т-клетках, в группе введения только одного агента, а именно A551-MB110/B379-ml0r, в группе введения только одного агента, а именно антитела против мышиного PD-L1, а также в группе комбинированного введения A551-MB110/B379-ml0r и антитела против мышиного PD-L1 (фиг. 102 и 103). С другой стороны, заметное увеличение наблюдалось в группе, получавшей только одно средство – UreH-MB110/UreL-mk1, и в группе комбинированного введения UreH-MB110/UreL-mk1 и антитела против мышиного PD-L1 (фиг. 102 и 103).

Из результата, показанного в примере 24, следует, что, несмотря на то, что как переключающее антитело A551-MB110/B379-ml0r, так и непереключающее антитело UreH-MB110/UreL-mk1 демонстрируют сходный эффект подавления роста опухоли, даже когда их используют в комбинации с антителом против мышиного PD-L1, переключающее антитело A551-MB110/B379-ml0r оказывает чрезвычайно ограниченное действие на T-клетки в опухолевых регионарных лимфатических узлах, которые являются нормальным органом, по сравнению с непереключающим антителом UreH-MB110/UreL-mk1 при использовании как в качестве отдельного агента, так и в комбинации с антителом против мышиного PD-L1.

Пример 26. Оценка противоопухолевой активности анти-CD137-антитела на модели сингенной трансплантации опухоли с использованием мышей hCD137KI (внутривенное введение клеток LLC1/OVA)

(26-1) Получение линии опухолевых клеток, мышиной модели трансплантации сингенной опухоли и оценка противоопухолевой активности

В этом исследовании используют собственные установленные линии клеток рака легкого мыши LLC1/OVA клон (описанные в примере 23) и мыши hCD137 KI (описанные в контрольном примере 6-3). Линию клеток клона 17 LLC1/OVA трансплантируют в хвостовую вену мышей, которые были поделены на группы через 7 дней после трансплантации. Антитело A551-MB110/B379-ml0r вводят в хвостовую вену мышей через 7 и 14 дней после трансплантации, как показано в табл. 84 ниже. ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20, используют в качестве контроля разбавителя. Массу тела измеряют через 18 дней после трансплантации опухоли, а массу легких измеряют после обескровливания и эвтаназии под анестезией. Отбор проб проводят также у 10 нормальных мышей без трансплантации клеток по той же методике в тот же день. Массу легких рассчитывали как значение массы легких на 100 г массы тела.

Таблица 84.

<table>
<tr><th>Группа</th><th>Число животных</th><th>Фармацевтическое средство</th><th>Доза (мг/кг)</th><th>День введения</th><th>Способ введения</th></tr>
<tr><td>1</td><td>15</td><td>Контроль (разбавитель: ФСБ с 0,5% Tween 20)</td><td>-</td><td rowspan="2">7й и 14й день после трансплантации</td><td rowspan="2">Через хвостовую вену</td></tr>
<tr><td>2</td><td>15</td><td>A551-MB110/B379-ml0r</td><td>2,5</td></tr>
</table>

В результате у животных в группе введения переключающего антитела A551-MB110/B379-ml0r масса легких существенно снижена по сравнению с группой, в которой вводили разбавитель (фиг. 104, табл. 85). Соответственно, показано, что переключающее антитело A551-MB110/B379-ml0r обладает лекарственной эффективностью не только в отношении подкожно трансплантированных опухолей (описано в примере 24), но также и в отношении микрометастазов в легких. Одна мышь в группе, получавшей носитель, умерла через 11 дней после трансплантации опухоли. В легких мертвой мыши были обнаружены небольшие следы и бугорки, напоминающие опухоли.

Таблица 85. Масса легкого на 18й день после трансплантации.

	Контроль (разбавитель: ФСБ с 0,5% Tween 20)	A551-MB110/B379-ml0r	Здоровая мышь без трансплантации клеток
Масса легкого (/100 г массы тела)	0,708	0,553	0,480

Контрольный пример 1. Получение антигена

(1-1) Получение внеклеточной области CD137 человека

Внеклеточный домен CD137 человека (также называемый hCD137) получают способами, известными специалистам в данной области. В частности, связаны расположенный ниже по цепи генный фрагмент, кодирующий внеклеточную область CD137 человека, генный фрагмент, кодирующий гистидиновую метку, и фрагмент гена, кодирующий конкретную последовательность, к которой добавлен биотин (последовательность AviTag, SEQ ID NO: 86). Фрагмент гена, кодирующий белок, в котором связаны внеклеточная область CD137 человека, гистидиновая метка и Avitag (CD137 человека или hCD137-HisBAP, SEQ ID NO: 87), включают в вектор экспрессии для животных клеток. Сконструированный плазмидный вектор трансфицируют в клетки FreeStyle293 (фирма Invitrogen), используя 293-фектин (фирма Invitrogen). Одновременно трансфицируют плазмидный вектор, содержащий ген, экспрессирующий EBNA1 (SEQ ID NO: 88). Клетки, трансфицированные генами в соответствии с вышеупомянутой процедурой, культивируют при 37°C, в атмосфере 8% CO_2; и представляющий интерес белок (внеклеточная область CD137 человека) секретируется в супернатант культуры. Эту среду для культивирования клеток фильтруют через фильтр с порами 0,22 мкм для получения супернатанта культуры.

Супернатант культуры вносят в колонку HisTrap-HP (фирма GE Healthcare) и внеклеточную область CD137 человека связывают с колонкой. Внеклеточную область CD137 человека элюируют раствором 20 мМ фосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия и 500 мМ имидазола, pH 7,5. Затем агрегаты удаляют гель-фильтрационной хроматографией с использованием колонки Superdex 200 26/600 (фирма GE Healthcare) для получения очищенной внеклеточной области CD137 человека.

Концентрацию CD137 человека рассчитывают по методу Pace с соавт. на основе аминокислотной последовательности, исключая сигнальную последовательность, удаленную из SEQ ID NO: 87 (Pace C.N., с соавт. *Protein Science*, 4, 1995, 2411-2423).

<u>(1-2) Получение внеклеточного домена CD137 человека (hCD137 (расщепленный FXa))</u>

Внеклеточный домен CD137 человека (также называемый hCD137 (расщепленный протеазой FXa)) получают способом, известным специалистам в данной области. В частности, фрагмент гена, кодирующий последовательность расщепления фактора Xa, и фрагмент гена, кодирующий константную область антитела, соединяют ниже по цепи от фрагмента гена, кодирующего внеклеточную область CD137 человека. Фрагмент гена, кодирующий белок, в котором связаны внеклеточная область CD137 человека, расщепляемая протеазой FactorXa последовательность и константная область антитела (hCD137-F-Fc, SEQ ID NO: 89), включен в вектор экспрессии животного. Сконструированный плазмидный вектор трансфицируют в клетки FreeStyle293 (фирма Invitrogen) с использованием 293-фектина (фирма Invitrogen). Одновременно трансфицируют плазмидный вектор, содержащий ген, кодирующий EBNA1 (SEQ ID NO: 88). Клетки, трансфицированные генами в соответствии с вышеупомянутыми процедурами, культивируют при 37°C в атмосфере 8% CO_2, при этом hCD137-F-Fc секретируется в супернатант культуры. Среду для культивирования клеток фильтруют через фильтр с порами 0,22 мкм и собирают культуральный супернатант.

Супернатанты культур клеток наносят на колонку, заполненную белком A (продукт MabSelect SuRe, фирма GE Healthcare). hCD137-F-Fc связывается с колонкой, после чего его элюируют 50 мМ раствором уксусной кислоты. После нейтрализации элюата с помощью 1 M трис-HCl, pH 8,0, растворитель hCD137-F-Fc заменяют раствором 20 мМ Трис, 100 мМ хлорид натрия, 2 мМ хлорид кальция, pH 8,0. Затем добавляют протеазу Factor Xa (фирма NEW ENGLAND BioLabs, номер в каталоге P8010L) и расщепляют hCD137-F-Fc. Затем добавляют ингибитор протеазы (продукт DNS-GGACK, фирма Calbiochem, номер в каталоге 251700), чтобы остановить реакцию. К раствору, в котором действует протеаза, добавляют 5М хлорида натрия и весь объем приготовленного раствора вносят в колонку HiTrap Benzamidine (фирма GE Healthcare, номер в каталоге 17-5143-01). Пропущенный через колонку раствор затем наносят на колонку с белком A (продукт MabSelect SuRe, фирма GE Healthcare) и собирают прошедшие сквозь колонку фракции. Из пропущенных фракций удаляют агрегаты с помощью гель-фильтрационной хроматографии, используя Superdex 200 Increase, 10/30 (фирма GE Healthcare, номер в каталоге 28990944), получая очищенную внеклеточную область CD137 человека.

<u>(1-3) Получение биотинилированного слитого с Fc CD137 человека</u>

Биотинилированный слитый с Fc CD137 человека (также называемый «биотинилированный hCD137-Fc», или «био-hCD137-Fc», или hCD137-Fc-Bio) получают способами, известными специалистам в данной области. В частности, фрагмент гена, кодирующий константную область антитела, и фрагмент гена, кодирующий специфическую последовательность, к которой добавлен биотин (последовательность AviTag, SEQ ID NO: 86), присоединяют ниже по цепи от фрагмента гена, кодирующего внеклеточную область CD137 человека. Фрагмент гена, кодирующий белок (Fc, слитый с CD137 человека, SEQ ID NO: 90), в котором связаны внеклеточная область CD137 человека, константная область антитела и Avitag, включен в вектор экспрессии животного. Сконструированный плазмидный вектор трансфицируют в клетки FreeStyle293 (фирма Invitrogen) с использованием 293-фектина (фирма Invitrogen). Одновременно трансфицируют ген, экспрессирующий EBNA1 (SEQ ID NO: 88), и ген, экспрессирующий биотинлигазу (BirA, SEQ ID NO: 91), добавляют биотин с целью биотинилирования Fc, слитого с CD137 человека. Клетки, трансфицированные генами в соответствии с вышеупомянутыми процедурами, культивируют при 37°C в атмосфере 8% CO_2; белок интереса (биотинилированный слитый с Fc CD137 человека) секретируется в супернатант культуры. Среду для культивирования клеток фильтруют через фильтр с порами 0,22 мкм и собирают культуральный супернатант.

Супернатант культуры вносят в колонку, заполненную белком A (MabSelect SuRe, GE Healthcare), и биотинилированный слитый с Fc CD137 человека связывается с колонкой. Биотинилированный слитый с Fc CD137 человека элюируют 50 мМ раствором уксусной кислоты. Затем агрегаты удаляют гель-фильтрационной хроматографией с использованием Superdex 200, 26/600 (фирма GE Healthcare) и получают очищенный биотинилированный слитый с Fc CD137 человека.

(1-4) Получение слитого с Fc CD137 человека

Слитый с Fc CD137 человека (также называемый hCD137-Fc) получают способами, известными специалистам в данной области. В частности, фрагмент гена, кодирующий константную область антитела, и фрагмент гена, кодирующий специфическую последовательность, к которой добавлен биотин (последовательность AviTag, SEQ ID NO: 86), присоединяют ниже по цепи от фрагмента гена, кодирующего внеклеточную область CD137 человека. Фрагменты гена, кодирующие белок (слитый с Fc человека CD137, SEQ ID NO: 90), в котором внеклеточная область CD137 человека, константная область антитела и Avitag включены в вектор экспрессии животного. Сконструированный плазмидный вектор трансфицируют в клетки FreeStyle293 (фирма Invitrogen) с использованием 293-фектина (фирма Invitrogen). Одновременно трансфицируют ген, экспрессирующий EBNA1 (SEQ ID NO: 88). Клетки, трансфицированные генами в соответствии с вышеупомянутыми процедурами, культивируют при 37°C в атмосфере 8% CO_2; белок интереса (слитый с Fc CD137 человека) секретируется в супернатант культуры. Среду для культивирования клеток фильтруют через фильтр с порами 0,22 мкм и собирают культуральный супернатант.

Супернатант культуры вносят в колонку, заполненную белком A (MabSelect SuRe, GE Healthcare), и слитый с Fc CD137 человека связывается с колонкой. Слитый с Fc CD137 человека элюируют 50 мМ раствором уксусной кислоты. Затем агрегаты удаляют гель-фильтрационной хроматографией с использованием Superdex 200, 26/600 (фирма GE Healthcare) и получают очищенный слитый с Fc CD137 человека.

(1-5) Получение биотинилированного Fc-слитого CD137 обезьяны

Биотинилированный слитый с Fc CD137 обезьяны (также называемый cyCD137-Fc-BAP) получают способами, известными специалистам в данной области. В частности, фрагмент гена, кодирующий константную область антитела, и фрагмент гена, кодирующий специфическую последовательность, к которой добавлен биотин (последовательность AviTag, SEQ ID NO: 86), присоединяют ниже по цепи от фрагмента гена, кодирующего внеклеточную область CD137 обезьяны. Фрагмент гена, кодирующий белок, в котором внеклеточная область CD137 обезьяны, константная область антитела и Avitag связаны (слитый с Fc обезьяны CD137, SEQ ID NO: 92), включена в вектор экспрессии животного.

Сконструированный плазмидный вектор трансфицируют в клетки FreeStyle293 (фирма Invitrogen) с использованием 293-фектина (фирма Invitrogen). Одновременно трансфицируют ген, экспрессирующий EBNA1 (SEQ ID NO: 88), и ген, экспрессирующий биотинлигазу (BirA, SEQ ID NO: 91); биотин добавляют с целью нанесения метки в виде биотина для слитого с Fc CD137 обезьяны. Клетки, трансфицированные генами в соответствии с вышеупомянутыми процедурами, культивируют при 37°C в атмосфере 8% CO_2; белок интереса (биотинилированный слитый с Fc CD137 обезьяны) секретируется в супернатант культуры. Среду для культивирования клеток фильтруют через фильтр с порами 0,22 мкм и собирают культуральный супернатант.

Супернатант культуры вносят в колонку, заполненную белком A (MabSelect SuRe, GE Healthcare), и биотинилированный слитый с Fc CD137 обезьяны связывается с колонкой. Биотинилированный слитый с Fc CD137 обезьяны элюируют 50 мМ раствором уксусной кислоты. Затем агрегаты удаляют гель-фильтрационной хроматографией с использованием Superdex 200, 26/600 (фирма

GE Healthcare) и получают очищенный биотинилированный слитый с Fc CD137 обезьяны.

Контрольный пример 2. Получение АТФ-зависимых анти-CD137 антител

(2-1) Получение антител с антигенсвязывающей активностью, зависящей от низкомолекулярных соединений (антитела, переключаемые низкомолекулярными соединениями), из рационально разработанной библиотеки, использующей АТФ (1)

(2-1-1) Пэннинг

Антитела, которые проявляют связывающую активность по отношению к антигенам в присутствии аденозинтрифосфата (аденозин-5'-трифосфат; АТФ), были получены из рационально разработанной библиотеки фагового дисплея антител, созданной в предыдущем патенте WO2015/083764. Следует отметить, что антитела с антигенсвязывающей активностью (антиген, например, CD137), зависящей от низкомолекулярных соединений, могут называться «переключаемыми антителами» или «антителами, переключаемыми низкомолекулярными соединениями», и антитела с антигенсвязывающей активностью (антиген CD137), зависящей от АТФ, могут называться «переключаемыми антителами» или «АТФ-переключаемыми антителами». Для получения антител собирают фаги, презентирующие антитела, которые проявляют связывающую активность в присутствии АТФ по отношению к антигену, захваченному на гранулах. Затем фаги собирают из элюатов, элюированных с гранул в отсутствие АТФ.

Фаги получают обычным методом из бактерии *E. coli*, несущей фагмиду, сконструированную методом фагового дисплея. В частности, *E. coli*, несущую сконструированный фагмидный вектор, инфицируют фагом M13KO7ΔpIII (обозначенным как «гиперфаг») (фирма PROGEN Biotechnik), и фаги собирают из супернатантов, культивируемых в течение ночи при 30°C. Суспензию фаговой библиотеки получают путем разбавления трис-буферным физиологическим раствором (TBS, Tris-Buffered Saline) популяции фагов, которых осаждают путем добавления 2,5 M NaCl/10% PEG к культуре *E. coli*, в которой вырабатывается фаг. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляют БСА до конечной концентрации 4%. Пэннинг проводят с использованием антигена, иммобилизованного на магнитных гранулах. В качестве магнитных гранул используют гранулы Sera-Mag NeutrAvidin (фирма Thermo Fisher Scientific) или

Dynabeads M-280 StreptAvidin (фирма Life Technologies). В качестве антигена применяют биотинилированный аденозинтрифосфат (аденозин-5'-трифосфат; АТФ) от фирмы Jena Bioscience, или hCD137-Fc-Bio (SEQ ID NO: 90) или био-hCD137 (SEQ ID NO: 89), которые биотинилированы из hCD137 (расщепление FXa), с использованием предварительно измеренного NHS-PEO4-биотина без взвешивания (фирма PIERCE), полученного в контрольных примерах 1-2 и 1-3.

Пэннинг проводят для эффективного получения небольшой молекулы, которая может играть роль переключателя в зависимых от раковых тканях переключаемых антителах. В частности, пэннинг для обогащения антителами, которые связываются с антигеном в присутствии АТФ, который представляет собой небольшую молекулу, и не связываются с антигеном в отсутствие АТФ, выполняют со ссылкой на методы, показанные в предыдущем патенте WO2015/083764. В первом раунде для всех биотинилированных hCD137 (bio-hCD137), hCD137-Fc-Bio и биотинилированного АТФ (био-АТФ) пэннинг выполняют с использованием метода, в котором твердофазная иммобилизация биотинилированных антигенов на магнитных гранулах (называемая «твердофазным методом на основе гранул») предшествует добавлению приготовленной суспензии фаговой библиотеки. Для Био-АТФ пэннинг для обогащения антителами, которые могут связываться с антигеном (Био-АТФ) в отсутствие АТФ в качестве низкомолекулярного соединения, выполняют со ссылкой на методы, описанные в предыдущем патенте WO2015/083764, отмеченном выше. Для hCD137-Fc-Bio добавляют 4 нМ небиотинилированной области Fc IgG1 человека для удаления антител, которые связываются с областью Fc. Собранный фаг добавляют к штамму *E. coli* ER2738 для заражения фагом *E. coli*, затем собранные клетки *E. coli* инфицируют гиперфагом и фаг собирают из супернатанта после культивирования в течение ночи при 30°C. Начиная со 2 раунда, пэннинг выполняют только на биотинилированном hCD137 (bio-hCD137) и hCD137-Fc-Bio для обогащения антител, которые связываются с антигеном в присутствии АТФ, и не связываются с антигеном в отсутствие АТФ, используя твердофазный метод с гранулами, ссылаясь на метод, показанный в предыдущем патенте WO2015/083764. Для hCD137-Fc-Bio в обоих случаях добавляют 4 нМ небиотинилированной области Fc IgG1 человека для удаления антител, которые связываются с областью Fc. Подобный пэннинг повторяют до 5 раунда для обогащения представляющих интерес последовательностей антител.

(2-1-2) Оценка связывающей активности в присутствии и в отсутствие АТФ с помощью метода фагового иммуноферментного анализа ELISA

Из отдельных колоний *E. coli*, полученных описанными выше методами, супернатант фагосодержащей культуры собирают обычным методом (*Methods Mol. Biol.*, 178, 2002, 133-145). NucleoFast 96 (фирма MACHEREY-NAGEL) используют для ультрафильтрации собранного супернатанта культуры. Элюат удаляют центрифугированием (4500 g, 45 мин) планшета NucleoFast 96, в который вносили по 100 мкл супернатанта культуры в каждую лунку. NucleoFast 96 снова промывают центрифугированием (4500 g в течение 30 мин), для чего добавляют 100 мкл H_2O в каждую лунку. В итоге добавляют 100 мкл TBS, и суспензию фага, содержащуюся в супернатантах в лунках планшета NucleoFast 96, которые оставляли при комнатной температуре на 5 мин, извлекают.

Очищенные фаги с добавлением TBS или АТФ/TBS подвергают иммуноферментномуанализу (ELISA) по следующей процедуре. 384-луночные микропланшеты, покрытые стрептавидином (фирма Greiner), покрывают в течение ночи 10 мкл буфера TBS, содержащего биотинилированные антигены (bio-hCD137, hCD137-Fc-Bio и bio-Fc), полученные в контрольном примере 1. После удаления биотинилированных антигенов, которые не связались с планшетом, путем промывания каждой лунки планшета трис-буферным солевым раствором с Tween-20 (TBST), лунки блокируют 80 мкл 2% обезжиренного молока-TBS в течение 1 ч или более. 2% обезжиренное молоко-TBS удаляют промывками TBST, после чего допускают, чтобы презентирующие антитела фаги связывались с биотинилированным антигеном, присутствующим в каждой лунке в отсутствие и в присутствии АТФ, оставляя планшеты с подготовленными очищенными фагами, добавленными в каждую лунку, на 1 ч при комнатной температуре. В каждую лунку, промытую TBST или АТФ/TBST, добавляют HRP-конъюгированные анти-M13 антитела (фирма GE Healthcare, номер в каталоге 27-9421-01), разведенные TBS или АТФ/TBS, и планшет инкубируют в течение одного часа. После промывки TBST или АТФ/TBST проявление цвета раствора в каждой лунке, в которую был добавлен единый раствор TMB (фирма ZYMED), останавливают добавлением серной кислоты, а затем проявление цвета измеряют по поглощению при 450 нм.

В результате идентифицировано несколько антител с измененной связывающей активностью с bio-hCD137 или hCD137-Fc-Bio в присутствии и в отсутствие АТФ.

Результаты фагового ELISA с использованием клонов после 4 и 5 раундов пэннинга показаны в табл. 29.

В настоящем изобретении клоны с абсорбцией 0,2 или более в присутствии АТФ и отношением S/N (сигнал/шум) абсорбции выше 2 в присутствии/отсутствие антигена определяют как положительные клоны. Кроме того, среди положительных клонов клоны с коэффициентом абсорбцией S/N выше 2 раза в присутствии/отсутствие АТФ считают клонами с АТФ-зависимой антигенсвязывающей активностью (переключаемые клоны).

Таблица 29.

Антиген, используемый в пеннинге	Биотинилированный hCD137		hCD137-Fc-Bio	
Цикл	4	5	4	5
Число клонов, проанализированных методом ELISA	384	384	384	384
Число положительных клонов (поглощение при АТФ+ $\geq$ 0,2; antigen +/- ratio > 2.0)	31	4	125	169
Число переключенных клонов (ATP+/- соотношение > 2)	12	2	118	164

<u>(2-1-3) Анализ последовательности переключаемых антител, антигенсвязывающая активность которых изменяется в зависимости от присутствия/отсутствия АТФ</u>

Нуклеотидные последовательности генов, амплифицированных с использованием специфических праймеров pBAD-F, G1seq-R, из клонов с АТФ-зависимой антигенсвязывающей активностью (переключаемые клоны) анализируют на основе результатов фагового ELISA. В результате анализа получают нуклеотидные последовательности клонов, которые, как установлено, связываются с CD137 человека в присутствии АТФ, но не с CD137 человека в отсутствие АТФ.

(2-2) Получение антител, которые связываются с антигенами в присутствии малой молекулы, из рационально разработанной библиотеки, использующей АТФ (2)

(2-2-1) Пэннинг

Антитела, которые проявляют активность связывания с антигенами в присутствии АТФ, были получены из рационально разработанной библиотеки фагового дисплея антител, сконструированной в предыдущем патенте WO2015/083764. Для получения антител собирают фаги, презентирующие антитела, которые проявляют связывающую активность в присутствии АТФ по отношению к антигенам, с последующим выделением фагов из элюата, элюированного с гранул в отсутствие АТФ.

Фаги получают обычным методом из бактерии *E. coli*, несущей фагмиду, сконструированную методом фагового дисплея. В частности, *E. coli*, несущую сконструированный фагмидный вектор, инфицируют фагом M13KO7TC (WO2015046554A1) или M13KO7ΔpIII (обозначенным как «гиперфаг») (фирма PROGEN Biotechnik), и фаги выделяют из супернатантов, культивируемых в течение ночи при 30°C. Суспензию фаговой библиотеки получают путем разбавления трис-буферным физиологическим раствором (TBS, Tris-Buffered Saline) популяции фагов, которых осаждают путем добавления 2,5 M NaCl/10% PEG к культуре *E. coli*, в которой вырабатывается фаг. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляют БСА до конечной концентрации 4%. Пэннинг проводят с использованием антигенов, иммобилизованных на магнитных гранулах. В качестве магнитных гранул используют гранулы с покрытием NeutrAvidin (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-покрытие), гранулы NeutrAvidin (фирма TAMAGAWA SEIKI) или Dynabeads MyOne StreptAvidin T1 (фирма Thermo Fisher Scientific). В качестве антигена применяют hCD137-Fc-Bio или bio-hCD137, полученные в контрольном примере 1.

Пэннинг проводят для эффективного получения антител, переключаемых небольшой молекулой, которая может играть роль переключателя в раковых тканях. В частности, пэннинг для обогащения антителами, которые связываются с антигеном в присутствии небольшой молекулы аденозинтрифосфата (аденозин-5'-трифосфат; АТФ) и не связываются с антигеном в отсутствие АТФ, выполняют со ссылкой на методы, описанные в предыдущем патенте WO2015/083764. Для био-hCD137 применяют метод, в котором добавляют приготовленную суспензию библиотеки фагов после заранее произведенной твердофазной иммобилизации биотинилированных антигенов на магнитных гранулах (так называемый «твердофазный метод гранул»), и метод, в котором добавляют магнитные гранулы после смешивания приготовленной суспензии фаговой библиотеки с заранее биотинилированными антигенами (так называемый «жидкофазный метод»). Для hCD137-Fc-Bio добавляют 4 нМ небиотинилированной области Fc IgG1 человека для удаления антител, которые связываются с Fc-областью, и пэннинг осуществляют только жидкофазным методом. Собранный фаг добавляют к штамму *E. coli* ER2738 для заражения фагом *E. coli*, затем собранные клетки *E. coli* инфицируют M13KO7TC (WO2015046554A1) или M13KO7ΔpIII (гиперфагом) (фирма PROGEN Biotechnik) и после культивирования в течение ночи при 30°C фаг собирают из супернатанта. Подобный пэннинг повторяют до 5 раунда.

(2-2-2). Оценка связывающей активности в присутствии и в отсутствие АТФ с помощью фагового ELISA

Из отдельных колоний *E. coli*, полученных после каждого раунда описанными выше методами, супернатанты фагосодержащих культур собирают с использованием обычного метода (*Methods Mol. Biol.*, 178, 2002, 133-145). NucleoFast 96 (фирма MACHEREY-NAGEL) применяют для ультрафильтрации собранных культуральных супернатантов. Элюат удаляют центрифугированием (4500 g, 45 мин) планшетов NucleoFast 96, в которые вносили по 100 мкл супернатанта культуры в каждую лунку. NucleoFast 96 снова промывают центрифугированием (4500 g в течение 30 мин), для чего добавляют 100 мкл H_2O в каждую лунку. В итоге добавляют 100 мкл TBS, и суспензию фага, содержащуюся в супернатантах в лунках планшета NucleoFast 96, которые оставляли при комнатной температуре на 5 мин, извлекают.

Очищенные фаги с добавлением TBS или АТФ/TBS подвергают иммуноферментному анализу (ELISA) по следующей процедуре. Планшеты для микротитрования StreptaWell 96 (фирма Roche) иммобилизуют в течение ночи 100 мкл TBS, содержащего биотинилированные антигены (hCD137-Fc-Bio или bio-hCD137), полученные в контрольном примере 1. После удаления биотинилированных антигенов, которые не связались с планшетом, путем промывания каждой лунки планшета трис-буферным солевым раствором (TBST), лунки блокируют 250 мкл 2% обезжиренного молока-TBS в течение 1 ч или более. 2% обезжиренное молоко-TBS удаляют, после чего фаги, презентирующие антитела, связываются с биотинилированным антигеном, присутствующим в каждой лунке в отсутствие и в присутствии АТФ, оставляя планшеты с подготовленными очищенными фагами, добавленными в каждую лунку при 37°С на 1 ч. В каждую лунку, промытую TBST или АТФ/TBST, добавляют HRP-конъюгированные анти-M13 антитела (фирма GE Healthcare, номер в каталоге 27-9421-01), разведенные TBS или АТФ/TBS, и планшет инкубируют в течение одного часа. После промывки TBST или АТФ/TBST проявление цвета раствора в каждой лунке, в которую был добавлен единый раствор TMB (фирма ZYMED), останавливают добавлением серной кислоты, а затем проявление цвета измеряют по поглощению при 450 нм.

В результате идентифицировано несколько антител с измененной связывающей активностью с bio-hCD137 или hCD137-Fc-Bio в присутствии и в отсутствие АТФ.

В качестве примера, результаты фагового ELISA с использованием клонов после 5 раунда пэннинга показаны в табл. 30.

В настоящем изобретении клоны с абсорбцией 0,2 или более в присутствии АТФ и отношением S/N (сигнал/шум) абсорбции выше 2 в присутствии/отсутствие антигена определяют как положительные клоны. Кроме того, среди положительных клонов клоны с коэффициентом абсорбцией S/N выше 2 раза в присутствии/отсутствие АТФ считают клонами с АТФ-зависимой антигенсвязывающей активностью (переключаемые клоны).

Таблица 30.

Антиген, используемый для пэннинга	hCD137-Fc-Bio	hCD137-Fc-Bio	Биотинилированный hCD137	Биотинилированный hCD137
Метод пэннинга	Жидкая фаза	Жидкая фаза	Жидкая фаза	Гранулы, твердая фаза
Хэлперный фаг для пэннинга	M13KO7ΔpIII	M13KO7ΔpIII и M13KO7TC	M13KO7ΔpIII	M13KO7ΔpIII
Число клонов, проанализированных методом ELISA	384	96	96	96
Число положительных клонов (поглощение при АТФ+ ≥ 0,2; антиген +/- соотношение > 2)	383	79	41	29
Число переключенных клонов (ATP+/- соотношение > 2)	375	77	40	29

(2-2-3) Анализ последовательности переключаемых антител, антигенсвязывающая активность которых изменяется присутствием/отсутствием АТФ

Нуклеотидные последовательности генов, амплифицированных из клонов с АТФ-зависимой антигенсвязывающей активностью (переключаемые клоны) на основе результатов ELISA фага, анализируют с использованием специфических праймеров pBAD-F, G1seq-R. В результате анализа получены нуклеотидные последовательности клонов, которые, как установлено, связываются с CD137 человека в присутствии АТФ, но не с CD137 человека в отсутствие АТФ.

(2-3) Отбор переключаемых антител

Семнадцать образцов отобраны из клонов, которые, как было установлено, обладают АТФ-зависимой антигенсвязывающей активностью, полученной в результате анализов в примерах 2-1-3 и 2-2-3; названия клонов повторно присвоены, как описано в табл. 31.

Таблица 31.

	Обозначение фага	Обозначение клона вариабельной области антитела
1	dBBATk14-4_003	dBBAT007
2	dBBATk14-4_089	dBBAT013
3	dBBATk17-4_002	dBBAT015
4	dBBATk17-4_009	dBBAT017
5	dBBATk17-4_075	dBBAT019
6	dBBATk05-5_052	dBBAT021
7	dBBATk05-5_076	dBBAT025
8	dBBATk12-5_038	dBBAT029
9	dBBATk12-5_048	dBBAT031
10	dBBATk14-5_012	dBBAT037
11	dBBATk14-5_053	dBBAT042
12	dBBAHk14SF-3_016	dBBAT053
13	dBBAHk14SF-3_032	dBBAT056
14	dBBAHk14FF-4_028	dBBAT091
15	dBBAHk14FS-5_074	dBBAT112
16	dBBAHk14MS-5_034	dBBAT118
17	dBBAHk14MS-5_093	dBBAT119

(2-4) Экспрессия и очистка переключаемых антител, антигенсвязывающая активность которых изменяется присутствием/отсутствием АТФ

Гены, кодирующие вариабельные области антител, описанных в табл. 31, которые получают из рационально разработанной фаговой библиотеки, инсертируют в плазмиды IgG1 человека/Lambda для экспрессии у животных. Антитела экспрессируют с использованием описанных ниже методов. Приготовленные плазмиды вводят методом липофекции в производную от клеток линию клеток FreeStyle 293-F, полученную от почки плода человека (фирма Invitrogen), которую суспендируют в среде для экспрессии FreeStyle 293 (фирма Invitrogen) при плотности клеток 1,33 × 10^6 клеток/мл, полученную суспензию высевают по 3 мл в каждую лунку 6-луночных планшетов. Антитела очищают с использованием rProtein A Sepharose™ Fast Flow (фирма Amersham Biosciences) из супернатантов культур, культивированных в течение четырех дней в инкубаторе с CO_2 (37°C, 8% CO_2, 90 об/мин) методом, известным специалистам в данной области. Спектрофотометры используют для измерения абсорбции очищенных растворов антител при 280 нм. По полученным результатам измерений концентрации очищенных антител были рассчитывают с использованием коэффициентов экстинкции, рассчитанных методом PACE (*Protein Science*, 4, 1995, 2411-2423).

(2-5) Оценка анти-CD137 антител, идентифицированных методом фагового дисплея

(2-5-1) Экспрессия и очистка переключаемых антител, которые связываются с антигенами, в зависимости от наличия или отсутствия АТФ и его метаболитов

Гены, кодирующие вариабельные области антител, полученных из рационально сконструированной фаговой библиотеки человека, инсертируют в плазмиды экспрессии животных, имеющие константную область тяжелой цепи, слитую с геном, кодирующим Gly и Lys ниже по цепи модифицированного IgG1 человека (P253) (SEQ ID NO: 93), и константную область легкой цепи, лямбда-цепи Lamlib (SEQ ID NO: 63). Обозначения и порядковые номера клонов перечислены в табл. 32.

Таблица 32. Оценка клонов.

	Обозначение клонов	SEQ ID NO тяжелой цепи (полной длины)	SEQ ID NO легкой цепи (полной длины)
1	dBBAT007-P253	94	113
2	dBBAT013-P253	95	114
3	dBBAT015-P253	96	115
4	dBBAT017-P253	97	116
5	dBBAT019-P253	98	117
6	dBBAT025-P253	99	118
7	dBBAT029-P253	100	119
8	dBBAT031-P253	100	119
9	dBBAT037-P253	101	120
10	dBBAT042-P253	102	121
11	dBBAT053-P253	103	122
12	dBBAT056-P253	104	123
13	dBBAT021-P253	105	124

	Обозначение клонов	SEQ ID NO тяжелой цепи (полной длины)	SEQ ID NO легкой цепи (полной длины)
14	dBBAT091-P253	106	125
15	dBBAT112-P253	107	126
16	dBBAT118-P253	108	127
17	dBBAT119-P253	109	128
18	dBBAT121-P253	110	129
19	dBBAT122-P253	111	130
20	dBBAT134-P253	112	131

После экспрессирования антитела очищают методами, известными специалистам в данной области. Спектрофотометры применяют для измерения оптической плотности очищенных растворов антител при 280 нм. По установленным значениям рассчитывают концентрации очищенных антител, используя коэффициенты экстинкции, рассчитанные методом PACE (*Protein Science*, 4, 1995, 2411-2423).

Пример 2-5-2. Оценка методом поверхностного плазмонного резонанса влияния АТФ, АДФ и АМФ на связывание CD137 человека

Biacore T200 (фирма GE Healthcare) используют для анализа взаимодействия антиген-антитело между анти-CD137антителами и hCD137 (расщепление FXa). Анти-CD137 антитела захватывают на сенсорном чипе CM3 (фирма GE Healthcare), на котором был иммобилизован белок G (фирма CALBIOCHEM) в соответствующих количествах с помощью метода связывания с амином, и hCD137 (расщепление FXa), полученный в примере 1-2, может вступать в реакцию взаимодействовать. В качестве подвижного буфера используют 20 мМ ACES, 150 мМ NaCl, 2 мМ MgCl2, 0,05% Tween20 (pH 7,4) и 10 мМ глицин-HCl (pH 1,5) в качестве раствора для регенерации.

После улавливания антител к CD137, суспендированных в TBS, в каждую проточную кювету вводят 500 нМ hCD137 (расщепление FXa) при скорости потока 10 мкл/мин в течение трех минут. Этот трехминутный период служит фазой связывания для hCD137 (расщепление FXa), а после окончания фазы связывания двухминутный период переключения на рабочий буфер служит фазой диссоциации для hCD137 (расщепление FXa). После завершения фазы диссоциации регенерирующий раствор вводят со скоростью 30 мкл/мин в течение 30 сек. Выше представлен цикл измерения связывающей активности анти-CD137 антител. Связывающее количество hCD137 (расщепленный FXa), которое взаимодействует с анти-CD137-антителом в фазе связывания, регулируют количеством захваченного антитела. Программное обеспечение Biacore T200 Evaluation Software Version 2,0 используют для отображения количества связывания (RU) на 1RU захватываемого лиганда, и получают значения количества захваченного антитела и количества связываемого антигена. Количество связанного антигена показано в табл. 33. Поскольку количество связанного антигена отражает связывающую активность, можно сказать, что зависимость от низкомолекулярного соединения распознается, когда значение в присутствии низкомолекулярного соединения (АТФ, АДФ или АМФ) выше, чем значение без низкомолекулярного соединения. В частности, чем больше разница, тем выше зависимость от низкомолекулярного соединения.

Таблица 33.

Клон	Низкомолекулярное соединение, концентрация						
	АТФ 1 мМ	АТФ 100 мМ	АДФ 100 мМ	АДФ 10 мМ	АМФ 1 мМ	АМФ 100 мМ	Без низкомолекулярного соединения
dBBAT007-P253	49,2	29,5	89,0	70,0	28,5	16/5	3,6
dBBAT013-P253	26,2	8,1	77,3	48,5	13,8	6,6	2,7
dBBAT015- P253	8,3	3,1	41,8	17,9	11,9	5,5	1,5
dBBAT017- P253	9,8	5,0	39,7	18,8	6,8	4,8	4,4
dBBAT019- P253	3,8	3,0	25,7	7,4	11,1	4,6	3,7
dBBAT021- P253	9,2	2,4	56,6	19,6	5,7	3,0	2,9
dBBAT025- P253	28,5	10,0	89,1	55,7	16,4	6,1	4,4
dBBAT029- P253	10,9	6,9	53,3	38,5	17,4	11,4	3,7
dBBAT031- P253	8,4	5,0	47,8	33,3	14,8	8,3	2,8
dBBAT037- P253	27,5	15,9	72,1	62,9	21,7	13,8	3,8
dBBAT042- P253	11,7	4,3	58,7	19,1	7,8	4,7	2,9
dBBAT053- P253	15,0	8,4	46,9	40,4	9,6	6,9	1,9
dBBAT056- P253	20,3	13,4	59,4	50,7	12,8	9,7	3,7
dBBAT118- P253	27,7	14,1	76,9	62,9	14,9	8,7	3,3
dBBAT121- P253	11,5	4,8	42,3	24,7	6,1	2,6	1,9
dBBAT122- P253	11,5	4,7	55,5	19,2	5,7	4,1	3,3
dBBAT134- P253	5,2	4,4	29,3	16,2	3,7	4,5	3,0
dBBAT091- P253	6,2	3,0	33,0	20,0	2,9	3,3	1,5
dBBAT112- P253	12,6	6,3	43,0	27,4	6,5	4,8	3,7
dBBAT119- P253	45,7	12,9	112,5	67,2	58,6	26,9	3,3

(2-5-3) Оценка связывающей активности с антигеном CD137 обезьяны

Полученные антитела оценивают по связыванию с CD137 обезьяны методом ELISA. Полученный в примере 1 cyCD137-Fc-BAP иммобилизуют на планшетах для микротитрования Streptawell. После удаления несвязавшегося антигена из планшетов промыванием каждой лунки планшетов промывочным буфером лунки блокируют 150 мкл блокирующего буфера (TBS с 2% БСА) в течение 1 ч или более. Блокирующий буфер удаляют из каждой лунки и в каждую лунку добавляют 100 мкл очищенных антител, разведенных в TBS с конечной концентрацией 1 мМ АДФ или TBS с конечной концентрацией 1 мМ АДФ. Планшет, в который вносили антитело, встряхивают при 600 об/мин в течение 1 ч. AP-конъюгированные антитела против лямбда человека (фирма BETHYL), разведенные в TBS с конечной концентрацией 1 мМ АДФ, добавляют в каждую лунку после промывания промывочным буфером (TBS с 0,1% Tween20), содержащим конечную концентрацию 1 мМ АДФ. После инкубации в течение одного часа и промывки промывочным буфером с конечной концентрацией 1 мМ АТФ, добавляют фосфатный субстрат BluePhos (KPL). Развитие цвета измеряют по абсорбции при 600 нм. Скорость увеличения абсорбции при концентрации антитела 0 мкг/мл показана в табл. 34. Можно сказать, что образцы с зависимым от концентрации увеличением коэффициента абсорбции связаны с CD137 обезьяны.

Таблица 34. Коэффициент поглощения.

CD137 обезьяны		dBBAT007	dBBAT013	dBBAT015	dBBAT017	dBBAT019	dBBAT021	dBBAT025	dBBAT029	dBBAT037	dBBAT042
Концентрация антитела (мкг/мл)	10	30.5	43.2	42.9	25.6	40.5	40.5	72.0	50.3	32.5	41.8
	2.5	30.2	42.4	32.4	8.7	40.3	14.0	67.6	42.7	12.7	40.0
	0.625	29.2	33.3	14.4	3.1	39.1	4.6	49.7	26.7	4.6	31.3
	0.156	22.0	15.3	3.6	1.4	23.7	1.7	20.7	9.7	1.9	12.2
	0.039	0.7	4.2	1.5	1.2	8.2	1.2	4.5	2.0	1.3	2.9
	0.010	3.8	1.5	1.1	1.2	2.5	0.9	1.6	1.1	1.1	1.3
	0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

		dBBAT053	dBBAT056	dBBAT091	dBBAT112	dBBAT118	dBBAT119	dBBAT121	dBBAT122	dBBAT134
Концентрация антитела (мкг/мл)	10	17.9	23.1	15.1	19.8	35.4	55.3	26.0	31.9	33.9
	2.5	6.9	10.7	5.5	8.1	30.6	56.6	16.4	16.7	16.8
	0.625	2.3	3.6	1.7	2.8	18.1	57.2	5.9	5.7	5.8
	0.156	1.0	1.3	0.7	1.0	7.1	47.7	1.3	1.9	2.2
	0.039	0.7	0.8	0.5	0.6	1.8	26.6	0.6	1.0	1.2
	0.010	0.8	1.2	0.6	0.6	1.0	10.2	0.6	0.9	1.0
	0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

(2-5-4) Оценка агонистической активности CD137 с использованием клеток Jurkat

Клеточную линию GloResponse™ NF-kappa B-Luc2/4-1BB Jurkat (фирма Promega) используют для измерения активности антител *in vitro*. В каждую лунку 384-луночных планшетов добавляют 10 мкл клеток FcγRIIB CHO-K1 (фирма Promega), приготовленных в концентрации 2×10^6/мл в среде для анализа (99% RPMI, 1% ФСБ). Затем в каждую лунку добавляют 10 мкл раствора антитела, содержащего АДФ, или раствора антитела, содержащего АТФ, или раствора антитела, не содержащего АТФ или АДФ. Затем в каждую лунку добавляют 10 мкл клеточной линии GloResponseTM NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat, приготовленной в концентрации 2×10^6/мл в среде для анализа (99% RPMI, 1% ФСБ). Конечная концентрация АДФ составляет 50 мкМ; конечная концентрация АТФ составляет 50 мкМ. Планшеты оставляют на шесть часов при 37°C в инкубаторе в атмосфере 5% CO_2, затем 15 мин при комнатной температуре и добавляют 30 мкл реагента Bio-Glo в каждую лунку. Систему анализа люциферазы Bio-Glo (буфер и субстрат) применяют для реагента Bio-Glo. Впоследствии люминесценцию каждой лунки измеряют с помощью планшет-ридера. Значение люминесценции каждой лунки, деленное на величину люминесценции лунки без добавленных антител, представляет кратность люминесценции и служит индикатором для оценки активности каждого антитела.

Полученные результаты показаны на фиг. 22 и 23. Фиг. 22 и 23 подтверждают, что все антитела, кроме NS1-P253, которое не является переключаемым антителом, проявляют агонистическую активность CD137 человека АТФ- и АДФ-зависимым образом.

<u>(2-6) Оценка агонистической активности CD137 *in vitro* переключаемых антител, полученных методом пэннинга, с использованием Т-клеток человека</u>

<u>(2-6-1) Размножение культур Т-клеток человека</u>

Используют мононуклеарные клетки периферической крови человека, выделенные из образцов крови здоровых добровольцев. 50 мл крови смешивают с 0,5 мл гепарина и дополнительно разбавляют 50 мл ФСБ. Мононуклеарные клетки периферической крови человека выделяют в два этапа, описанные ниже. На первом этапе в пробирки Leucosep (фирма greiner bio-one) вносят Ficoll-Paque PLUS (фирма GE Healthcare) и центрифугируют 1000×g в течение одной минуты при комнатной температуре с последующим добавлением крови, разбавленной ФСБ, и центрифугируют при комнатной температуре в режиме 400×g в течение 30 мин. На втором этапе лейкоцитарный слой собирают из пробирок после центрифугирования и затем промывают 60 мл ФСБ (фирма Wako). Затем используют набор для активации/размножения Т-клеток человека (фирма MACS Miltenyi biotec) для размножения культур Т-клеток.

(2-6-2) Оценка агонистической активности CD137 *in vitro* с использованием Т-клеток человека

2×10^4 Т-клеток, происходящих из мононуклеарных клеток периферической крови, и 2×10^4 клеток REC-1 суспендируют в 100 мкл среды RPMI1640, содержащей 30 ЕД/мл IL-2 человека (фирма SIGMA), 10 нг/мл PMA (фирма SIGMA), 0,5 мкг/мл иономицина, 500 мкМ АДФ-бета-S (фирма Sigma) и 10% ФСТ (фирма Sigma), высевают в 96-луночные многолуночные планшеты с плоским дном (фирма Corning) с контрольным антителом IC17HdK-hIgG1/IC17L-k0, NS1-P253, которое является антителом с АТФ-независимой связывающей активностью в отношении CD137-человека (называемым во всех приводимых в настоящем описании примерах «непереключаемым антителом» или «непереключаемым анти-CD137 антителом»), или с любым из клонов, описанных в табл. 12. NS1-P253, IC17HdK-hIgG1/IC17L-k0 и клоны, описанные в табл. 12, оценивают в концентрации 10 мкг/мл. Также оценивают выработку IFN-γ в АДФ-бета-S-минус среде. Планшеты встряхивают и затем оставляют при 37°C в течение 72 ч в инкубаторе в атмосфере 5% CO_2. Затем культуральные супернатанты собирают и определяют количество IFN-γ, содержащегося в культуральных супернатантах, используя набор Human IFN-γ ELISA Development Kit (фирма PeproTech). Метод ELISA осуществляют в соответствии с инструкциями производителя (фирма PeproTech). Измерения абсорбции проводят на приборе EnVision (фирма PerkinElmer).

Результаты показаны на фиг. 24.

Было подтверждено, что dBBAT007-P253, dBBAT013-P253, dBBAT015-P253, dBBAT019-P253, dBBAT021-P253, dBBAT025-P253, dBBAT031-P253, dBBAT042-P253, dBBAT056-P253, dBBAT118-P253, dBBAT121-P253, dBBAT122-P253 и dBBAT119-P253 проявляют агонистическую активность в отношении CD137 человека в АДФ-бета-S-зависимым образом. АДФ-бета-S является аналогом АДФ, который менее подвержен гидролизу, чем АДФ. Это указывает на возможность того, что эти анти-CD137 человека переключаемые антитела проявляют агонистическую активность в отношении CD137 человека, зависящую от небольшой молекулы, такой как АТФ, АДФ или АМФ.

(2-6-3) Оценка агонистической активности CD137 *in vitro* с использованием Т-клеток человека (2)

2×10^4 мононуклеарные клетки периферической крови человека, полученные из Т-клеток, и 2×10^4 клеток REC-1 суспендируют в 100 мкл среды RPMI1640, содержащей 30 ЕД/мл IL-2 человека (фирма SIGMA), 10 нг/мл PMA (фирма SIGMA), 0,5 мкг/мл иономицина, 500 мкМ АДФ-бета-S (фирма Sigma) и 10% ФСТ (фирма Sigma), и высевают в 96-луночные плоскодонные планшеты (фирма Corning), либо с NS1-P253 (непереключаемое антитело), либо с dBBAT119-P253. NS1-P253 и dBBAT119-P253 оценивают в концентрации 10, 2, 0,4, 0,08, 0,016, 0,0032 и 0,00064 мкг/мл. Планшеты встряхивают и оставляют при 37°C на 72 ч в инкубаторе в атмосфере 5% CO_2. Затем собирают культуральные супернатанты и определяют количество IFN-γ, содержащегося в культуральных супернатантах, с использованием набора для метода ELISA для IFN-γ человека (фирма PeproTech). Измерения абсорбции проводят с помощью EnVision (фирма PerkinElmer).

Результаты представлены на фиг. 25.

Было подтверждено, что dBBAT119-P253 проявляет агонистическую активность в отношении CD137 человека в присутствии АДФ-бета-S. Это указывает на возможность того, что dBBAT119-P253 проявляет агонистическую активность в отношении CD137 человека в зависимости от небольшой молекулы, такой как АТФ, АДФ или АМФ.

Контрольный пример 3. Повышение связывающей активности антител, связывающих антигены в присутствии малых молекул, с использованием рационально разработанных библиотек легких и тяжелых цепей

(3-1) Создание библиотеки для повышения связывающей активности с использованием рационально разработанной библиотеки легких цепей

Для библиотеки антител, содержащей большое количество антител, собранных в контрольном примере 2-2-1, с АТФ-зависимой антигенсвязывающей активностью, усиление связывающей активности осуществляют путем повторной библиотекаризации легких цепей антитела.

Области легкой цепи и тяжелой цепи рационально сконструированной библиотеки фагового дисплея антитела, сконструированной в предшествующем патенте WO2015/083764, используют для конструирования библиотеки легкой цепи антитела и библиотеки тяжелой цепи антитела для усиления связывающей активности. Их вводят в указанную выше библиотеку легких цепей или в области легкой цепи или тяжелой цепи библиотеки фагмидных векторов, собранные в примере 2-2-1, и вводят в штамм *E. coli* ER2738 путем электропорации.

(3-2) Повышение связывающей активности антител с АТФ-зависимой антигенсвязывающей активностью с использованием рационально разработанной библиотеки

Фаги получают обычным способом из *E. coli*, несущий сконструированную фагмиду фагового дисплея. В частности, штамм *E. coli*, несущий сконструированный фагмидный вектор, инфицируют M13KO7TC (WO2015/046554) или M13KO7ΔpIII (гиперфаг) (фирма PROGEN Biotechnik), и фаги собирают из супернатантов после культивирования в течение ночи при 30°C. Суспензию фаговой библиотеки получают разбавлением TBS популяции фагов, осажденных путем добавления 2,5 M NaCl/10% PEG к культуре *E. coli*, в которой осуществляли выработку фага. Затем к раствору фаговой библиотеки добавляют БСА до конечной концентрации 4%. Пэннинг проводят, используя антиген, иммобилизованный на магнитных гранулах. Покрытые NeutrAvidin гранулы (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated), гранулы NeutrAvidin (фирма TAMAGAWA SEIKI) или гранулы Dynabeads MyOne StreptAvidin T1 (фирма Thermo Fisher Scientific) применяют в качестве магнитных гранул. В качестве антигена применяют биотинилированный hCD137-Fc.

Пэннинг проводят для эффективного получения низкомолекулярных переключаемых антител, которые зависят от малой молекулы, которая может играть роль переключателя в раковых тканях. В частности, пэннинг для обогащения антител, которые связываются с антигенами в присутствии аденозинтрифосфата (аденозин-5'-трифосфата; АТФ) – небольшую молекулы, и не связывается с антигенами в отсутствие АТФ, выполняют со ссылкой на методы, изложенные в предыдущем патенте WO2015/083764.

(3-3) Оценка связывающей активности в присутствии и в отсутствие АТФ с помощью фагового ELISA

Из отдельных колоний E. coli, полученных после каждого раунда описанными выше методами, супернатанты фагосодержащих культур собирают с использованием обычного метода (*Methods Mol. Biol.*, 178, 2002, 133-145). Связывающую активность с CD137 человека в присутствии и в отсутствие АТФ затем подтверждают методами фагового ELISA, описанными в контрольном примере 2-2-2.

Результаты представлены на фиг. 26.

Был получен ряд клонов, которые были признаны клонами, обладающими АТФ-зависимой антигенсвязывающей активностью, с отношением поглощения S/N более 2 в присутствии/в отсутствие антигена и отношением S/N поглощения более 2 в присутствии/отсутствии АТФ (переключенные клоны).

Контрольный пример 4. Выработка модифицированных анти-CD137 антител и оценка их активности

(4-1) Повышение связывающей активности за счет изменения dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib

Варианты вариабельной области тяжелой цепи, dBAT119H, и вариабельной области легкой цепи, dBAT119L, анти-CD137 антитела (название клона: dBBAT119H-P253/dBAT119L-LamLib), полученные в контрольном примере 2-4, получают методами, известными специалистам в данной области, например ПЦР. Для вариабельной области тяжелой цепи создают варианты, в которых D10 (относится к аспарагиновой кислоте (Asp) в положении 10 (нумерация по Kabat)) и G17 (относится к глицину (Gly) в положении 17 (нумерация по Kabat)) dBBAT119H заменены глицином (Gly) и серином (Ser), соответственно, с получением dBBAT119H010; и N99 (в отношении аспарагина (Asn) в позиции 99 (нумерация по Kabat)), M100a (в отношении метионина (Met) в позиции 100a (нумерация по Kabat)) и N100b (в отношении аспарагина (Asn) в позиции 100b (нумерация по Kabat))) dBBAT119H010 заменены другими аминокислотами. Для вариабельной области легкой цепи были созданы варианты, в которых F87 (относящийся к фенилаланину (Phe) в положении 87 (нумерация по Kabat)) dBBAT119L заменен тирозином (Tyr) с образованием dBBAT119L010; и D27b (относится к аспартату (Asp) в позиции 27b (нумерация по Kabat)), N31 (относится к аспарагину (Asn) в позиции 31 (нумерация по Kabat)) и D94 (относится к аспартату (Asp) в позиции 94 (нумерация по Kabat))) в dBBAT119L010 заменены другими аминокислотами.

Для вариантов вариабельной области тяжелой цепи связывающую активность с CD137 человека измеряют с помощью анализатора поверхностного плазмонного резонанса BiacoreT200 (фирма GE Healthcare). Антитела захвачены путем взаимодействия очищенных вариантов с иммобилизованным белком G (фирма CALBIOCHEM) на сенсорном чипе CM3 серии S (фирма GE Healthcare). Затем раствор CD137 человека (расщепленного FXa) с добавлением АТФ или раствор CD137 человека (расщепленного FXa) без АТФ взаимодействует в присутствии АТФ и в отсутствие АТФ для оценки связывающей активности вариантов по отношению к CD137 человека (расщепленного FXa). Измерения проводят при 25°C с использованием подвижного буфера, включающего 20 мМ ACES, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween20 и 2 мМ $MgCl_2$, pH 7,4. Результаты измерений показывают, что вариант L100a (вариант, в котором метионин (Met) в положении 100a (нумерация по Kabat) заменен лейцином (Leu)) имеет повышенную связывающую активность с CD137 человека только в присутствии АТФ (фиг. 6). Вариабельная область тяжелой цепи варианта L100a представляет собой dBATk119H024 (SEQ ID NO: 132). Связывающее количество CD137 человека выверяют по захваченному количеству каждого варианта (1000 RU).

Для вариантов вариабельной области легкой цепи связывающую активность с CD137 человека (расщепление FXa) определяют с помощью BiacoreT200 в условиях, аналогичных описанным выше. Результаты измерений показывают, что вариант E94 (вариант, в котором аспартат (Asp) в положении 94 (нумерация по Kabat) заменен глутаматом (Glu)) имеет повышенную связывающая активность только с CD137 человека в присутствии АТФ (фиг.6). Вариабельной областью легкой цепи варианта E94 является dBBATk119L020 (SEQ ID NO: 133).

Такие варианты, сочетающие указанные варианты тяжелой цепи и легкой цепи, сокращенно обозначают аббревиатурами dBBATk119H024-P253/dBATk119L020-LamLib (вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 132; вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 133; константная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 93 и константная область легкой цепи SEQ ID NO: 63).

Антитела в настоящем изобретении обозначают в соответствии со следующим правилом: (вариабельная область тяжелой цепи) - (константная область тяжелой цепи)/(вариабельная область легкой цепи) - (константная область легкой цепи).

Например, название антитела dBBAT119H-P253/dBAT119L-LamLib означает, что оно состоит из вариабельной области тяжелой цепи антитела - dBAT119H, константной области тяжелой цепи антитела - P253, вариабельной области легкой цепи антитела - dBBAT119L, и константной области легкой цепи - LamLib.

(4-2) Оценка агонистической активности CD137 модифицированных анти-CD137 антител человека *in vitro*, используя Т-клетки человека

(4-2-1) Размножение культур Т-клеток человека

Т-клетки человека размножают и культивируют согласно описанному в контрольном примере 2-6-1 (4-2-2) Оценка агонистической активности CD137 *in vitro*, используя Т-клетки человека

Методами, описанными в контрольном примере 2-6-2, оценивают выработку IFN-γ в присутствии NS1-P253 (непереключаемого антитела), dBBAT119H-P253/dBAT119L-LamLib, dBBATk119H024-P253/dBATk119L020-LamLib или контрольного антитела, IC17HdK-hIgG1/IC17L-k0 при 10, 2, 0,4, 0,08 и 0,016 мкг/мл, соответственно. Также оценивают выработку IFN-γ в среде АДФ-бета-S-минус.

Оба результата показаны на фиг. 28.

Модифицированное антитело dBBATk119H024-P253/dBBATk119L020-LamLib проявляет усиленную АДФ-бета-S-зависимую агонистическую активность по сравнению с dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib. Это указывает на возможность того, что dBBATk119H024-P253/dBATk119L020-LamLib проявляет более сильную АТФ-, АДФ- и АМФ-зависимую агонистическую активность в отношении CD137 человека по сравнению с dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib.

Контрольный пример 5. Дополнительные модификации анти-CD137 антител

(5-1) Поиск модификаций, которые повышают связывающую активность, путем внесения комплексных модификаций

Для получения высококачественных анти-CD137 антител аминокислотные модификации четко интродуцируют в вариабельную область тяжелой цепи, dBBATk119H024, и вариабельную область легкой цепи, dBBATk119L020, анти-CD137 антител, полученных в контрольном примере 4-1. С помощью методов, известных специалистам в данной области, таких как ПЦР, созданы варианты, в которых каждый из всех аминокислотных остатков, составляющих CDR dBBATk119H024 и dBBATk119L020, заменены всеми 18 аминокислотами, кроме цистеина. Измерения приблизительно 1200 вариантов, вырабатываемых для связывания CD137 человека, выполняют с использованием Biacore4000. Антитела захвачены взаимодействующими культуральными супернатантами вариантов с иммобилизованным белком G (фирма CALBIOCHEM) на сенсорном чипе CM3 серии S (фирма GE Healthcare). Затем раствор CD137 человека с добавлением малых молекул (АТФ) или раствор CD137 человека без добавления малых молекул подвергают взаимодействию в присутствии малой молекулы или в отсутствие малой молекулы для оценки связывающей активности антител по отношению к CD137 человека. Измерения проводят при 25°C с использованием подвижного буфера с добавлением $CaCl_2$, содержащего 20 мМ ACES, 150 мМ NaCl, 0,02% Tween20 и 2 мМ MgCl2, pH 7,4.

(5-2) Повышение связывания АТФ

Ген тяжелой цепи антитела A002-P253 (SEQ ID NO: 134) создан путем объединения модификаций, выявленных в примере 5-1, которые увеличивают связывающую активность с CD137 человека в присутствии небольшой молекулы, в гене dBBATk119H024-P253, имеющем dBBATk119H024 (SEQ ID NO: 132) в качестве вариабельной области тяжелой цепи, и P253 (SEQ ID NO: 93) в качестве константной области тяжелой цепи, который получают путем введения модификации S267E/L328F и удалением C-концевого Gly и Lys из IgG1 человека. Ген легкой цепи антитела B040-Lamlib (SEQ ID NO: 135) также создают путем объединения модификаций, обнаруженных в контрольном примере 5-1, которые увеличивают связывающую активность с CD137 человека в присутствии небольшой молекулы, в легкой цепи антитела dBBATk119L020-Lamlib, имеющий dBBATk119L020 (SEQ ID NO: 133) в качестве вариабельной области легкой цепь λ человека Lamlib (SEQ ID NO: 63) в качестве константной области легкой цепи. Эти гены объединяют для экспрессии и очистки антител способами, известными специалистам в данной области, для получения анти-CD137 антитела интереса, A002-P253/B040-Lamlib. Вариабельная область тяжелой цепи A002-P253/B040-Lamlib - это A002 (SEQ ID NO: 136), вариабельная область легкой цепи - B040 (SEQ ID NO: 137), константная область тяжелой цепи - P253 (SEQ ID NO: 93), а константная область легкой цепи представляет собой цепь λ Lamlib человека (SEQ ID NO: 63).

Для вариабельной области тяжелой цепи A002-P253/B040-Lamlib, полученной в этом разделе, создают различные варианты, в которых 53-я, 54-я или 55-я аминокислоты по нумерации Kabat заменены другими аминокислотами с целью повышения уровня АТФ-связывающей активности. Табл. 35 показывает модификации аминокислот (нумерация по Kabat) из A002 в вариабельных областях разработанных антител.

Таблица 35.

Вариабельная область тяжелой цепи	Аминокислотное изменение A002 (нумерация по Kabat)
A002	—
A146	S54A / N55S
A159	R53S / N55S
A160	R53T / N55S
A161	R53Q / N55S
A162	R53K / N55S
A163	R53H / N55S
A164	R53S / N55T
A165	R53T / N55T
A166	R53Q / N55T
A167	R53K / N55T
A168	R53H / N55T
A169	R53S / N55H
A170	R53T / N55H
A171	R53Q / N55H

Связывающую активность вырабатываемых вариантов по отношению к АТФ и CD137 человека оценивают с помощью Biacore T200.

Измерения АТФ-связывающей активности проводят при 37°C с использованием подвижного буфера, содержащего 20 мМ ACES (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 2 мМ MgCl2 и 0,05% Tween20. Сначала антитела захватываются путем взаимодействия растворов антител в подвижном буфере с иммобилизованным Sure Protein A (фирма GE Healthcare) на сенсорном чипом CM3 Series S (фирма GE Healthcare). Затем связывающую активность антител оценивают по взаимодействию с раствором АТФ, приготовленным в подвижном буфере. Чип регенерируют, используя 25 мМ NaOH и 10 мМ глицин-HCl (pH 1,5), измерения проводят путем многократного захвата антител. Количество связывания АТФ для каждого антитела рассчитывают путем корректировки количества связывания АТФ при инъекции в концентрации 100 нМ на количество антитела, захваченного на поверхности чипа, как количество АТФ на единицу количества антитела.

Измерение связывающей активности по отношению к CD137 человека проводят при 37°C с использованием 20 мМ ACES (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 2 мМ $MgCl_2$ и 0,05% Tween20 в качестве подвижного буфера. Сначала антитела улавливают путем взаимодействия растворов антител, приготовленных в подвижном буфере, с иммобилизованным Sure Protein A (фирма GE Healthcare) на сенсорным чипе CM3 Series S (фирма GE Healthcare). Затем оценивают активность связывания с CD137 человека путем взаимодействия с раствором CD137 человека, дополненным 100 мкМ АТФ в качестве небольшой молекулы. Для антигена CD137 человека используют hCD137-HisBAP, полученный в контрольном примере (1-1), и измерения проводят при концентрации антигена 0, 15 625, 62,5, 250 или 1000 нМ. Чип регенерируют, используя 25 мМ NaOH и 10 мМ глицин-HCl (pH 1,5), измерения проводят путем многократного захвата антител. Константу диссоциации (KD) соответствующих антител для CD137 человека рассчитывают с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software 2.0. В частности, константу скорости ассоциации ka (л/моль/сек) и константу скорости диссоциации kd (1/с) рассчитывают путем глобальной подгонки сенсограмм, полученных путем измерения с помощью модели связывания Ленгмюра 1:1, и константу диссоциации KD (моль/л) рассчитывают по этим значениям.

В табл. 36 представлены результаты таких измерений.

Таблица 36. Анализ связывания с АТФ и CD137 человека

Антитело		Параметр связывания с CD137 человека (АТФ = 100 мкМ)		
	Связывание с АТФ	ka	kd	KD
A002-P253/B040-Lamlib	-0.0001	3.94E+04	2.89E-03	7.35E-08
A146-P253/B040-Lamlib	-0.0001	7.80E+04	2.32E-02	2.97E-07
A159-P253/B040-Lamlib	0.0013	8.21E+04	3.83E-02	4.66E-07
A160-P253/B040-Lamlib	-0.0001	9.59E+03	2.46E-02	2.56E-06
A161-P253/B040-Lamlib	0.0010	1.87E+04	2.35E-02	1.25E-06
A162-P253/B040-Lamlib	0.0002	1.47E+05	3.17E-02	2.16E-07
A163-P253/B040-Lamlib	0.0016	5.60E+04	1.36E-02	2.43E-07
A164-P253/B040-Lamlib	0.0017	9.81E+04	4.38E-02	4.46E-07
A165-P253/B040-Lamlib	0.0002	1.14E+04	1.96E-02	1.72E-06
A166-P253/B040-Lamlib	0.0011	1.21E+04	1.92E-02	1.59E-06
A167-P253/B040-Lamlib	0.0001	8.45E+04	3.96E-02	4.69E-07
A168-P253/B040-Lamlib	0.0017	7.01E+04	1.81E-02	2.58E-07
A169-P253/B040-Lamlib	0.0011	1.15E+04	5.88E-03	5.11E-07
A170-P253/B040-Lamlib	0.0000	5.13E+03	5.36E-03	1.04E-06
A171-P253/B040-Lamlib	0.0012	4.93E+03	5.24E-03	1.06E-06

Как показано в табл. 36, варианты, в которых 53-я, 54-я или 55-я аминокислоты (нумерация по Kabat) вариабельной области тяжелой цепи заменены другими аминокислотами, имеют повышенную АТФ-связывающую активность по сравнению с антителом A002-P253/B040-Lamlib до модификации, за исключением A146-P253/B040-Lamlib и A160-P253/B040-Lamlib. Сравнение константы скорости ассоциации ka (л/моль/сек) также показывает, что константа скорости ассоциации для CD137 человека увеличена для антител A146-P253/B040-Lamlib, A159-P253/B040-Lamlib, A162-P253/B040-Lamlib. , A163-P253/B040-Lamlib, A164-P253/B040-Lamlib, A167-P253/B040-Lamlib и A168-P253/B040-Lamlib среди антител, оценка которым дана выше.

<u>(5-3) Повышение связывающей активности путем внесения комплексных модификаций</u>

Для создания лучших анти-CD137 антител, модификации, выявленные в контрольном примере 5-1, которые увеличивают активность связывания CD137 человека в присутствии малой молекулы и уменьшают связывание с CD137 человека в условиях, когда эта малая молекула отсутствует, и модификации, выявленные в контрольном примере 5-2, которые увеличивают АТФ-связывающую активность и увеличивают константу скорости ассоциации для CD137 человека, были объединены для получения антител против CD137 человека, которые проявляют лучший профиль. Были разработаны гены тяжелой цепи антитела, которые объединяют модификации, обнаруженные в примерах 5-1 и 5-2 в гене тяжелой цепи антитела A002-G1T3, имеющем последовательность A002 (SEQ ID NO: 136) в качестве вариабельной области тяжелой цепи, и последовательность G1T3 (SEQ ID NO: 138) в качестве константной области тяжелой цепи, которая была получена путем введения модификации K214R/Q419E и удаления С-концевых Gly и Lys из IgG1 человека. Гены легкой цепи антитела получены путем объединения модификаций, обнаруженных в примере 5-1, в легкой цепи антитела B040-Lamlib, имеющей последовательность B040 (SEQ ID NO: 137) в качестве вариабельной области легкой цепи и Lamlib λ-цепи человека в качестве константной области легкой цепи.

В качестве объекта для сравнения используют ген тяжелой цепи антитела 20H4.9-P253, имеющий вариабельную область тяжелой цепи 20H4.9 (SEQ ID NO: 139) существующего анти-CD137 антитела, описанного в US8137667 и P253 (SEQ ID NO: 93) как константная область тяжелой цепи; и ген легкой цепи антитела, который объединяет вариабельную область легкой цепи 20H4.9LC (SEQ ID NO: 140) с цепью k человека к0 (SEQ ID NO: 141) в качестве константной области легкой цепи. В качестве другого объекта сравнения, ген тяжелой цепи антитела MOR-7480.1H-P253, имеющий вариабельную область тяжелой цепи MOR-7480.1H (SEQ ID NO: 142), который составляет существующее анти-CD137MOR-7480.1 антитело, описанное в US8337850, и P253 (SEQ ID NO: 93) в качестве константной области тяжелой цепи; и легкая цепь антитела MOR-7480.1L-lam, объединяющая вариабельную область легкой цепи MOR-7480.1L (SEQ ID NO: 143) с lam λ-цепи человека (SEQ ID NO: 63) в качестве константной области легкой цепи (примечание: и Lamlib λ-цепи человека, и lam человека имеют одинаковую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 63)).

Эти гены объединяют для экспрессии и очистки антител с использованием методов, известных специалистам в данной области, для получения анти-CD137 антител интереса. Табл. 37 представляет собой список номеров последовательностей вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области легкой цепи, константной области тяжелой цепи, константной области легкой цепи и гипервариабельной области (гипервариабельная область; также называемая HVR или CDR) разработанных антител.

Таблица 37. Аминокислотные последовательности тяжелых цепей и легких цепей и их гипервариабельных областей (последовательности обозначены номерами ID).

Обозначение антител	Вариабельная область		Константная область		Гипервариабельная область (HVR)					
	Тяжелая цепь	Легкая цепь	Тяжелая цепь	Легкая цепь	H1	H2	H3	L1	L2	L3
A375-G1T3/ B167-Lamlib	43	54	138	63	7	8	17	21	26	27
A372-G1T3/ B040-Lamlib	44	55	138	63	7	9	17	22	26	27
A356-G1T3/ B040-Lamlib	45	55	138	63	7	10	17	22	26	27
A486-G1T3/ B167-Lamlib	46	54	138	63	7	11	18	21	26	27
A487-G1T3/ B167-Lamlib	47	54	138	63	7	8	18	21	26	27
A488-G1T3/ B226-Lamlib	48	56	138	63	7	12	18	21	26	28
A489-G1T3/ B223-Lamlib	49	57	138	63	7	13	18	21	26	29
A548-G1T3/ B376-Lamlib	50	58	138	63	7	14	19	23	26	27
A551-G1T3/ B256-Lamlib	51	59	138	63	7	15	20	24	26	27
A551-G1T3/ B379-Lamlib	51	60	138	63	7	15	20	25	26	27

Обозначение антител	Вариабельная область		Константная область		Гипервариабельная область (HVR)					
	Тяжелая цепь	Легкая цепь	Тяжелая цепь	Легкая цепь	H1	H2	H3	L1	L2	L3
A555-G1T3/ B379-Lamlib	52	60	138	63	7	16	20	25	26	27
A548-G1T3/ B256-Lamlib	50	59	138	63	7	14	19	24	26	27
A549-G1T3/ B167-Lamlib	53	54	138	63	7	14	17	21	26	27

Связывание разработанных вариантов с АТФ и CD137 человека оценивают с помощью Biacore T200. Измерения связывания CD137 человека проводят при 37°C с использованием 20 мМ ACES (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 2 мМ $MgCl_2$ и 0,05% Tween20 в качестве подвижного буфера. Сначала 250-400 RU антител захватывают путем взаимодействия растворов антител, приготовленных в подвижном буфере, с иммобилизованным Sure Protein A (фирма GE Healthcare) на сенсорным чипе CM3 Series S (фирма GE Healthcare). Связывающую активность по отношению к CD137 человека в присутствии АТФ или в отсутствие АТФ затем оценивают путем взаимодействия с раствором CD137 человека, приготовленным в подвижном буфере, дополненном требуемой концентрацией АТФ, или с раствором CD137 человека, приготовленным в подвижном буфере без АТФ. Для антигена CD137 человека используют hCD137-HisBAP, полученный в примере (1-1), и измерения значения KD проводят при концентрации антигена 0, 15 625, 62,5, 250 и 1000 нМ. Для оценки связанного количества проводят измерения при концентрации антигена 0 и 1000 нМ. Чип регенерируют с помощью 25 мМ NaOH и 10 мМ глицин-HCl (pH 1,5), и измерения проводят путем многократного захватываемых антител. Константу диссоциации соответствующих антител для CD137 человека рассчитывают с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software 2.0. В частности, константу скорости ассоциации ka (л/моль/с) и константу скорости диссоциации kd (1/с) рассчитывают путем глобальной подгонки сенсограмм, полученных путем измерения с помощью модели связывания Ленгмюра 1:1, и константу диссоциации KD (моль/л) рассчитывают по этим значениям.

В табл. 38 представлены результаты таких измерений.

Таблица 38. Изучение связывания модифицированных антител с CD137 человека.

Обозначение антител	Связывание с CD137 человека						K_D (M) CD137 человека					
	Без АТФ	АТФ= 1 мкМ	АТФ= 10 мкМ	АТФ= 100 мкМ	АДФ= 10мкМ	АМФ= 10 мкМ	Без АТФ	АТФ= 1 мкМ	АТФ= 10 мкМ	АТФ= 100 мкМ	АДФ= 10 мкМ	АМФ= 10 мкМ
20H4.9-P253/20H4.9LC-k0	0.280	0.283	0.283	0.283	0.287	0.287	2.68E-08	2.17E-08	2.03E-08	2.04E-08	1.90E-08	2.17E-08
MOR-7480.1H-P253/ MOR-7480.1L-lam	0.260	0.261	0.261	0.261	0.266	0.266	8.22E-08	8.40E-08	7.50E-08	6.31E-08	7.30E-08	8.46E-08
A375-G1T3/B167-Lamlib	0.053	0.179	0.255	0.275	0.280	0.276	НД	4.43E-07	6.17E-08	1.35E-08	5.43E-09	8.91E-09
A372-G1T3/B040-Lamlib	0.017	0.135	0.242	0.269	0.284	0.245	НД	1.14E-06	1.58E-07	5.25E-08	9.36E-09	1.47E-07
A356-G1T3/B040-Lamlib	0.008	0.083	0.211	0.262	0.278	0.255	НД	N.A.	4.90E-07	1.19E-07	3.31E-08	1.34E-07
A486-G1T3/B167-Lamlib	0.128	0.260	0.282	0.292	0.294	0.289	1.04E-06 *	7.30E-08	1.08E-08	3.22E-09	2.48E-09	4.33E-09
A487-G1T3/B167-Lamlib	0.110	0.229	0.270	0.282	0.283	0.279	1.43E-06 *	1.63E-07	2.70E-08	7.33E-09	3.01E-09	3.86E-09
A488-G1T3/B226-Lamlib	0.042	0.135	0.232	0.268	0.281	0.261	НД	4.24E-07	1.33E-07	5.77E-08	1.60E-08	6.80E-08
A489-G1T3/B223-Lamlib	0.004	0.095	0.214	0.257	0.276	0.261	НД	4.42E-06	3.45E-07	1.59E-07	5.45E-08	1.05E-07
A548-G1T3/B376-Lamlib	0.012	0.149	0.245	0.270	0.270	0.262	НД	6.75E-07	7.69E-08	1.53E-08	1.55E-08	3.71E-08
A551-G1T3/B256-Lamlib	0.006	0.133	0.254	0.285	0.285	0.275	НД	1.23E-06	1.44E-07	2.91E-08	2.81E-08	6.12E-08
A551-G1T3/B379-Lamlib	0.014	0.173	0.271	0.290	0.291	0.283	НД	5.59E-07	7.17E-08	1.58E-08	1.51E-08	3.25E-08
A555-G1T3/B379-Lamlib	0.017	0.180	0.267	0.282	0.282	0.274	НД	4.77E-07	5.84E-08	1.35E-08	1.31E-08	2.75E-08
A548-G1T3/B256-Lamlib	0.009	0.156	0.257	0.284	0.287	0.276	НД	9.31E-07	1.08E-07	2.63E-08	2.14E-08	4.61E-08
A549-G1T3/B167-Lamlib	0.048	0.209	0.261	0.277	0.279	0.272	НД	2.04E-07	2.83E-08	6.12E-09	5.53E-09	1.35E-08

НД (нет данных) – активность слишком мала, чтобы определить величину K_D.
*Величину KD определяют по модели устойчивого состояния.

Значения «связывание с CD137 человека» в табл. 38 выше указывают количество связывания CD137 человека на единицу количества антитела, когда CD137 человека допускает взаимодействовать при 1000 нМ при каждой концентрации АТФ, указанной выше, и «KD (M) для CD137 человека» указывает константу диссоциации CD137 человека при каждой концентрации АТФ. Значения KD, отмеченные в таблице знаком «*», рассчитаны с использованием модели устойчивого состояния. Количество связывания всех разработанных вариантов в присутствии 10 мкМ АТФ больше, чем при концентрации АТФ 1 мкМ, и даже больше в присутствии 100 мкМ, что позволяет предположить, что они связываются с CD137 человека в зависимости от концентрации АТФ. С другой стороны, объекты сравнения, 20H4.9-P253/20H4.9LC-k0 и MOR-7480.1 H-P253/MOR-7480.1L-lam, не проявляют связывания с CD137 человека зависимым от концентрации АТФ образом.

(5-4) Оценка *in vitro* АТФ-зависимой агонистической активности в отношении CD137 модифицированных антител против CD137 человека с использованием анализа репортерного гена 4-1BB Jurkat

Клеточную линию GloResponse™ NF-к B-Luc2/4-1BB Jurkat (фирма Promega, CS196004) используют для измерения *in vitro* активности разработанных вариантов. В каждую лунку 96-луночных планшетов добавляют по 200 мкл суспензии клеток FcγRIIB CHO-K1 (фирма Promega), приготовленных в концентрации 5×10^4/мл в среде, и оставляют на ночь при 37°C в инкубаторе в атмосфере 5% CO_2. В качестве питательной среды используют культуральную среду CHO (90% Ham's F12, 10% ФСБ). Затем, после того, как всю среду удаляют, по 25 мкл суспензии клеточной линии GloResponse™ NF-кB-Luc2/4-1BB Jurkat с концентрацией 2×10^6/мл в среде для исследования (99% RPMI, 1% ФСБ) вносят в каждую лунку. Затем добавляют 25 мкл каждого раствора антител, разбавленного средой для исследования таким образом, чтобы конечная концентрация составляла 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 и 10 мкг/мл; и, наконец, добавляли 25 мкл раствора АТФ, разбавленного средой для исследования, таким образом, чтобы конечная концентрация стала 0 и 250 мкМ. Планшеты оставляют на 6 ч при 37°C в инкубаторе в атмосфере 5% CO_2 и на 15 мин при комнатной температуре; по 75 мкл реагента Bio-Glo вносят в каждую лунку. Для реагента Bio-Glo используют систему анализа люциферазы Bio-Glo (буфер и субстрат). Впоследствии люминесценцию каждой лунки измеряют с помощью планшет-ридера. Величина люминесценции каждой лунки, деленная на величину люминесценции лунки без добавления антител, является относительной световой единицей (кратная индукция) и служит индикатором для оценки агонистической активности в отношении CD137 каждого антитела. Результаты показаны на фиг. 29.

<u>(5-5) Оценка *in vitro* АТФ-зависимой агонистической активности в отношении CD137 модифицированных антител против CD137 человека с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека</u>

<u>(5-5-1) Выделение мононуклеарных клеток периферической крови человека</u>

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (МКПК) выделяют из образцов крови здоровых добровольцев в компании Заявителя по технологии, описанной в примере 2-6-1. Впоследствии клетки разводят в среде (5% сыворотки человека (фирма SIGMA), 95% AIM-V (фирма Thermo Fischer Scientific) до плотности клеток 5×10^6/мл.

<u>(5-5-2) Оценка агонистической активности в отношении CD137 с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека</u>

Мононуклеарные клетки периферической крови человека доводят до плотности 5×10^6/мл и высевают в 96-луночные планшеты с плоским дном (фирма Corning) по 100 мкл в каждую лунку. Затем добавляют по 50 мкл раствора с концентрацией 0,04 мкг/мл антитела против CD3ε человека (фирма BD, клон SP34) и по 20 мкг/мл антитела против CD28 человека (фирма BD, клон: CD28.2), разведенных в среде. Планшеты встряхивают и оставляют в инкубаторе в атмосфере 5% CO_2 при 37°C на 6 ч. Затем в каждую лунку добавляют по 25 мкл среды с 2 мМ АТФ (фирма SIGMA) или среды без АТФ и по 25 мкл каждого антитела в концентрации 40 мкг/мл, и планшеты встряхивают перед тем, как оставить в инкубаторе в атмосфере с5% CO_2 при 37°C на 18 ч. Затем часть культурального супернатанта собирают, и культуральный супернатант используют для подсчета содержания IL-2 в культуральном супернатанте с Human IL-2 DuoSet ELISA kit (фирма R&D systems) или Human IL-2 ELISA Set (фирма BD Biosciences). После сбора культурального супернатанта планшеты снова оставляют в инкубаторе в атмосфере с5% CO_2 при 37°C на 24 ч. Затем собирают часть культурального супернатанта, и количество IFN-γ, содержащегося в культуральном супернатанте, определяют с использованием набора Human IFN-γ DuoSet ELISA kit (фирма R&D systems) или Human IFN-γ

ELISA Development Kit (фирма PeproTech). Анализ ELISA осуществляют в основном по протоколу поставщика набора. Для набора Human IL-2 DuoSet ELISA (фирма R&D systems) и набора Human IFN-γ DuoSet ELISA (фирма R&D systems) появление окраски и прекращение проявления окраски выполняют в соответствии с протоколами с использованием раствора субстрата (фирма R&D systems), содержащего H_2O_2 и тетраметилбензидин, и 1н H_2SO_4 (фирма Wako). Для набора Human IL-2 ELISA Set (фирма BD Biosciences) развитие окраски прекращают с использованием 1 н H_2SO_4 (фирма Wako). Для набора IFN-γ ELISA Development Kit (фирма PeproTech) используют раствор хромогена TMB (фирма Thermo Fischer Scientific) и 1 н H_2SO_4 (фирма Wako) для проявления окраски и ее прекращения. Затем проводят измерения поглощения с помощью ридера EnVision (фирма PerkinElmer).

Результаты подробно описаны в контрольном примере 5-5-3 и в дальнейшем описании.

<u>(5-5-3) Оценка усиления агонистической активности константной области тяжелой цепи путем увеличения связывающей активности с рецептором Fcγ</u>

In vitro с применением моноцитов периферической крови человека согласно описанию в контрольных примерах 5-5-1 и 5-5-2 оценивают эффект применения P587, MY518, TT14 и TT16, которые по-разному увеличивают FcγRIIb-связывающую активность константной области тяжелой цепи, по агонистической активности в отношении CD137.

Оцениваемые антитела представлены в табл. 39.

Получение антител, перечисленных в табл. 39, описано в контрольном примере 7-1. По сравнению с количествами IL-2 и IFN-γ в супернатанте культуры, когда антитело отрицательного контроля (IC17HdK-MY518/IC17L-k0, IC17HdK-G4d/IC17L-k0) добавляют в присутствии 250 мкМ АТФ, если добавление антитела увеличивает количество IL-2 в супернатанте культуры в 1,05 раза или более и количество IFN-γ в 1,15 раза или более, установлено, что антитело демонстрирует агонистическую активность в отношении CD137. Измерение агонистической активности с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК) может отличаться в зависимости от доноров крови. В связи с этим было определено, что антитела, которые не проявляют агонистической активности в отношении CD137 для некоторой части или более чем для половины МКПК человека, выделенных от нескольких доноров, можно расценивать как не проявляющие агонистической активности в отношении CD137, даже если они соответствуют стандартам агонистической активности для другой части МКПК человека.

Антитела, которые рассматривают в качестве проявляющих агонистическую активность в отношении CD137 в присутствии 250 мкМ АТФ, показаны в табл. 39. Это указывает на то, что агонистическая активность в отношении CD137 была усилена путем комбинирования TT16 с P587, который увеличивает связывающую активность с FcγRIIb константной области тяжелой цепи (фиг. 30 и 31). Предполагают, что агонистическая активность усилена за счет увеличения связывающей активности в отношении клеток, экспрессирующих FcγRIIb, которые представляют собой перекрестно-связывающие каркасы, необходимые для того, чтобы антитело проявляло агонистическую активность в отношении клеток, экспрессирующих CD137 (см. *Protein Eng Des Sel*, 26(10), 2013, 589-598, doi:10.1093/protein).

Таблица 39.

Оценка Антитела	Антитело, для которого установлена активность в присутствии АТФ
A375-MY518/B167-LamLib	A375-P587/B167-LamLib
A356-MY518/B040-LamLib	A356-P587/B040-LamLib
A375-P587/B167-LamLib	A375-TT16/B167-LamLib
A356-P587/B040-LamLib	A356-TT16/B040-LamLib
A375-TT16/B167-LamLib	
A356-TT16/B040-LamLib	
A375-TT14/B167-LamLib	

(5-5-4) Оценка АТФ-зависимой агонистической активности в отношении CD137 вариабельных областей

АТФ-зависимая агонистическая активность в отношении CD137 каждой вариабельной области путем комбинирования константных областей тяжелой цепи P587 и P253 с различными вариабельными областями оценена *in vitro* с использованием моноцитов периферической крови человека, как описано в контрольных примерах 5-5-1 и 5-5-2.

Оцениваемые антитела представлены в табл. 40. Выработка антител, перечисленных в табл. 40, описана в контрольном примере 7-1. По сравнению с количествами IL-2 и IFN-γ в супернатанте культуры, когда отрицательное контрольное антитело (IC17HdK-P253/IC17L-k0, IC17HdK-P587/IC17L-k0) добавляют в присутствии 250 мкМ АТФ, и когда добавление антитела увеличивает количество IL-2 в культуральном супернатанте в 1,05 раза или более и количество IFN-γ в 1,15 раза или более, делают вывод, что антитело проявляет агонистическую активность в отношении CD137. Измерение агонистической активности с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК) может отличаться от донора к донору в зависимости от образца крови. В связи с этим определено, что антитела, которые не проявляют агонистической активности в отношении CD137 для некоторой или более половины МКПК человека, выделенного от нескольких доноров, можно расценивать как не проявляющие агонистической активности в отношении CD137, даже если они соответствуют стандартам агонистической деятельности по другой части МКПК человека. Антитела, которые согласно оценке проявляют агонистическую активность в отношении CD137 в присутствии 250 мкМ АТФ, представлены в табл. 40 (фиг. 32-36).

Кроме того, среди антител, которые согласно оценке проявляют агонистическую активность в отношении CD137 в присутствии 250 мкМ АТФ, антитела, кратность которых изменяется относительно группы, в которую добавлено отрицательное контрольное антитело (IC17HdK-P253/IC17L-k0, IC17HdK-P587/IC17L-k0) по отношению к количеству IL-2 и IFN-γ в супернатанте культуры в условиях отсутствия АТФ, меньше, чем кратное изменение по сравнению с отрицательным контролем в условиях в присутствии 250 мкМ АТФ, обладают пониженной агонистической активностью в отношении CD137 при отсутствии АТФ. Антитела, которые проявляют агонистическую активность в отношении CD137 в присутствии 250 мкМ АТФ и которые оценивают как имеющие агонистическую активность в отношении CD137 в отсутствие АТФ, представлены в табл. 40 (фиг. 32-36). Было установлено, что эти антитела проявляют АТФ-зависимую агонистическую активность в отношении CD137.

На основании вышеизложенного подтверждено, что для вариабельных областей комбинации вариабельная область тяжелой цепи/вариабельная область легкой цепи (A375/B167), (A356/B040), (A372/B040), (A486/B167) , (A488/B226), (A489/B223), (A551/B256), (A548/B256) и (A551/B379) проявляют агонистическую активность в отношении CD137 АТФ-зависимым образом.

Таблица 40.

Оценка Антитела	Антитело, для которого установлена активность в присутствии АТФ	Антитело, для которого установлена пониженная активность в отсутствие АТФ
A372-P253/B040-LamLib	A372-P253/B040-LamLib	A372-P253/B040-LamLib
A486-P253/B167-LamLib	A486-P253/B167-LamLib	A486-P253/B167-LamLib
A488-P253/B226-LamLib	A488-P253/B226-LamLib	A488-P253/B226-LamLib
A489-P253/B223-LamLib	A489-P253/B223-LamLib	A489-P253/B223-LamLib
A551-P587/B256-LamLib	A551-P587/B256-LamLib	A551-P587/B256-LamLib
A375-P587/B167-LamLib	A375-P587/B167-LamLib	A375-P587/B167-LamLib
A548-P587/B256-LamLib	A548-P587/B256-LamLib	A548-P587/B256-LamLib
A356-P587/B040-LamLib	A356-P587/B040-LamLib	A356-P587/B040-LamLib
A551-P587/B379-LamLib	A551-P587/B379-LamLib	A551-P587/B379-LamLib

(5-5-5) Оценка усиливающего воздействия на агонистическую активность в отношении CD137 комбинированных изменений, которые увеличивают pI константной области тяжелой цепи с константной областью тяжелой цепи с повышенной связывающей активностью с рецептором Fcγ

Влияние на агонистическую активность в отношении CD137 интродуцированных различных модификаций аминокислот, которые увеличивают pI константной области тяжелой цепи в константную область тяжелой цепи с различной повышенной FcγRIIb-связывающей активностью, оценивают путем оценки *in vitro* с использованием моноцитов периферической крови человека согласно описанному в примерах 5-5-1 и 5-5-2. Аминокислотные изменения, которые увеличивают pI, вводят в константные области тяжелой цепи TT16, MY518 и TT14 и, таким образом, в константные области тяжелой цепи TT16+P343R/D413K (SCF028), TT16+Q311R/P343R (SCF033), MY518+P343R/D413K (SCF025), MY518+Q311R/P343R (SCF030), TT14+P343R/D413K (SCF027) и TT14+Q311R/P343R (SCF032). Названия оцениваемых антител, в которые внесены аминокислотные изменения, увеличивающие pI, и названия соответствующих антител до введения аминокислотных изменений, которые увеличивают pI, показаны в табл. 21. Выработка антител, перечисленных в табл. 41 описана в контрольном примере 7-2.

Что касается оценки усиления агонистической активности путем интродукции модификаций аминокислот, повышающих pI, когда добавление антитела увеличивает количество IL-2 в 1,04 раза или более и количество IFN-γ в 1,1 раза или более в супернатанте культуры, относительно групп антител, содержащих константную область тяжелой цепи, которая не содержит этих аминокислотных модификаций, A375-TT16/B167-LamLib, A375-MY518/B167-LamLib и A375-TT14/B167-LamLib, установлено, что агонистическая активность в отношении CD137 усиливается. По сравнению с антителами, содержащими константную область тяжелой цепи без повышающих pI аминокислотных модификаций, антитела, содержащие константную область тяжелой цепи, в которой модификации аминокислот, как было показано, обладают повышенной агонистической активностью в отношении CD137 в присутствии 250 мкМ АТФ, показаны в табл. 22 (фиг. 31).

Это указывает на то, что независимо от степени увеличения FcγRIIb-связывающей активности константной области тяжелой цепи, введение модификаций, которые увеличивают pI константной области тяжелой цепи, усиливает агонистическую активность в отношении CD137 антитела против CD137 человека. Было высказано предположение, что: сочетание модификаций, которые увеличивают pI константной области тяжелой цепи, с модификациями, которые увеличивают связывание FcγRIIb константной области тяжелой цепи с константной областью тяжелой цепи, усиливает взаимодействие с отрицательно заряженной FcγRIIb-экспрессирующей поверхностью клетки; иммунные комплексы антител или связанных с антигеном антител ближе подходят к поверхности клеток, экспрессирующих FcγRIIb; это дополнительно увеличивает связывание с клетками, экспрессирующими FcγRIIb, которые представляют собой перекрестно-сшивающие каркасы, необходимые для того, чтобы антитела проявляли агонистическую активность в отношении клеток, экспрессирующих CD137; и, таким образом, агонистическая активность была дополнительно усилена.

Таблица 41.

Название оцениваемой константной области тяжелой цепи, в которую интродуцированы аминокислотные изменения, повышающие pI	Название соответствующей константной области тяжелой цепи перед интродукцией аминокислотных изменений, повышающих pI	Интродукция изменений pI
A375-SCF028/B167-LamLib	A375-TT16/B167-LamLib	P343R/D413K
A375-SCF033/B167-LamLib	A375-TT16/B167-LamLib	Q311R/P343R
A375-SCF025/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	P343R/D413K
A375-SCF030/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	Q311R/P343R
A375-SCF027/B167-LamLib	A375-TT14/B167-LamLib	P343R/D413K
A375-SCF032/B167-LamLib	A375-TT14/B167-LamLib	Q311R/P343R

Таблица 42.

Антитела, выявленные как обладающие повышенной агонистической активностью
A375-SCF028/B167-LamLib
A375-SCF033/B167-LamLib
A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib
A375-SCF027/B167-LamLib
A375-SCF032/B167-LamLib

<u>(5-5-6) Оценка воздействия на агонистическую активность путем внесения модификаций, которые увеличивают pI константной области тяжелой цепи</u>

Влияние на агонистическую активность в отношении CD137 введения различных модификаций аминокислот, которые увеличивают pI константных областей тяжелой цепи MY201aPh и MY518, оценивают *in vitro* с использованием моноцитов периферической крови человека согласно описанию в примерах 5-5-1 и 5-5-2. В константные области тяжелой цепи MY518, MY518a и MY201aPh введены аминокислотными модификациями, которые увеличивают pI; таким образом были созданы MY518+P343R/D413K (SCF025), MY518+Q311R/P343R(SCF030), MY518+P343R(SCF039), MY518+D413K (SCF040), MY518a+Q311R (SCF060a), MY201aPh+P343R(SCF041aPh), MY201aPh+P343R/D413K (SCF043aPh), MY201aPh+Q311R (SCF056aPh), MY201aPh+Q311R/P343Rb(SCF057aPh) и MY201aPh+Q311R/D413K (SCF059aPh). Названия рассматриваемых антител, в которые внесены аминокислотные изменения, которые увеличивают pI, и названия антител до внесения аминокислотных изменений, которые увеличивают соответствующую величину pI, показаны в таблице 43. Выработка антител, перечисленных в табл. 43, описана в примере 7-2.

Что касается оценки усиления агонистической активности путем введения модификаций аминокислот, повышающих pI, когда добавление антитела увеличивает количество IL-2 в 1,04 раза или более и количество IFN-γ в 1,1 раза или более в супернатанте культуры, относительно группы, в которую добавлены антитела, содержащие константную область тяжелой цепи, которая не содержит таких аминокислотных модификаций, A375-MY518a/B167-LamLib и A375-MY201aPh/B167-LamLib, было подтверждено, что агонистическая активность в отношении CD137 улучшена. По сравнению с антителами, содержащими константную область тяжелой цепи без повышающих pI аминокислотных модификаций, антитела, содержащие константную область тяжелой цепи, в которой аминокислотные изменения, как показано, обладают повышенной агонистической активностью в отношении CD137 в присутствии 250 мкМ АТФ, показаны в табл. 43 (фиг. 37 и 38).

Таблица 43.

Название оцениваемой константной области тяжелой цепи, в которую интродуцированы аминокислотные изменения, повышающие pI	Название соответствующей константной области тяжелой цепи перед интродукцией аминокислотных изменений, повышающих pI	Интродукция изменений pI
A375-SCF025/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	P343R/D413K
A375-SCF030/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	Q311R/P343R
A375-SCF039/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	P343R
A375-SCF040/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	D413K
A375-SCF060a/B167-LamLib	A375-MY518a/B167-LamLib	Q311R
A375-SCF041a/B167-LamLib	A375-MY201aPh/B167-LamLib	P343R
A375-SCF043a/B167-LamLib	A375-MY201aPh/B167-LamLib	P343R/D413K
A375-SCF056a/B167-LamLib	A375-MY201aPh/B167-LamLib	Q311R
A375-SCF057a/B167-LamLib	A375-MY201aPh/B167-LamLib	Q311R/P343R
A375-SCF059a/B167-LamLib	A375-MY201aPh/B167-LamLib	Q311R/P343R/D413K

Таблица 44.

Антитела, выявленные как обладающие повышенной агонистической активностью
A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib
A375-SCF039/B167-LamLib
A375-SCF040/B167-LamLib
A375-SCF060a/B167-LamLib
A375-SCF041aPh/B167-LamLib
A375-SCF043aPh/B167-LamLib
A375-SCF056aPh/B167-LamLib
A375-SCF057aPh/B167-LamLib
A375-SCF059aPh/B167-LamLib

(5-5-7) Оценка АТФ-зависимой агонистической активности в отношении CD137 антител против CD137 человека, которые объединяют разработанные вариабельные области и константные области

АТФ-зависимая агонистическая активность в отношении CD137 антител против CD137 человека, полученных комбинированием описанных выше вариабельных областей с константными областями тяжелой цепи, повышающими pI, оценивают *in vitro* с использованием моноцитов периферической крови человека согласно описанию в примерах 5-5-1 и 5-5-2. Исследованные антитела представлены в табл. 45.

По сравнению с количествами IL-2 и IFN-γ в супернатанте культуры при добавлении отрицательного контрольного антитела (IC17HdK-MY518a/IC17L-k0, IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0, IC17HdK-MY201/IC17L-k0, IC17HdK-G4d/IC17L-k0, IC17HdK-MY518/IC17L-k0, или IC17HdK-TT16/IC17L-k0) в присутствии 250 мкМ АТФ, когда добавление антитела увеличивает количество IL-2 в супернатанте культуры в 1,05 раза или более и количество IFN-γ в 1,15 раза или более, согласно оценке антитело демонстрирует агонистическую активность в отношении CD137. Измерение агонистической активности с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК) может отличаться от донора к донору по образцу крови. В связи с этим определено, что антитела, которые не проявляют агонистической активности в отношении CD137 некоторой или более половины МКПК человека, выделенного от нескольких доноров, можно расценивать как не проявляющие активности агониста CD137, даже если они соответствовали стандартам для агонистов для другой части

МКПК человека. Антитела, которые, как установлено, проявляют агонистическую активность в отношении CD137 в присутствии 250 мкМ АТФ, показаны в таблице 45 (фиг. 37-44).

Кроме того, среди антител, которые, как установлено, проявляют агонистическую активность в отношении CD137 в присутствии 250 мкМ АТФ, антитела, кратность изменения которых по сравнению с группой, в которую добавлено отрицательное контрольное антитело (IC17HdK-MY518a/IC17L-k0, IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0, IC17HdK-MY201/IC17L-k0, IC17HdK-G4d/IC17L-k0, IC17HdK-MY518/IC17L-k0, или IC17HdK-TT16/IC17L-k0), относительно количеств IL-2 и IFN-γ в супернатанте культуры при отсутствии АТФ меньше, чем кратное изменение относительно отрицательного контроля при наличии 250 мкМ АТФ, как установлено, проявляют пониженную агонистическую активность в отношении CD137 при отсутствии АТФ. Антитела, которые, как установлено, обладают пониженной агонистической активностью в отношении CD137 в отсутствие АТФ, показаны в табл. 45 (фиг. 37-44). Показано, что эти антитела проявляют АТФ-зависимую агонистическую активность в отношении CD137.

Таблица 45.

Исследуемое антитело	Антитело, активное при АТФ	Антитело с пониженной активностью без АТФ
A375-MY518/B167-LamLib	A375-SCF025/B167-LamLib	A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF025/B167-LamLib	A375-SCF030/B167-LamLib	A375-SCF030/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib	A375-SCF039/B167-LamLib	A375-SCF039/B167-LamLib
A375-SCF039/B167-LamLib	A375-SCF040/B167-LamLib	A375-SCF040/B167-LamLib
A375-SCF040/B167-LamLib	A375-MY518a/B167-LamLib	A375-MY518a/B167-LamLib
A375-MY518a/B167-LamLib	A375-SCF060a/B167-LamLib	A375-SCF060a/B167-LamLib
A375-SCF060a/B167-LamLib	A375-SCF041aPh/B167-LamLib	A375-SCF041aPh/B167-LamLib
A375-MY201aPh/B167-LamLib	A375-SCF043aPh/B167-LamLib	A375-SCF043aPh/B167-LamLib
A375-SCF041aPh/B167-LamLib	A375-SCF056aPh/B167-LamLib	A375-SCF056aPh/B167-LamLib
A375-SCF043aPh/B167-LamLib	A375-SCF057aPh/B167-LamLib	A375-SCF057aPh/B167-LamLib
A375-SCF056aPh/B167-LamLib	A375-SCF059aPh/B167-LamLib	A551-SCF041a/B256-LamLib
A375-SCF057aPh/B167-LamLib	A551-SCF041a/B256-LamLib	A551-SCF057a/B256-LamLib
A375-SCF059aPh/B167-LamLib	A551-SCF057a/B256-LamLib	A551-SCF059a/B256-LamLib
A551-SCF041a/B256-LamLib	A551-SCF059a/B256-LamLib	A551-SCF057aPh/B256-LamLib
A551-SCF056a/B256-LamLib	A551-SCF057aPh/B256-LamLib	A551-SCF025a/B256-LamLib
A551-SCF057a/B256-LamLib	A551-SCF059aPh/B256-LamLib	A551-SCF039a/B256-LamLib
A551-SCF059a/B256-LamLib	A551-SCF025a/B256-LamLib	A551-SCF043a/B256-LamLib
A551-SCF056aPh/B256-LamLib	A551-SCF039a/B256-LamLib	A551-SCF041aPh/B256-LamLib
A551-SCF057aPh/B256-LamLib	A551-MY201a/B256-LamLib	A551-SCF043aPh/B256-LamLib
A551-SCF059aPh/B256-LamLib	A551-SCF043a/B256-LamLib	A551-SCF039a/B379-LamLib
A551-MY518/B256-LamLib	A551-SCF041aPh/B256-LamLib	A551-SCF041a/B379-LamLib
A551-SCF025a/B256-LamLib	A551-SCF043aPh/B256-LamLib	A551-SCF043a/B379-LamLib
A551-SCF039a/B256-LamLib	A551-SCF039a/B379-LamLib	A551-SCF041aPh/B379-LamLib
A551-MY201a/B256-LamLib	A551-SCF041a/B379-LamLib	A551-SCF043aPh/B379-LamLib
A551-SCF043a/B256-LamLib	A551-SCF043a/B379-LamLib	A551-SCF060a/B379-LamLib
A551-MY201aPh/B256-LamLib	A551-SCF041aPh/B379-LamLib	A551-SCF057a/B379-LamLib
A551-SCF041aPh/B256-LamLib	A551-SCF043aPh/B379-LamLib	A551-SCF059a/B379-LamLib
A551-SCF043aPh/B256-LamLib	A551-SCF060a/B379-LamLib	A551-SCF056aPh/B379-LamLib
A551-MY518a/B379-LamLib	A551-SCF057a/B379-LamLib	A551-SCF057aPh/B379-LamLib
A551-SCF039a/B379-LamLib	A551-SCF059a/B379-LamLib	A551-SCF059aPh/B379-LamLib
A551-SCF041a/B379-LamLib	A551-SCF056aPh/B379-LamLib	A375-TT16/B167-LamLib
A551-SCF043a/B379-LamLib	A551-SCF057aPh/B379-LamLib	A356-TT16/B040-LamLib
A551-SCF041aPh/B379-LamLib	A551-SCF059aPh/B379-LamLib	A551-TT16/B379-LamLib
A551-SCF043aPh/B379-LamLib	A375-TT16/B167-LamLib	
A551-SCF060a/B379-LamLib	A356-TT16/B040-LamLib	
A551-SCF056a/B379-LamLib	A551-TT16/B379-LamLib	
A551-SCF057a/B379-LamLib		
A551-SCF059a/B379-LamLib		
A551-SCF056aPh/B379-LamLib		
A551-SCF057aPh/B379-LamLib		
A551-SCF059aPh/B379-LamLib		
A375-TT16/B167-LamLib		
A356-TT16/B040-LamLib		
A551-TT16/B379-LamLib		

Контрольный пример 6. Мыши с нокином CD137 человека в качестве теста для введения переключаемых антител против CD137 человека

(6-1) Разработка антител для исследования введения мышам с нокином CD137 человека

Переключаемые и непереключаемые антитела против CD137 человека, содержащие константную область мыши, разработаны для исследования введения мышам с нокином CD137 человека. В частности получают непереключаемые антитела против CD137 человека (20H4.9-mIgG1/20H4.9LC-mk0 аббревиатура: NS1-mIgG1, 20H4.9-MB110/20H4.9LC-mk0 аббревиатура: NS1-MB110, 20H4.9-MB492/20H4.9LC-mk0 аббревиатура: NS1-MB492, MOR-7480.1 H-MB110/MOR-7480.1 L-ml0r аббревиатура: NS2-MB110, MOR-7480.1 H-MB492/MOR-7480.1 L-ml0r аббревиатура: NS2-MB492) и переключаемые антитела против CD137 человека (A375-mIgG1/B167-ml0r, A372-mIgG1/B040-ml0r, A372-MB110/B040-ml0r, A372-MB492/B040-ml0r, A356-MB110/B040-ml0r, A486-MB492/B167-ml0r, A488-MB492/B226-ml0r, A489-MB492/B223-ml0r, A551-mIgG1/B256-ml0r, A551-MB110/B379-ml0r и A548-mIgG1/B256-ml0r).

Для тяжелых цепей антител NS1-mIgG1, NS1-MB110 и NS1-MB492 гены тяжелых цепей антитела разрабатывают комбинированием вариабельной области тяжелой цепи 20H4.9 (SEQ ID NO: 139) с любой из последовательностей:

(i) mIgG1, константной области тяжелой цепи IgG1 мыши (SEQ ID NO: 144),

(ii) MB110, описанной в WO2014030750 (SEQ ID NO: 145), и

(iii) MB492, описанной в WO2014030750 (SEQ ID NO: 146),

как константной областью тяжелой цепи. То есть были разработаны гены 20H4.9-mIgG1, 20H4.9-MB110 и 20H4.9-MB492.

Для легких цепей антител NS1-mIgG1, NS1-MB110 и NS1-MB492 разрабатывают ген легкой цепи антитела 20H4.9LC-mk0 путем комбинирования вариабельной области легкой цепи 20H4.9LC (SEQ ID NO: 140) с цепью κ мыши mk0 (SEQ ID NO: 147) в качестве константной области легкой цепи. Комбинируя эти гены тяжелой цепи и легкой цепи, каждое антитело получают экспрессией и очищают методами, известными специалистам в данной области.

Для тяжелых цепей антител NS2-MB110 и NS2-MB492 гены тяжелых цепей антитела были созданы путем объединения вариабельной области тяжелой цепи MOR-7480.1 H (SEQ ID NO: 142) с одной из последовательностей:

(i) MB110 (SEQ ID NO: 145), или

(ii) MB492 (SEQ ID NO: 146),

в качестве константной области тяжелой цепи. То есть созданы гены MOR-7480.1H-MB110 и MOR-7480.1H-MB492.

Для легких цепей антител NS2-MB110 и NS2-MB492 ген легкой цепи антитела MOR-7480.1L-ml0r получают путем объединения вариабельной области легкой цепи MOR-7480.1L (SEQ ID NO: 143) с цепью λ мыши ml0r (SEQ ID NO: 148) в качестве константной области легкой цепи. Комбинируя указанные гены тяжелой цепи и легкой цепи, каждое антитело экспрессируют и очищают методами, известными специалистам в данной области.

Для анти-CD137 переключаемых антител получают гены тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, указанные в табл. 46 и 47; каждое антитело экспрессируют и очищают путем объединения этих генов методами, известными специалистам в данной области.

Таблица 26. Тяжелые цепи анти-CD137 переключаемых антител, имеющих константную область мыши

Тяжелая цепь полной длины	A375-mIgG1	Вариабельная область	A375 (SEQ ID NO: 43)
		Константная область	mIgG1 (SEQ ID NO: 144)
Тяжелая цепь полной длины	A372-mIgG1	Вариабельная область	A372 (SEQ ID NO: 44)
		Константная область	mIgG1 (SEQ ID NO: 144)
Тяжелая цепь полной длины	A372-MB110	Вариабельная область	A372 (SEQ ID NO: 44)
		Константная область	MB110 (SEQ ID NO: 145)
Тяжелая цепь полной длины	A372-MB492	Вариабельная область	A372 (SEQ ID NO: 44)
		Константная область	MB492 (SEQ ID NO: 146)
Тяжелая цепь полной длины	A356-MB110	Вариабельная область	A356 (SEQ ID NO: 45)
		Константная область	MB110 (SEQ ID NO: 145)
Тяжелая цепь полной длины	A486-MB492	Вариабельная область	A486 (SEQ ID NO: 46)
		Константная область	MB492 (SEQ ID NO: 146)
Тяжелая цепь полной длины	A488-MB492	Вариабельная область	A488 (SEQ ID NO: 48)
		Константная область	MB492 (SEQ ID NO: 146)
Тяжелая цепь полной длины	A489-MB492	Вариабельная область	A489 (SEQ ID NO: 49)
		Константная область	MB492 (SEQ ID NO: 146)
Тяжелая цепь полной длины	A548-mIgG1	Вариабельная область	A548 (SEQ ID NO: 50)
		Константная область	mIgG1 (SEQ ID NO: 144)
Тяжелая цепь полной длины	A551-mIgG1	Вариабельная область	A551 (SEQ ID NO: 51)
		Константная область	mIgG1 (SEQ ID NO: 144)
Тяжелая цепь полной длины	A551-MB110	Вариабельная область	A551 (SEQ ID NO: 51)
		Константная область	MB110 (SEQ ID NO: 145)

Таблица 47. Легкие цепи анти-CD137 переключаемых антител, имеющих константную область мыши

Легкая цепь полной длины	B040-ml0r	Вариабельная область	B040 (SEQ ID NO: 55)
		Константная область	ml0r (SEQ ID NO: 148)
Легкая цепь полной длины	B167-ml0r	Вариабельная область	B167 (SEQ ID NO: 54)
		Константная область	ml0r (SEQ ID NO: 148)
Легкая цепь полной длины	B226-ml0r	Вариабельная область	B226 (SEQ ID NO: 56)
		Константная область	ml0r (SEQ ID NO: 148)
Легкая цепь полной длины	B223-ml0r	Вариабельная область	B223 (SEQ ID NO: 57)
		Константная область	ml0r (SEQ ID NO: 148)
Легкая цепь полной длины	B256-ml0r	Вариабельная область	B256 (SEQ ID NO: 59)
		Константная область	ml0r (SEQ ID NO: 148)
Легкая цепь полной длины	B379-ml0r	Вариабельная область	B379 (SEQ ID NO: 60)
		Константная область	ml0r (SEQ ID NO: 148)

(6-2) Оценка связывающей активности антител против CD137 человека, приготовленных для исследования введения мышам с нокином CD137 человека

Оценивают связывающую активность непереключаемого антитела против CD137 человека и переключаемого антитела против CD137, полученного в примере 6-1, по отношению к CD137 человека. Измерения связывания CD137 человека проводят при 37°C с использованием 20 мМ ACES (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 2 мМ $MgCl_2$ и 0,05% Tween20 в качестве подвижного буфера. Сначала антитела улавливают с помощью взаимодействующих растворов антител, приготовленных в подвижном буфере с иммобилизованным антителом кролика против IgG мыши (фирма Thermo Scientific) на сенсорном чипе Series S Sensor Chip CM5 (фирма GE Healthcare). Затем оценивают связывающую активность в отношении CD137 человека в присутствии АТФ и в отсутствие АТФ путем взаимодействия с раствором CD137 человека в подвижном буфере без АТФ. Для антигена CD137 человека используют hCD137 (расщепленный FXa), полученный в контрольном примере (1-2), и измерения проводят при концентрации антигена 0, 15,625, 62,5, 250 и 1000 нМ. Чип регенерируют, используя 25 мМ NaOH и 10 мМ глицин-HCl (pH 1,5), измерения проводят путем многократного захвата антител. Константу диссоциации (KD) соответствующих антител в отношении CD137 человека рассчитывают с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software 2.0. В частности, константу скорости ассоциации ka (л/моль/с) и константу скорости диссоциации kd (1/сек) рассчитывают путем глобальной подгонки сенсограмм, полученных путем измерения с помощью модели связывания Ленгмюра 1:1, и константы диссоциации KD (моль/л) рассчитывают по этим значениям.

Таблица 48. Анализ связывания CD137 человека анти-CD137 антителами, имеющими константную область мыши

Антитело	K_D (M) для CD137 человека			
	Без АТФ	АТФ=1 мкМ	АТФ=10 мкМ	АТФ=100 мкМ
NS1-mIgG1	6,17E-08	5,62E-08	5,44E-08	5,36E-08
NS1-MB110	6,10E-08	5,65E-08	5,39E-08	5,19E-08
NS1-MB492	6,16E-08	5,49E-08	5,35E-08	5,04E-08
NS2-MB110	1,88E-07	1,44E-07	1,02E-07	1,04E-07
NS2-MB492	2,16E-07	1,70E-07	1,12E-07	1,12E-07
A375-mIgG1/ B167-ml0r	НД	3,43E-07	1,14E-07	2,92E-08
A372-mIgG1/ B040-ml0r	НД	4,78E-07	2,59E-07	1,08E-07
A372-MB110/ B040-ml0r	НД	6,11E-07	2,64E-07	1,12E-07
A372-MB492/ B040-ml0r	НД	7,82E-07	2,51E-07	1,04E-07
A356-MB110/ B040-ml0r	НД	1,01E-06	4,10E-07	1,68E-07
A486-MB492/ B167-ml0r	НД	1,31E-07	2,70E-08	7,67E-09
A488-MB492/ B226-ml0r	НД	НО	1,36E-07	8,25E-08
A489-MB492/ B223-ml0r	НД	1,62E-06	3,58E-07	1,54E-07
A551-mIgG1/ B256-ml0r	НД	7,55E-07	2,31E-07	6,22E-08
A551-MB110/ B379-ml0r	НД	5,12E-07	1,43E-07	3,51E-08
A548-mIgG1/ B256-ml0r	НД	8,61E-07	2,19E-07	5,58E-08

НД (нет данных) – активность слишком мала, чтобы определить величину KD.

НО – не определяли.

Было подтверждено, что как непереключаемое антитело против CD137 человека, так и полученное выше переключаемое антитело против CD137 человека, которые содержат константную область мыши, связываются с CD137 человека. Также было показано, что все переключаемые антитела против CD137 человека связываются с CD137 человека зависимым от концентрации АТФ образом. С другой стороны, для непереключаемых антител не наблюдают такого зависимого от концентрации АТФ связывания с CD137 человека, причем связывание было почти равным при любой концентрации АТФ.

(6-3) Оценка кинетики модифицированных антител в плазме мышей с нокином CD137 человека

(6-3-1) Получение мышей с нокином CD137 человека

Путем интродукции вектора для замены гена CD137 человека в эмбриональные стволовые клетки мыши (ES-клетки) получают мышь с нокином CD137 человека, у которой ген CD137 мыши заменен геном CD137 человека. Такую мышь обозначают «hCD137 KI».

(6-3-2) Измерение концентрации антитела против CD137 человека в плазме модели мыши hCD137KI

После создания мыши hCD137KI в примере 6-3-1, соответствующие антитела вводят внутривенно в виде однократной дозы мыши hCD137KI, как показано в табл. 49. В табл. 49 антитела NS1-mIgG1, NS1-MB110 и NS1-MB492 все являются непереключаемыми антителами, а другие - переключаемыми антителами. Кровь собирают несколько раз, начиная с 5 мин до 28 дней после введения. Полученную кровь центрифугируют для отделения плазмы. Плазму хранят в морозильной камере при температуре ниже -20°C до проведения измерения.

Таблица 49. Детали групп для получения кинетической оценки в плазме.

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза (мг/кг)
1	3	NS1-mIgG1	7,5, однократное введение
2	3	NS1-MB110	7,5, однократное введение
3	3	NS1-MB492	7,5, однократное введение
4	3	A375-mIgG1/B167-ml0r	7,5, однократное введение
5	3	A356-MB110/B040-ml0r	7,5, однократное введение
6	3	A372-mIgG1/B040-ml0r	7,5, однократное введение
7	3	A372-MB110/B040-ml0r	7,5, однократное введение
8	3	A372-MB492/B040-ml0r	7,5, однократное введение
9	3	A486-MB492/B167-ml0r	7,5, однократное введение
10	3	A488-MB492/B226-ml0r	7,5, однократное введение
11	3	A489-MB492/B223-ml0r	7,5, однократное введение
12	3	A548-mIgG1/B256-ml0r	7,5, однократное введение
13	3	A551-mIgG1/B256-ml0r	7,5, однократное введение
14	3	A551-MB110/B379-ml0r	7,5, однократное введение

Концентрацию каждого переключаемого антитела в плазме измеряют методом электрохемилюминесценции (ECL, electrochemiluminescence). В частности, hCD137 (фирма Sino Biological Inc.) разводят в ФСБ (-) и вносят в MULTI-ARRAY 96-луночный планшет (фирма Meso Scale Diagnostics, LLC). В планшет добавляют hCD137 и встряхивают при комнатной температуре в течение 1 ч, hCD137 иммобилизуют в планшете. Затем для блокирования добавляют раствор ФСБ, содержащий 1% БСА и 0,05% Tween 20, и встряхивают при комнатной температуре в течение 1 ч. Калибровочные кривые для индивидуальных переключаемых антител построены при концентрациях в плазме 64, 32, 16, 8, 4, 2 и 1 нг/мл. После добавления раствора ФСБ, содержащего 3 мМ АДФ, 1% БСА и 0,05% Tween 20, в планшет с иммобилизованным hCD137, двукратный объем образцов плазмы разбавляют в растворе ФСБ, содержащем 1% БСА и 0,05% Tween20, а также образцы калибровочной кривой. После встряхивания планшета при комнатной температуре в течение 1 ч добавляют биотинилированное антитело против IgG мыши (фирма Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). Кроме того, после встряхивания планшета при комнатной температуре в течение 1 ч добавляют меченый стрептавидином SULFO-TAG (фирма Meso Scale Diagnostics, LLCs). Кроме того, после встряхивания планшета при комнатной температуре в течение 1 ч добавляют буфер Read buffer T (фирма Meso Scale Diagnostics, LLCs), разведенный в два раза раствором ФСБ, содержащим 2 мМ АДФ, 1% БСА и 0,05% Tween 20. Измерение концентраций антител в плазме мышей hCD137KI проводят путем обнаружения с использованием SULFO-TAG на SECTOR Imager (фирма Meso Scale Diagnostics, LLC). Расчет индивидуальных концентраций антител в плазме мыши производят с помощью программы SOFTmax PRO (фирма Molecular Devices).

Концентрацию непереключаемых антител в плазме измеряют методом электрохемилюминесценции (ECL). В частности, hCD137 (фирма Sino Biological Inc.) разводят в ФСБ (-) и добавляют в 96-луночный планшет MULTI-ARRAY (фирма Meso Scale Diagnostics, LLC). В планшет добавляют hCD137 и встряхивают при комнатной температуре в течение одного часа для иммобилизации hCD137 в планшете. Затем для блокирования добавляют раствор ФСБ, содержащий 1% БСА и 0,05% Tween 20, встряхивают при комнатной температуре в течение одного часа. Калибровочные кривые для индивидуальных непереключаемых антител построены при концентрациях в плазме 32, 16, 8, 4, 2, 1 и 0,5 нг/мл. Образцы плазмы, разведенные в растворе ФСБ, содержащем 1% БСА, 0,05% Tween 20, а также образцы калибровочной кривой, добавляют в планшет с иммобилизованным hCD137. После встряхивания планшета при комнатной температуре в течение одного часа добавляют биотинилированное антитело против IgG мыши (фирма Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). Кроме того, после встряхивания планшета при комнатной температуре в течение одного часа добавляют SULFO-TAG Labeled Streptavidin (фирма Meso Scale Diagnostics, LLC). Добавляют буфер для считывания T (фирма Meso Scale Diagnostics, LLCs), разведенный в два раза. Измерение концентраций антител в плазме мышей hCD137KI выполняют аналогично описанному выше для переключаемых антител.

Результаты показаны на фиг. 45, 46 и 47.

На фиг. 45 показана динамика средних концентраций в плазме мыши hCD137 KI антител, имеющих mIgG1 в качестве Fc (NS1-mIgG1 в качестве непереключаемого антитела и A375-mIgG1/B167-ml0r, A372-mIgG1/B040-ml0r, A548-mIgG1/B256-ml0r или A551-mIgG1/B256-ml0r в качестве переключаемых антител) среди антител, показанных в табл. 49. На фиг. 46 показана динамика средних концентраций в плазме мыши hCD137 KI антител, имеющих MB110 в качестве Fc (NS1-MB110 в качестве не переключаемого антитела и A356-MB110/B040-ml0r, A372-MB110/B040-ml0r, и A551-MB110/B379-ml0r в качестве переключаемых антител). На фиг. 47 показана динамика средних концентраций в плазме мыши CD137 KI антител, имеющих MB492 в качестве Fc (NS1-MB492 в качестве непереключаемого антитела и A372-MB492/B040-ml0r, A486-MB492/B167-ml0r, A488-MB492/B226-ml0r или A489-MB492/B223-ml0r в качестве переключаемого антитела). На фиг. 47, что касается A488-MB492/B226-ml0r, резкое снижение во времени концентрации в плазме, предположительно вызванное ADA, подтверждено у одного субъекта, а среднее значение взято по данным двух субъектов.

У мыши hCD137 KI с любой Fc-областью переключающее антитело демонстрирует более медленное выведение из плазмы, чем непереключаемое антитело. Предполагают, что это связано с тем, что по сравнению с переключаемым антителом непереключаемое антитело связывается с CD137, экспрессируемым в организме, и быстрее элиминирует в плазме. Кроме того, высказывают предположение, что концентрация внеклеточного АТФ в нормальной ткани до такой степени низкая, что переключаемые антитела, используемые в этом исследовании, не связывались с CD137 человека. Эти результаты позволяют предположить, что связывание с антигеном, экспрессируемым системно, можно уменьшить с помощью переключаемых антител, и, таким образом, можно получить антитело с улучшенной кинетикой крови.

(6-4) Перемещение маркеров эффективности лекарственного средства и системного ответа анти-CD137-антител на модели сингенной трансплантации опухолевых клеток с использованием мыши hCD137KI

(6-4-1) Получение клеточных линий, мышиной модели сингенной трансплантации опухоли, а также метод оценки противоопухолевого эффекта и системного ответа

Клетки линии клеток колоректального рака MC38 мыши, лицензированной Национальным институтом рака, и мышей hCD137 KI, описанных в примере 6-3-1, используют для различных исследований. Модель формируется при достижении объема опухоли приблизительно 50-300 мм^3 после подкожной имплантации линии клеток MC38 в брюшную полость мышей. После создания модели мышей с трансплантированной клеточной линией MC38 животных группируют, а затем вводят различные анти-CD137 антитела.

Для оценки противоопухолевого эффекта измерение объема опухоли проводят 1-2 раза в неделю. Объем опухоли рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли (мм^3) = длина (мм) × ширина (мм) × ширина (мм)/2

Путем удаления печени и селезенки или лимфатических узлов в соответствующее время после введения антитела системные ответы оценивают по массе органа, по количеству клеток во фракциях лимфоцитов или по анализу Т-клеток с использованием жидкостной цитометрии (FCM). При оценке этих показателей установлено, что переключаемое антитело субъекта подавляет системные ответы и/или активацию Т-клеток в неопухолевых тканях (например, лимфатических узлах, селезенке и печени), когда показатель системного ответа был низким по сравнению с таким же количество непереключаемого антитела (контрольное антитело против CD137 человека без АТФ-зависимой связывающей активности в отношении CD137 человека).

Антитела, полученные в контрольном примере 6-1 (вырабатывание антител для теста по введению мышам с нокином CD137 человека), используют в различных тестах.

(6-4-2) Получение различных органов от мыши с пересаженной клеточной линией MC38 и подготовка фракций лимфоцитов

Проводят измерение массы собранных селезенок и лимфатических узлов, а также подсчет клеток фракций лимфоцитов. Фракции лимфоцитов, полученные с использованием набора для диссоциации печени, мыши (фирма Milteny Biotec), также используют для оценки активации печени. Фракции лимфоцитов после лизиса эритроцитов используют для оценки активации в селезенке, а фракции лимфоцитов, полученные путем измельчения, используют для оценки активации в лимфатических узлах.

(6-4-3) Анализ FCM с использованием фракций лимфоцитов из различных органов

Для оценки активации маркеров методом FCM применяют экспрессию гранзима B или экспрессию ICOS на CD8α-положительных T-клетках или процент CD8α-положительных T-клеток среди CD45-положительных клеток. По этой причине в анализе FCM используют флуоресцентно меченые антитела против гранзима B, PD-1, ICOS, CD8α и CD45. Измерения проводят с помощью BD LSRFortessa™ X-20 (фирма BD Biosciences).

(6-4-4) Исследования лекарственной эффективности (противоопухолевого эффекта) антитела A375-mIgG1/B167-ml0r

После формирования у мышей опухоли в результате трансплантации раковых клеток MC38 в контрольном примере 6-4-1, вводят разбавитель и A375-mIgG1/B167-ml0r в дозах, показанных в табл. 50. Введение антител проводят дважды через хвостовую вену в день формирования групп и через четыре дня после этого. В качестве разбавителя применяют ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20.

Таблица 50. Подробная информация по группам исследования эффективности A375-mIgG1/B167-ml0r.

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза (мг/кг)	День введения
1	5	Разбавитель	-	В день формирования группы и на четвертый день после формирования группы
2	5	A375-mIgG1/ B167-ml0r	22,5	В день формирования группы и на четвертый день после формирования группы

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза (мг/кг)	День введения
3	5	A375-mIgG1/ B167-ml0r	7,5	В день формирования группы и на четвертый день после формирования группы
4	5	A375-mIgG1/ B167-ml0r	2,5	В день формирования группы и на четвертый день после формирования группы
5	5	A375-mIgG1/ B167-ml0r	0,83	В день формирования группы и на четвертый день после формирования группы
6	5	A375-mIgG1/ B167-ml0r	0,28	В день формирования группы и на четвертый день после формирования группы

Противоопухолевый эффект в каждой группе оценивают по объему опухоли, рассчитанному согласно описанию в контрольном примере 6-4-1. В результате подтверждают доза-зависимый противоопухолевый эффект антитела A375-mIgG1/B167-ml0r (фиг. 48).

(6-4-5) Введение антител и отбор образцов, а также анализ FCM для оценки системных эффектов A375-mIgG1/B167-ml0r

После создания мышиной модели после трансплантации MC38 в контрольном примере 6-4-1, вводят разбавитель, NS1-mIgG1 (непереключаемое антитело) и A375-mIgG1/B167-ml0r, как показано в табл. 51. Введение антител вводят дважды в хвостовую вену в день формирования групп и через три дня после формирования групп. В качестве растворителя применяют ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20.

Через пять дней после первоначального введения собирают печень, лимфатические узлы и селезенку, как показано в контрольном примере 6-4-2 (сбор различных органов от мыши с трансплантированной линией клеток MC38 и получение фракций лимфоцитов). Кроме того, для селезенки и лимфатических узлов органы трех мышей объединяют и проводят анализ FCM, как показано в контрольном примере 6-4-3 (анализ FCM с использованием фракций лимфоцитов из различных органов).

Таблица 51. Подробная информация по группам для оценки системных ответов с антителом A375-mIgG1/B167-ml0r.

Группа	Число животных	Фармацевти-ческий агент	Доза (мг/кг)	День введения	День взятия пробы
1	3	Разбавитель	-	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через пять дней после формирования группы
2	3	NS1-mIgG1	0,06	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через пять дней после формирования группы
3	3	NS1-mIgG1	0,3	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через пять дней после формирования группы
4	3	NS1-mIgG1	1,5	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через пять дней после формирования группы
5	3	NS1-mIgG1	7,5	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через пять дней после формирования группы
6	3	NS1-mIgG1	37,5	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через пять дней после формирования группы
7	3	A375-mIgG1/ B167-ml0r	1,5	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через пять дней после формирования группы
8	3	A375-mIgG1/ B167-ml0r	7,5	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через пять дней после формирования группы
9	3	A375-mIgG1/ B167-ml0r	37,5	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через пять дней после формирования группы

Оценивают системные эффекты от введения антител. В результате оценки массы органов лимфатических узлов и селезенок установлено увеличение массы этих органов при введении NS1-mIgG1 в дозе 0,3 мг/кг и более выраженная гипертрофия органов при 1,5 мг/кг. кг и 7,5 мг/кг. С другой стороны, увеличения органа не наблюдают при введении A375-mIgG1/B167-ml0r ни при одной из доз 1,5 мг/кг, 7,5 мг/кг или 37,5 мг/кг (фиг. 49).

Кроме того, в результате оценки активации Т-клеток с помощью оценки FCM наблюдают повышение экспрессии всех маркеров PD-1, ICOS и гранзима B при 0,3 мг/кг после введения NS1-mIgG1. С другой стороны, при введении A375-mIgG1/B167-ml0r наблюдают заметное ингибирование экспрессии всех маркеров PD-1, ICOS и гранзима B в дозах 1,5 мг/кг, 7,5 мг/кг и 37,5 мг/кг (фиг. 50 и фиг. 51). Поскольку результаты по A375-mIgG1/B167-ml0r показали, что масса органа коррелирует с маркерами активации Т-клеток в лимфатических узлах и селезенке, массу органа используют в основном в качестве индикатора активации иммунных клеток в лимфатических узлах и селезенке при последующей оценке антител.

В результате оценки активации Т-клеток в печени наблюдают увеличение экспрессии PD-1 и гранзима B при введении NS1-mIgG1 в дозе 0,3 мг/кг. С другой стороны, при введении A375-mIgG1/B167-ml0r, экспрессии подавлялись при всех дозах 1,5 мг/кг, 7,5 мг/кг и 37,5 мг/кг (фиг. 52).

Таким образом, переключающее антитело ингибирует активацию Т-клеток в лимфатических узлах, селезенке и печени по сравнению с таким же количеством непереключаемого антитела.

<u>(6-4-6) Исследование лекарственной эффективности (противоопухолевого эффекта) антитела A356-MB110/B040-ml0r</u>

После формирования мышиной модели после трансплантации MC38 в контрольном примере 6-4-1 разбавитель и A356-MB110/B040-ml0r вводят в дозах, показанных в табл. 52. Введение антитела проводят дважды в хвостовую вену в день формирования группы и через три дня после формирования группы. В качестве разбавителя применяют ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20.

Таблица 52. Подробная информация о группах исследования эффективности A356-MB110/B040-ml0r.

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза (мг/кг)	День введения
1	5	Растворитель	-	В день формирования группы и на третий день после формирования группы
2	5	A356-MB110/B040-ml0r	7,5	В день формирования группы и на третий день после формирования группы
3	5	A356-MB110/B040-ml0r	2,5	В день формирования группы и на третий день после формирования группы

Противоопухолевый эффект в каждой группе оценивают по объему опухоли по расчетам, описанным в контрольном примере 6-4-1. Результаты подтверждают дозозависимый противоопухолевый эффект A356-MB110/B040-ml0r (фиг. 53).

<u>(6-4-7) Введение антител и отбор образцов, а также FCM-анализ для оценки системных эффектов A356-MB110/B040-ml0r</u>

После создания модели мышей с трансплантацией MC38 в контрольном примере 6-4-1 вводят разбавитель, NS2-MB110 (непереключаемое антитело) и A356-MB110/B040-ml0r, как показано в табл. 53. Введение антител проводят дважды в хвостовую вену в день формирования групп и через три дня после формирования групп. В качестве разбавителя применяют ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20.

Через семь дней после первого введения печень, лимфатические узлы и селезенку собирали, как показано в контрольном примере 6-4-2 (сбор различных органов у мышей, трансплантированных клеточной линией MC38, и подготовка фракций лимфоцитов). Для селезенки и лимфатических узлов проводят только измерение массы органов.

Таблица 53. Подробная информация по группам для оценки системных ответов на антитело A356-MB110/B040-ml0r.

Группа	Число живот-ных	Фармацев-тический агент	Доза (мг/кг)	День введения	День взятия пробы
1	3	Разбавитель	-	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через семь дней после формирования группы
2	3	NS2-MB110	7,5	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через семь дней после формирования группы
3	3	NS2-MB110	2,5	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через семь дней после формирования группы
4	3	NS2-MB110	0,3	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через семь дней после формирования группы
5	3	A356-MB110/B040-ml0r	7,5	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через семь дней после формирования группы
6	3	A356-MB110/B040-ml0r	2,5	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через семь дней после формирования группы

Оценивают системные эффекты от введенных антител. Результат оценки массы органов лимфатических узлов и селезенки при введении NS2-MB110 и

A356-MB110/B040-ml0r показывает, что гипертрофия наблюдают также при введении NS2-MB110 в дозе 2,5 мг/кг. С другой стороны, на момент введения A356-MB110/B040-мл0r лимфаденопатия подавляется даже при 7,5 мг/кг, а спленомегалия подавляется при 2,5 мг/кг (фиг. 54).

Кроме того, результат оценки активации T-клеток в печени показывает, что увеличение экспрессии PD-1 в CD8α-положительных клетках также наблюдают при введении NS2-MB110 в дозе 0,3 мг/кг. Между тем, когда вводят A356-MB110/B040-ml0r, экспрессия PD-1 подавляется при дозе 7,5 мг/кг и существенно подавляется при 2,5 мг/кг. Небольшое увеличение экспрессии ICOS в CD8α-положительных клетках также наблюдают при введении антитела NS2-MB110 в дозе 0,3 мг/кг. С другой стороны, наблюдают, что экспрессия разбавителя подавляется при 2,5 мг/кг при введении A356-MB110/B040-ml0r (фиг. 55).

Таким образом, переключаемое антитело ингибирует активацию T-клеток в лимфатических узлах, селезенке и печени по сравнению с непереключаемым антителом.

<u>(6-4-8) Исследование лекарственной эффективности (противоопухолевого эффекта) антитела A372-mIgG1/B040-ml0r</u>

После создания модели мышей с трансплантацией MC38 в контрольном примере 6-4-1 вводят разбавитель и A372-mIgG1/B040-ml0r в дозах, показанных в табл. 54. Введение антитела проводят четыре раза в хвостовую вену в день формирования группы и через 4 дня, 7 дней и 10 дней после формирования группы. В качестве разбавителя применяют ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20.

Таблица 54. Подробная информация по группам исследования эффективности A372-mIgG1/B040-ml0r.

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза (мг/кг)	День введения
1	5	Растворитель	-	В день формирования группы и на четвертый, седьмой и десятый день после формирования группы
2	5	A372-mIgG1/ B040-ml0r	7,5	В день формирования группы и на четвертый, седьмой и десятый день после формирования группы

Противоопухолевый эффект в каждой группе оценивают по объему опухоли по расчетам, описанным в контрольном примере 6-4-1. Результаты подтверждают противоопухолевый эффект от введения антитела A372-mIgG1/B040-ml0r (фиг. 56).

(6-4-9) Введение антител и отбор образцов, а также анализ FCM для оценки системных эффектов A372-mIgG1/B040-ml0r

После создания модели мышей с трансплантацией MC38 в конорольном примере 6-4-1 вводят разбавитель и A372-mIgG1/B040-ml0r, как показано в табл. 55. Введение антитела проводят три раза в хвостовую вену в день формирования группы и через 3 дня и 6 дней после формирования группы. В качестве разбавителя применяют ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20.

Через семь дней после первого введения печень, лимфатические узлы и селезенку собирают, как показано в контрольном примере 6-4-2 (сбор различных органов у мышей, трансплантированных клеточной линией MC38, и подготовка фракций лимфоцитов). Для селезенки проводят только измерение массы органов; для лимфатических узлов проводят только подсчет клеток фракций лимфоцитов, полученных из лимфоцитов, объединенных от трех мышей.

Таблица 55. Подробная информация по группам исследования системных ответов при использовании антитела A372-mIgG1/B040-ml0r.

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза (мг/кг)	День введения	День взятия пробы
1	3	Разбавитель	-	В день формирования группы и на третий и шестой день после формирования группы	Через семь дней после формирования группы
2	3	A372-mIgG1/B040-ml0r	7,5	В день формирования группы и на третий и шестой день после формирования группы	Через семь дней после формирования группы

Оценивают системные эффекты от введения антител. В результате измерения количества клеток в лимфатических узлах и массы селезенок было подтверждено, что нет увеличения количества клеток в лимфатических узлах и увеличения массы селезенки при введении A372-mIgG1/B040-ml0r, и что масса этого органа эквивалентна массе в группе введения разбавителя (фиг. 57).

В результате оценки активации T-клеток в печени показано, что уровни экспрессии гранзима B подобны аналогичным уровням в группе введения разбавителя когда вводили A372-mIgG1/B040-ml0r (фиг. 58).

Таким образом, подтверждено, что переключаемое антитело ингибирует активацию Т-клеток в лимфатических узлах, селезенке и печени.

(6-4-10) Исследование лекарственной эффективности (противоопухолевого эффекта) антитела A372-MB110/B040-ml0r

После создания модели мышей с трансплантацией рака MC38 в контрольном примере 6-4-1 разбавитель и A372-MB110/B040-ml0r вводят в дозах, представленных в табл. 56. Введение антител осуществляют дважды в хвостовую вену в день формирования группы и через четыре дня после этого. В качестве растворителя используют ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20.

Таблица 56. Подробная информация по группам по исследованию эффективности A372-mIgG1/B040-ml0r.

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза (мг/кг)	День введения
1	5	Растворитель	-	В день формирования группы и на третий день после формирования группы
2	5	A372-MB110/ B040-ml0r	7,5	В день формирования группы и на третий день после формирования группы

Противоопухолевый эффект в каждой группе оценивают по объему опухоли по расчетам, описанным в контрольном примере 6-4-1. Результаты подтверждают противоопухолевый эффект A372-mIgG1/B040-ml0r (фиг. 59).

(6-4-11) Введение антител и отбор образцов, а также анализ FCM для оценки системных эффектов A372-MB110/B040-ml0r

После создания модели мышей с трансплантацией рака MC38 в контрольном примере 6-4-1 разбавитель, NS2-MB110 (непереключаемое антитело) и A372-MB110/B040-ml0r вводят в дозах, представленных в табл. 57. Введение антител осуществляют дважды в хвостовую вену, а именно в день формирования группы и через три дня после этого. В качестве разбавителя используют ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20.

Через семь дней после первоначального введения собирают печень, лимфатические узлы и селезенку, как показано в контрольном примере 6-4-2 (сбор различных органов у мышей, трансплантированных клеточной линией MC38, и получение фракций лимфоцитов). Для селезенки и лимфатических узлов проводят только измерение массы органов.

Таблица 57. Подробная информация в группах по оценке системных ответов с антителом A372-MB110/B040-ml0r.

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза (мг/кг)	День введения	День взятия пробы
1	3	Разбавитель	-	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через семь дней после формирования группы
2	3	NS2-MB110	7,5	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через семь дней после формирования группы
3	3	NS2-MB110	2,5	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через семь дней после формирования группы
4	3	NS2-MB110	0,3	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через семь дней после формирования группы
5	3	A372-MB110/B040-ml0r	7,5	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через семь дней после формирования группы
6	3	A372-MB110/B040-ml0r	2,5	В день формирования группы и на третий день после формирования группы	Через семь дней после формирования группы

Оценивают системные эффекты от введения антител. В результате измерения массы лимфатических узлов и селезенок подтверждено, что масса этих органов увеличивается при введении NS2-MB110 в дозах 2,5 мг/кг и 7,5 мг/кг. С другой стороны наблюдают ингибирование органомегалии при обеих дозах 2,5 мг/кг и 7,5 мг/кг при введении A372-MB110/B040-ml0r (фиг. 60).

В результате оценки активации Т-клеток в печени наблюдают увеличение экспрессии PD-1 при введении NS2-MB110. Это также наблюдают при введении A372-MB110/B040-ml0r (фиг. 61).

Таким образом, переключаемое антитело ингибирует активацию Т-клеток в лимфатических узлах и селезенке в отличие от непереключаемого антитела.

(6-4-12) Исследование лекарственной эффективности (противоопухолевого эффекта) антитела A372-MB492/B040-ml0r

После создания модели мышей с трансплантацией рака MC38 в контрольном примере 6-4-1 разбавитель и A372-MB110/B040-ml0r вводят в дозах, представленных в табл. 58. Введение антител осуществляют дважды в хвостовую вену в день формирования группы и через три дня после этого. В качестве растворителя используют ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20.

Таблица 58. Подробная информация по группам по исследованию эффективности A372-MB492/B040-ml0r.

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза (мг/кг)	Сутки введения
1	5	Разбавитель	-	В день формирования группы и на третий день после формирования группы
2	5	A372-MB492/ B040-ml0r	1,5	В день формирования группы и на третий день после формирования группы
3	5	A372-MB492/ B040-ml0r	3,0	В день формирования группы и на третий день после формирования группы
4	5	A372-MB492/ B040-ml0r	7,5	В день формирования группы и на третий день после формирования группы

Противоопухолевый эффект в каждой группе оценивают по объему опухоли по расчетам, описанным в контрольном примере 6-4-1. В результате наблюдают противоопухолевый эффект антитела A372-MB492/B040-ml0r для всех доз (фиг. 62).

<u>(6-4-13) Введение антител и отбор образцов, а также анализ FCM для оценки системных эффектов антитела A372-MB492/B040-ml0r</u>

После получения модели мышей с трансплантацией рака MC38 в контрольном примере 6-4-1 разбавитель, NS1-MB492 (непереключаемое антитело) и A372-MB492/B040-ml0r вводят в дозах, представленных в табл. 59. Введение антител осуществляют дважды в хвостовую вену, а именно в день формирования группы и через три дня после этого. В качестве разбавителя используют ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20.

Через восемь дней после первоначального введения собирают печень, лимфатические узлы и селезенку, как показано в контрольном примере 6-4-2 (сбор различных органов у мышей, трансплантированных клеточной линией MC38, и получение фракций лимфоцитов). Измеряют массу отобранных селезенок, а также подсчитывают лимфоциты во фракциях из лимфоузлов.

Таблица 59. Подробная информация по группам по исследованию системных ответов A372-MB492/B040-ml0r.

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза (мг/кг)	День введения	День взятия образца
1	3	Разбавитель	-	В день формирования группы и через три дня после формирования группы	Через 8 суток после формирования группы
2	3	NS1-MB492	7,5	В день формирования группы и через три дня после формирования группы	Через 8 суток после формирования группы
3	3	A372-MB492/ B040-ml0r	1,5	В день формирования группы и через три дня после формирования группы	Через 8 суток после формирования группы
4	3	A372-MB492/ B040-ml0r	3,0	В день формирования группы и через три дня после формирования группы	Через 8 суток после формирования группы
5	3	A372-MB492/ B040-ml0r	7,5	В день формирования группы и через три дня после формирования группы	Через 8 суток после формирования группы

Оценивают системные эффекты от введенных антител. Наблюдают увеличение массы селезенок при введении NS1-MB492 и увеличение клеток во фракциях лимфоцитов при введении NS1-MB492. С другой стороны, при введении A372-MB492/B040-ml0r в дозах 1,5 мг/кг, 3,0 мг/кг и 7,5 мг/кг наблюдают ингибирование органомегалии по сравнению с введением NS1-MB492 (фиг. 63).

В результате оценки активации Т-клеток в печени увеличение экспрессии гранзима В наблюдают при введении NS1-MB492 и A372-MB492/B040-ml0r по сравнению с введением разбавителя (фиг. 64).

Таким образом, переключаемое антитело ингибирует активацию Т-клеток в лимфатических узлах и селезенке по сравнению с непереключаемым антителом.

<u>(6-4-14) Исследование лекарственной эффективности (противоопухолевого эффекта) антител A486-MB492/B167-ml0r и A488-MB492/B226-ml0r</u>

После создания модели мышей с трансплантацией рака MC38 в примере 6-4-1 растворитель и антитела A486-MB492/B167-ml0r и A488-MB492/B226-ml0r вводят в дозах, представленных в табл. 60. Формирование групп проводят через 10 дней после трансплантации клеток, а введение антител осуществляют в хвостовую вену через 11, 15, 18 и 22 дня после трансплантации клеток, в общей сложности четыре раза. В качестве разбавителя применяют ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20.

Таблица 60. Подробная информация по лекарственной эффективности по антителам A486-MB492/B167-ml0r и A488-MB492/B226-ml0r.

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза (мг/кг)	День введения
1	5	Разбавитель	-	Через 11, 15, 18 и 22 дня после трансплантации
2	5	A486-MB492/B167-ml0r	7,5	Через 11, 15, 18 и 22 дня после трансплантации
3	5	A488-MB492/B226-ml0r	7,5	Через 11, 15, 18 и 22 дня после трансплантации

Противоопухолевый эффект в каждой группе оценивают по объему опухоли по расчетам, описанным в контрольном примере 6-4-1. Результаты подтверждают противоопухолевый эффект A486-MB492/B167-ml0r и A488-MB492/B226-ml0r (фиг. 65).

<u>(6-4-15) Введение антител и отбор образцов, а также анализ FCM для оценки системных эффектов антител A486-MB492/B167-ml0r и A488-MB492/B226-ml0r</u>

После создания модели мышей с трансплантацией рака MC38 в контрольном примере 6-4-1 разбавитель, NS1-MB492 (непереключаемое антитело), A486-MB492/B167-ml0r и A488-MB492/B226-ml0r вводят в дозах, представленных в табл. 61. Формирование групп проводят через 10 дней после трансплантации клеток, а введение антител осуществляют в хвостовую вену через 11, 15, 18 и 22 дня после трансплантации клеток, в общей сложности четыре раза. В качестве растворителя применяют ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20.

Печень, лимфатические узлы и селезенку собирают через 13 дней после первоначального введения, как показано в контрольном примере 6-4-2 (сбор различных органов у мышей, трансплантированных клеточной линией MC38, и подготовка фракций лимфоцитов). Проводят измерение массы селезенок, а также подсчитывают лимфоциты для фракций из лимфоузлов.

Таблица 61. Подробная информация по группам по исследованию системных ответов на антитела A486-MB492/B167-ml0r и A488-MB492/B226-ml0r.

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза (мг/кг)	День введения	День отбора образцов
1	3	Растворитель	-	11, 15, 18 и 22 дня после трансплантации	24 день после трансплантации (13 день после начала введения)
2	3	NS1-MB492	7,5	11, 15, 18 и 22 дня после трансплантации	24 день после трансплантации (13 день после начала введения)
3	3	A486-MB492/ B167-ml0r	7,5	11, 15, 18 и 22 дня после трансплантации	24 день после трансплантации (13 день после начала введения)
4	3	A488-MB492/ B226-ml0r	7,5	11, 15, 18 и 22 дня после трансплантации	24 день после трансплантации (13 день после начала введения)

В результате измерения количества клеток во фракциях лимфоцитов из лимфатических узлов и измерения массы селезенки при введении NS1-MB492 наблюдают увеличение количества лимфоцитов и массы селезенки. С другой стороны, замечено, что увеличение количества лимфоцитов и массы селезенки подавляются при введении A486-MB492/B167-ml0r и A488-MB492/B226-ml0r по сравнению с таковыми при введении NS1-MB492 (фиг. 66).

В результате оценки активации Т-клеток в печени увеличение процента CD8α-положительных клеток наблюдают при введении NS1-MB492, A486-MB492/B167-ml0r и A488-MB492/B226-ml0r по сравнению с введением разбавителя (фиг. 67).

На основании вышеизложенного подтверждено, что по сравнению с непереключаемым антителом переключаемое антитело ингибирует активацию Т-клеток в лимфатических узлах и селезенке.

(6-4-16) Исследование лекарственной эффективности (противоопухолевого эффекта) антитела A489-MB492/B223-ml0r

После создания модели мышей с трансплантацией рака MC38 в контрольном примере 6-4-1 разбавитель и антитело A489-MB492/B223-ml0r вводят в дозах, представленных в табл. 62. Введение антитела осуществляют четыре раза через хвостовую вену на следующий день, через четыре, семь и десять дней после формирования группы. В качестве растворителя применяют ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20.

Таблица 62. Подробное изучение лекарственной эффективности в группах при введении антитела A489-MB492/B223-ml0r.

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза (мг/кг)	День введения
1	5	Растворитель	-	На следующий день после формирования группы, на четвертый, седьмой и десятый день после формирования группы
2	5	A489-MB492/B223-ml0r	7,5	На следующий день после формирования группы, на четвертый, седьмой и десятый день после формирования группы

Противоопухолевый эффект в каждой группе оценивают по объему опухоли по расчетам, описанным в контрольном примере 6-4-1. Результаты подтверждают противоопухолевый эффект от введения дозы 7,5 мг/кг (фиг. 68).

<u>(6-4-17) Введение антител и отбор образцов, а также анализ FCM для оценки системных эффектов антитела A489-MB492/B223-ml0r</u>

После создания модели мышей с трансплантацией рака MC38 в контрольном примере 6-4-1 разбавитель, NS1-MB492 (непереключаемое антитело) и A489-MB492/B223-ml0r вводят в дозах, представленных в табл. 63. Введение антител осуществляют через хвостовую вену в день формирования группы, а также через 3 дня и 6 дней после формирования группы, в общей сложности три раза. В качестве растворителя применяют ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20.

Через семь дней после первоначального введения печень, лимфатические узлы и селезенку собирают, как показано в контрольном примере 6-4-2 (сбор различных органов у мышей, трансплантированных клеточной линией MC38, и подготовка фракций лимфоцитов). В селезенках и лимфоузлах проводят только измерение количества клеток только во фракциях лимфоцитов.

Таблица 63. Подробная информация по группам по исследованию системных ответов антитела A489-MB492/B223-ml0r.

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза (мг/кг)	День введения	День отбора образцов
1	3	Разбавитель	-	В день формирования группы, на третий и шестой день после формирования группы	Седьмой день после формирования группы

Группа	Число животных	Фармацевти-ческий агент	Доза (мг/кг)	День введения	День отбора образцов
2	3	NS1-MB492	7,5	В день формирования группы, на третий и шестой день после формирования группы	Седьмой день после формирования группы
3	3	A489-MB492/ B223-ml0r	7,5	В день формирования группы, на третий и шестой день после формирования группы	Седьмой день после формирования группы

В результате измерения количества клеток во фракциях лимфоцитов из лимфатических узлов и селезенки наблюдают увеличение количества клеток при введении NS1-MB492. С другой стороны, подавление увеличения количества лимфоцитов наблюдают при введении A489-MB492/B223-ml0r по сравнению с таковым при введении NS1-MB492 (фиг. 69).

В результате оценки активации Т-клеток в печени наблюдают увеличение процента CD8α-положительных клеток при введении NS1-MB492 и A489-MB492/B223-ml0r по сравнению с растворителем (фиг. 70).

На основании вышеизложенного подтверждено, что по сравнению с непереключаемым антителом переключаемое антитело ингибирует активацию Т-клеток в лимфатических узлах и селезенке.

(6-4-18) Исследование лекарственной эффективности (противоопухолевого эффекта) антител A548-mIgG1/B256-ml0r и A551-mIgG1/B256-ml0r

После создания модели мышей с трансплантацией рака MC38 в контрольном примере 6-4-1 разбавитель и антитела A548-mIgG1/B256-ml0r и A551-mIgG1/B256-ml0r вводят в дозах, представленных в табл. 64. Введение антитела осуществляют через хвостовую вену два раза: в день формирования группы и через три дня. В качестве растворителя применяют ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20.

Таблица 64. Подробная информация исследования по группам лекарственной эффективности антител A548-mIgG1/B256-ml0r и A551-mIgG1/B256-ml0r

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза (мг/кг)	День введения
1	5	Разбавитель	-	В день формирования группы и через три дня

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза (мг/кг)	День введения
2	5	A548-mIgG1/B256-ml0r	7,5	В день формирования группы и через три дня
3	5	A548-mIgG1/B256-ml0r	37,5	В день формирования группы и через три дня
4	4	A548-mIgG1/B256-ml0r	100	В день формирования группы и через три дня
5	5	A551-mIgG1/B256-ml0r	7,5	В день формирования группы и через три дня
6	5	A551-mIgG1/B256-ml0r	37,5	В день формирования группы и через три дня
7	4	A551-mIgG1/B256-ml0r	100	В день формирования группы и через три дня

Противоопухолевый эффект в каждой группе оценивают по объему опухоли по расчетам, описанным в контрольном примере 6-4-1. Результаты подтверждают противоопухолевый эффект от введения A548-mIgG1/B256-ml0r в дозах 37,5 мг/кг и 100 мг/кг. A551-mIgG1/B256-ml0r также проявляет существенный противоопухолевый эффект в дозе 100 мг/кг (фиг. 71).

(6-4-19) Введение антител и отбор образцов, а также анализ FCM для оценки системных эффектов антител A548-mIgG1/B256 и A551-mIgG1/B256

После создания модели мышей с трансплантацией рака MC38 в контрольном примере 6-4-1 растворитель, NS1-mIgG1 (непереключаемое антитело), A548-mIgG1/B256-ml0r и A551-mIgG1/B256-ml0r вводят в дозах, представленных в табл. 65. Введение антител осуществляют через хвостовую вену в день формирования группы, а также через 3 дня после формирования группы, в общей сложности два раза. В качестве растворителя применяют ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20.

Через пять дней после первоначального введения печень, лимфатические узлы и селезенку собирают, как показано в контрольном примере 6-4-2 (сбор различных органов у мышей, трансплантированных клеточной линией MC38, и подготовка фракций лимфоцитов). У образцов селезенок и лимфоузлов определяют только массу органов.

Таблица 65. Подробная информация исследования по группам системных ответов на применение антител A548-mIgG1/B256-ml0r и A551-mIgG1/B256-ml0r

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза (мг/кг)	День введения	День отбора проб
1	3	Разбавитель	-	В день формирования группы и через три дня	Через пять дней после формирования группы
2	3	NS1-mIgG1	0,3	В день формирования группы и через три дня	Через пять дней после формирования группы
3	3	NS1-mIgG1	1,5	В день формирования группы и через три дня	Через пять дней после формирования группы
4	3	NS1-mIgG1	7,5	В день формирования группы и через три дня	Через пять дней после формирования группы
5	3	A548-mIgG1/ B256-ml0r	1,5	В день формирования группы и через три дня	Через пять дней после формирования группы
6	3	A548-mIgG1/ B256-ml0r	7,5	В день формирования группы и через три дня	Через пять дней после формирования группы
7	3	A548-mIgG1/ B256-ml0r	37,5	В день формирования группы и через три дня	Через пять дней после формирования группы
8	3	A548-mIgG1/ B256-ml0r	100	В день формирования группы и через три дня	Через пять дней после формирования группы
9	3	A551-mIgG1/ B256-ml0r	1,5	В день формирования группы и через три дня	Через пять дней после формирования группы
10	3	A551-mIgG1/ B256-ml0r	7,5	В день формирования группы и через три дня	Через пять дней после формирования группы
11	3	A551-mIgG1/ B256-ml0r	37,5	В день формирования группы и через три дня	Через пять дней после формирования группы
12	3	A551-mIgG1/ B256-ml0r	100	В день формирования группы и через три дня	Через пять дней после формирования группы

В результате оценки массы органов лимфатических узлов и селезенки наблюдают увеличение массы органа при введении NS1-mIgG1 в дозе 0,3 мг/кг, 1,5 мг/кг и 7,5 мг/кг. С другой стороны не наблюдают гипертрофии органов при введении A548-mIgG1/B256-ml0r или A551-mIgG1/B256-ml0r в любой дозе из доз 1,5 мг/кг, 7,5 мг/кг, 37,5 мг/кг и 100 мг/кг (фиг. 72).

В результате оценки активации Т-клеток в печени наблюдают увеличение экспрессии как гранзима B, так и PD-1 при введении NS1-mIgG1 в дозе 0,3 мг/кг. С другой стороны, экспрессия подавляется при введении A548-mIgG1/B256-ml0r и A551-mIgG1/B256-ml0r дозе из доз 1,5 мг/кг, 7,5 мг/кг, 37,5 мг/кг и 100 мг/кг (фиг. 73).

Таким образом, по сравнению с непереключаемым антителом переключаемое антитело ингибирует активацию Т-клеток в лимфатических узлах, селезенке и печени.

(6-4-20) Исследование лекарственной эффективности (противоопухолевого эффекта) антитела A551-MB110/B379-ml0r

После создания модели мышей с трансплантацией MC38 в контрольном примере 6-4-1, разбавитель и антитело A551-MB110/B379-ml0r вводят в дозах, указанных в табл. 66. Антитела вводят дважды в хвостовую вену и через три дня после формирования группы. В качестве растворителя используют ФСБ с 0,05% Tween-20.

Таблица 66. Подробная информация по группах исследования лекарственной эффективности антитела A551-MB110/B379-ml0r.

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза (мг/кг)	День введения
1	6	Разбавитель	-	В день формирования группы и через три дня
2	5	A551-MB110/ B379-ml0r	2,5	В день формирования группы и через три дня
3	6	A551-MB110/ B379-ml0r	7,5	В день формирования группы и через три дня
4	6	A551-MB110/ B379-ml0r	22,5	В день формирования группы и через три дня

Противоопухолевый эффект в каждой группе оценивают по объему опухоли, рассчитанной ка описано в контрольном примере 6-4-1. В результате противоопухолевый эффект подтвержден для каждой дозировки (фиг. 74).

(6-4-21) Введение антител и отбор образцов, а также анализ FCM для оценки системных эффектов

После создания модели мышей с трансплантацией MC38 в контрольном примере 6-4-1 вводят разбавитель, NS1-mIgG1 (непереключаемое антитело) и A551-MB110/B379-ml0r вводят как показано в табл. 67. Введение антитела проводят два раза в хвостовую вену в день формирования группы и через 3 дня после формирования группы. В качестве разбавителя применяют ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20.

Печень, лимфатические узлы и селезенки собирают через 5 дней после первоначального введения, как показано в контрольном примере 6-4-2 (сбор различных органов у мышей с трансплантированной клеточной линией MC38 и подготовка фракций лимфоцитов) и анализ FCM выполняют, как показано в контрольном примере 6-4-3 (анализ FCM с использованием фракций лимфоцитов различных органов).

Таблица 67. Подробная информация по группам для оценки системных ответов с антителом A551-MB110/B379-ml0r.

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза (мг/кг)	День введения	День отбора проб
1	3	Растворитель	-	В день формирования группы и через три дня после формирования группы	Через пять дней после формирования группы
2	3	NS1-mIgG1	7,5	В день формирования группы и через три дня после формирования группы	Через пять дней после формирования группы
3	3	A551-MB110/ B379-ml0r	0,83	В день формирования группы и через три дня после формирования группы	Через пять дней после формирования группы
4	3	A551-MB110/ B379-ml0r	2,5	В день формирования группы и через три дня после формирования группы	Через пять дней после формирования группы
5	3	A551-MB110/ B379-ml0r	7,5	В день формирования группы и через три дня после формирования группы	Через пять дней после формирования группы
6	3	A551-MB110/ B379-ml0r	22,5	В день формирования группы и через три дня после формирования группы	Через пять дней после формирования группы

В результате оценки массы органов лимфатических узлов и селезенки наблюдают увеличение массы органов при введении NS1-mIgG1 в дозе 7,5 мг/кг. С другой стороны, увеличения органов не наблюдают при введении A551-MB110/B379-ml0r в любой дозе, а именно 0,83 мг/кг, 2,5 мг/кг, 7,5 мг/кг и 22,5 мг/кг (фиг. 75). Кроме того, при оценке активации T-клеток в селезенке методом FCM, увеличение маркеров активации (PD-1, ICOS, гранзима B), наблюдаемое при введении NS1-mIgG1, не подтверждалось при введении A551-MB110/B379-ml0r в любой дозе (фиг. 76).

При оценке активации T-клеток в печени увеличение экспрессии как PD-1, так и ICOS наблюдают при введении NS1-mIgG1 в дозе 7,5 мг/кг. С другой стороны, подавление экспрессии на уровне растворителя, когда A551-MB110/B379-ml0r вводят в дозах 0,83 мг/кг и 2,5 мг/кг, и даже большее подавление экспрессии, чем от NS1-mIgG1, при дозе 7,5 мг/кг (фиг. 77).

Таким образом, по сравнению с непереключаемым антителом переключаемое антитело ингибирует активацию Т-клеток в лимфатических узлах, селезенке и печени.

Пример 7. Получение модифицированной Fc-области, способной усиливать агонистическую активность

(7-1) Получение вариантов с повышенной FcγR-связывающей активностью.

Константная область тяжелой цепи TT14 (SEQ ID NO: 149), которая увеличивает FcγRIIb-связывающую активность, как описано в WO2017104783 (константная область тяжелой цепи, содержащая T250V/T307P в качестве аминокислотных модификаций, и L234Y/P238D/V264I/A330K в качестве аминокислотных модификаций для увеличения FcγRIIb-связывающей активности в Fc-области, содержащей SEQ ID NO: 182 (оба модифицированных положения приведены в соответствии с нумерацией ЕС), область TT16 (SEQ ID NO: 150), содержащую мутацию аминокислоты G237D, введенную в константную область тяжелой цепи TT11, которая увеличивает FcγRIIb-связывающую активность, как описано в WO2017104783 (константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные модификации T250V/T307P и L234Y/P238D/A330K в качестве модификаций для увеличения FcγRIIb-связывающей активности в Fc-области, содержащей SEQ ID NO: 182 (оба модифицированных положения приведены в соответствии с нумерацией ЕС)), константную область тяжелой цепи P587 (SEQ ID NO : 151), которая увеличивает FcγRIIb-связывающую активность, как описано в WO2014163101; и последовательность P253 (SEQ ID NO: 93), являющуюся предшествующим вариантом константной области тяжелой цепи с повышенной связываемостью с FcγRIIb, объединенную с вариабельной областью тяжелой цепи переключаемого антитела (A375; A372; A356; A486; A488; A489; A548; и A551) или с вариабельной областью тяжелой цепи антитела – отрицательного контрольного (IC17HdK (SEQ ID NO: 152). В результате были созданы гены со следующими комбинациями каждой константной области и вариабельной области тяжелой цепи.

Таблица 68.

Тяжелая цепь полной длины	Вариабельная область тяжелой цеп (SEQ ID NO)	Константная область тяжелой цепи (SEQ ID NO)
A375-TT14	A375 (SEQ ID NO: 43)	TT14 (SEQ ID NO: 149)
A375-TT16	A375 (SEQ ID NO: 43)	TT16 (SEQ ID NO: 150)

Тяжелая цепь полной длины	Вариабельная область тяжелой цеп (SEQ ID NO)	Константная область тяжелой цепи (SEQ ID NO)
A375-P587	A375 (SEQ ID NO: 43)	P587 (SEQ ID NO: 151)
A372-P253	A372 (SEQ ID NO: 44)	P253 (SEQ ID NO: 93)
A356-TT16	A356 (SEQ ID NO: 45)	TT16 (SEQ ID NO: 150)
A356-P587	A356 (SEQ ID NO: 45)	P587 (SEQ ID NO: 151)
A486-P253	A486 (SEQ ID NO: 46)	P253 (SEQ ID NO: 93)
A488-P253	A488 (SEQ ID NO: 48)	P253 (SEQ ID NO: 93)
A489-P253	A489 (SEQ ID NO: 49)	P253 (SEQ ID NO: 93)
A548-P587	A548 (SEQ ID NO: 50)	P587 (SEQ ID NO: 151)
A551-TT16	A551 (SEQ ID NO: 51)	TT16 (SEQ ID NO: 150)
A551-P587	A551 (SEQ ID NO: 51)	P587 (SEQ ID NO: 151)
IC17HdK-TT16	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	TT16 (SEQ ID NO: 150)
IC17HdK-P587	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	P587 (SEQ ID NO: 151)
IC17HdK-P253	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	P253 (SEQ ID NO: 93)

Вариабельную область тяжелой цепи переключаемого антитела (A375, A356 и A551) или вариабельную область тяжелой цепи антитела – отрицательного контроля (IC17HdK (SEQ ID NO: 152)) объединяют с константной областью тяжелой цепи MY201 (SEQ ID НЕТ: 153) (константной областью тяжелой цепи, содержащей G236N/H268D/A330K в качестве аминокислотных модификаций, которые повышают связывающую активность с FcγRIIb в Fc-области, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 182 (все модифицированные положения указаны по нумерации EC)) или MY518 (SEQ ID NO: 154) (константной областью тяжелой цепи, содержащей L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K в качестве аминокислотных модификаций, которые повышают связывающую активность с FcγRIIb в Fc-области, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 182 (все модифицированные положения указаны по нумерации EC), которые описаны в WO 2017104783 и имеют повышенную связывающую активность с FcγR, константную область тяжелой цепи MY201a (SEQ ID NO: 155) или MY518a (SEQ ID NO: 156), в которой модификация K214R интродуцирована в MY201 или MY518, или константную область тяжелой цепи MY201aPh (SEQ ID NO: 157), в которой модификация L235W интродуцирована в MY201a. В результате созданы гены с комбинациями каждой константной области и вариабельной области тяжелой цепи, представленные ниже в табл. 69.

Таблица 69.

Тяжелая цепь полной длины	Вариабельная область тяжелой цеп (SEQ ID NO)	Константная область тяжелой цепи (SEQ ID NO)
A375-MY201aPh	A375 (SEQ ID NO: 43)	MY201aPh (SEQ ID NO: 157)
A375-MY518	A375 (SEQ ID NO: 43)	MY518 (SEQ ID NO: 154)
A375-MY518a	A375 (SEQ ID NO: 43)	MY518a (SEQ ID NO: 156)

Тяжелая цепь полной длины	Вариабельная область тяжелой цеп (SEQ ID NO)	Константная область тяжелой цепи (SEQ ID NO)
A356-MY518	A356 (SEQ ID NO: 45)	MY518 (SEQ ID NO: 154)
A551-MY201a	A551 (SEQ ID NO: 51)	MY201a SEQ ID NO: 155)
A551-MY201aPh	A551 (SEQ ID NO: 51)	MY201aPh (SEQ ID NO: 157)
A551-MY518	A551 (SEQ ID NO: 51)	MY518 (SEQ ID NO: 154)
A551-MY518a	A551 (SEQ ID NO: 51)	MY518a (SEQ ID NO: 156)
IC17HdK-MY201	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	MY201 (SEQ ID NO: 153)
IC17HdK-MY201aPh	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	MY201aPh (SEQ ID NO: 157)
IC17HdK-MY518	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	MY518 (SEQ ID NO: 154)
IC17HdK-MY518a	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	MY518a (SEQ ID NO: 156)

В табл. 70 показано, что представляющие интерес антитела экспрессированы и очищены методами, известными специалистам в данной области техники, путем комбинирования указанных выше генов тяжелой цепи антитела с геном легкой цепи переключаемого антитела (B040-Lamlib, B167-Lamlib , B226-Lamlib, B223-Lamlib, B256-Lamlib и B379-Lamlib, полученные в контрольных примерах 5-2 и 5-3) или геном легкой цепи антитела – отрицательного контроля (IC17L-k0, полученного путем объединения легкой цепи вариабельная область IC17L (SEQ ID NO: 158) с цепью к человека k0 (SEQ ID NO: 141) в качестве константной области легкой цепи).

Таблица 70. Варианты с повышенной FcγR-связывающей активностью.

Вариабельная область (тяжелая цепь/легкая цепь)	Константная область тяжелой цепи	Константная область легкой цепи	Обозначение антитела
A375/B167	MY201aPh	Lamlib	A375-MY201aPh/B167-Lamlib
	MY518	Lamlib	A375-MY518/B167-Lamlib
	MY518a	Lamlib	A375-MY518a/B167-Lamlib
	P587	Lamlib	A375-P587/B167-Lamlib
	TT14	Lamlib	A375-TT14/B167-Lamlib
	TT16	Lamlib	A375-TT16/B167-Lamlib
A372/B040	P253	Lamlib	A372-P253/B040-Lamlib
	MY518	Lamlib	A356-MY518/B040-Lamlib
	P587	Lamlib	A356-P587/B040-Lamlib
	TT16	Lamlib	A356-TT16/B040-Lamlib
A486/B167	P253	Lamlib	A486-P253/B167-Lamlib
A488/B226	P253	Lamlib	A488-P253/B226-Lamlib
A489/B223	P253	Lamlib	A489-P253/B223-Lamlib
A548/B256	P587	Lamlib	A548-P587/B256-Lamlib
A551/B256	MY201a	Lamlib	A551-MY201a/B256-Lamlib
	MY201aPh	Lamlib	A551-MY201aPh/B256-Lamlib
	MY518	Lamlib	A551-MY518/B256-Lamlib
	P587	Lamlib	A551-P587/B256-Lamlib
A551/B379	MY518a	Lamlib	A551-MY518a/B379-Lamlib
	P587	Lamlib	A551-P587/B379-Lamlib

Вариабельная область (тяжелая цепь/легкая цепь)	Константная область тяжелой цепи	Константная область легкой цепи	Обозначение антитела
	TT16	Lamlib	A551-TT16/B379-Lamlib
IC17HdK/IC17L	MY201	k0	IC17HdK-MY201/IC17L-k0
	MY201aPh	k0	IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0
	MY518	k0	IC17HdK-MY518/IC17L-k0
	MY518a	k0	IC17HdK-MY518a/IC17L-k0
	P253	k0	IC17HdK-P253/IC17L-k0
	P587	k0	IC17HdK-P587/IC17L-k0
	TT16	k0	IC17HdK-TT16/IC17L-k0

(7-2) Получение вариантов с увеличенным показателем pI путем аминокислотной модификации константной области

Константную область тяжелой цепи получают путем объединения константной области тяжелой цепи с повышенной FcγR-связывающей активностью, полученной в примере 7-1, с Q311R, P343R и D413K, которые представляют собой аминокислотные мутации, увеличивающие pI без значительного изменения FcγR-связывающей активности, как описано в WO 2017046994.

В частности, получают гены константной области тяжелой цепи с аминокислотными мутациями, введенными в каждый из генов константной области тяжелой цепи антитела, как показано ниже.

- Введение P343R/D413K в MY518 (SEQ ID NO: 154): SCF025 (SEQ ID NO: 64)

- Введение P343R/D413K в MY518a (SEQ ID NO: 156): SCF025a (SEQ ID NO: 65)

- Введение P343R/D413K в TT14 (SEQ ID NO: 149): SCF027 (SEQ ID NO: 66)

- Введение P343R/D413K в TT16 (SEQ ID NO: 150): SCF028 (SEQ ID NO: 67)

- Введение Q311R/P343R в MY518 (SEQ ID NO: 154): SCF030 (SEQ ID NO: 68)

- Введение Q311R/P343R в TT14 (SEQ ID NO: 149): SCF032 (SEQ ID NO: 69)

- Введение Q311R/P343R в TT16 (SEQ ID NO: 150): SCF033 (SEQ ID NO: 70)
- Введение P343R в MY518 (SEQ ID NO: 154): SCF039 (SEQ ID NO: 71)
- Введение P343R в MY518a (SEQ ID NO: 156): SCF039a (SEQ ID NO: 72)
- Введение D413K в MY518 (SEQ ID NO: 154): SCF040 (SEQ ID NO: 73)
- Введение P343R в MY201a (SEQ ID NO: 155): SCF041a (SEQ ID NO: 74)
- Введение P343R в MY201aPh (SEQ ID NO: 157): SCF041aPh (SEQ ID NO: 75)
- Введение D413K в MY201a (SEQ ID NO: 155): SCF042a (SEQ ID NO: 76)
- Введение P343R/D413K в MY201a (SEQ ID NO: 155): SCF043a (SEQ ID NO: 77)
- Введение P343R/D413K в MY201aPh (SEQ ID NO: 157): SCF043aPh (SEQ ID NO: 78)
- Введение Q311R в MY201a (SEQ ID NO: 155): SCF056a (SEQ ID NO: 79)
- Введение Q311R в MY201aPh (SEQ ID NO: 157): SCF056aPh (SEQ ID NO: 80)
- Введение Q311R/P343R в MY201a (SEQ ID NO: 155): SCF057a (SEQ ID NO: 81)
- Введение Q311R/P343R в MY201aPh (SEQ ID NO: 157): SCF057aPh (SEQ ID NO: 82)
- Введение Q311R/D413K в MY201a (SEQ ID NO: 155): SCF059a (SEQ ID NO: 83)
- Введение Q311R/D413K в MY201aPh (SEQ ID NO: 157): SCF059aPh (SEQ ID NO: 84)
- Введение Q311R в MY518a (SEQ ID NO: 156): SCF060a (SEQ ID NO: 85)

Гены тяжелой цепи антитела получают, как показано в табл. 71 ниже, путем комбинирования гена константной области тяжелой цепи, полученного в настоящем изобретении, с геном вариабельной области тяжелой цепи A375 (SEQ ID NO: 43) или A551 (SEQ ID NO: 51).

Таблица 71.

Тяжелая цепь полной длины	Вариабельная область тяжелой цеп (SEQ ID NO)	Константная область тяжелой цепи (SEQ ID NO)
A375-SCF025	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF025 (SEQ ID NO: 64)
A375-SCF027	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF027 (SEQ ID NO: 66)
A375-SCF028	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF028 (SEQ ID NO: 67)
A375-SCF030	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF030 (SEQ ID NO: 68)

Тяжелая цепь полной длины	Вариабельная область тяжелой цеп (SEQ ID NO)	Константная область тяжелой цепи (SEQ ID NO)
A375-SCF032	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF032 (SEQ ID NO: 69)
A375-SCF033	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF033 (SEQ ID NO: 70)
A375-SCF039	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF039 (SEQ ID NO: 71)
A375-SCF040	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF040 (SEQ ID NO: 73)
A375-SCF041aPh	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF041aPh (SEQ ID NO: 75)
A375-SCF043aPh	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF043aPh (SEQ ID NO: 78)
A375-SCF056aPh	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF056aPh (SEQ ID NO: 80)
A375-SCF057aPh	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF057aPh (SEQ ID NO: 82)
A375-SCF059aPh	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF059aPh (SEQ ID NO: 84)
A375-SCF060a	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF060a (SEQ ID NO: 85)
A551-SCF025a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF025a (SEQ ID NO: 65)
A551-SCF039a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF039a (SEQ ID NO: 72)
A551-SCF041a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF041a (SEQ ID NO: 74)
A551-SCF041aPh	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF041aPh (SEQ ID NO: 75)
A551-SCF043a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF043a (SEQ ID NO: 77)
A551-SCF043aPh	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF043aPh (SEQ ID NO: 78)
A551-SCF056a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF056a (SEQ ID NO: 79)
A551-SCF056aPh	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF056aPh (SEQ ID NO: 80)
A551-SCF057a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF057a (SEQ ID NO: 81)
A551-SCF057aPh	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF057aPh (SEQ ID NO: 82)
A551-SCF059a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF059a (SEQ ID NO: 83)
A551-SCF059aPh	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF059aPh (SEQ ID NO: 84)
A551-SCF060a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF060a (SEQ ID NO: 85)

Кроме того, путем объединения этих генов тяжелой цепи антитела с генами B167-Lamlib, B256-Lamlib и B379-Lamlib, полученными в контрольном примере 5-3 в качестве генов легкой цепи антитела, требуемое антитело было экспрессировано и очищено, как показано в табл. 72 методами, известными специалистам в данной области.

Таблица 72.

Вариабельная область (тяжелой цепи /легкой цепи)	Константная область тяжелой цепи	Константная область легкой цепи	Название антитела
A375 / B167 (A375 SEQ ID NO: 43) (B167 SEQ ID NO: 54)	SCF025 (SEQ ID NO: 64)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF025/B167-LamLib
	SCF027 (SEQ ID NO: 66)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF027/B167-LamLib
	SCF028 (SEQ ID NO: 67)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF028/B167-LamLib
	SCF030 (SEQ ID NO: 68)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF030/B167-LamLib
	SCF032 (SEQ ID NO: 69)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF032/B167-LamLib
	SCF033 (SEQ ID NO: 70)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF033/B167-LamLib
	SCF039 (SEQ ID NO: 71)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF039/B167-LamLib
	SCF040 (SEQ ID NO: 73)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF040/B167-LamLib
	SCF041aPh (SEQ ID NO: 75)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF041aPh/B167-LamLib
	SCF043aPh (SEQ ID NO: 78)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF043aPh/B167-LamLib
	SCF056aPh (SEQ ID NO: 80)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF056aPh/B167-LamLib
	SCF057aPh (SEQ ID NO: 82)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF057aPh/B167-LamLib
	SCF059aPh (SEQ ID NO: 84)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF059aPh/B167-LamLib
	SCF060a (SEQ ID NO: 85)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF060a/B167-LamLib
A551 / B256 (A551 SEQ ID NO: 51) (B256 SEQ ID NO: 59)	SCF025a (SEQ ID NO: 65)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF025a/B256-LamLib
	SCF039a (SEQ ID NO: 72)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF039a/B256-LamLib
	SCF041a (SEQ ID NO: 74)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF041a/B256-LamLib
	SCF041aPh (SEQ ID NO: 75)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF041aPh/B256-LamLib
	SCF043a (SEQ ID NO: 77)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF043a/B256-LamLib
	SCF043aPh (SEQ ID NO: 78)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF043aPh/B256-LamLib
	SCF056a (SEQ ID NO: 79)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF056a/B256-LamLib
	SCF056aPh (SEQ ID NO: 80)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF056aPh/B256-LamLib
	SCF057a (SEQ ID NO: 81)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF057a/B256-LamLib
	SCF057aPh (SEQ ID NO: 82)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF057aPh/B256-LamLib
	SCF059a (SEQ ID NO: 83)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF059a/B256-LamLib
	SCF059aPh (SEQ ID NO: 84)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF059aPh/B256-LamLib
A551 / B379 (A551 SEQ ID NO: 51) (B379 SEQ ID NO: 60)	SCF039a (SEQ ID NO: 72)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF039a/B379-LamLib
	SCF041a (SEQ ID NO: 74)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF041a/B379-LamLib
	SCF041aPh (SEQ ID NO: 75)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF041aPh/B379-LamLib
	SCF043a (SEQ ID NO: 77)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF043a/B379-LamLib
	SCF043aPh (SEQ ID NO: 78)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF043aPh/B379-LamLib
	SCF056a (SEQ ID NO: 79)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF056a/B379-LamLib
	SCF056aPh (SEQ ID NO: 80)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF056aPh/B379-LamLib
	SCF057a (SEQ ID NO: 81)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF057a/B379-LamLib
	SCF057aPh (SEQ ID NO: 82)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF057aPh/B379-LamLib
	SCF059a (SEQ ID NO: 83)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF059a/B379-LamLib
	SCF059aPh (SEQ ID NO: 84)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF059aPh/B379-LamLib
	SCF060a (SEQ ID NO: 85)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF060a/B379-LamLib

(7-3) Выработка контрольных антител для сравнения агонистической активности

Получают антитела (IC17HdK-MY201/IC17L-k0; IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0; IC17HdK-MY518/IC17L-k0; IC17HdK-MY518a/IC17L-k0; IC17HdK-P253/IC17L-k0; IC17HdK-P587/IC17L-k0; IC17HdK-TT16/IC17L-k0) с вариабельной областью тяжелой цепи IC17HdK (SEQ ID NO: 152), получение которых описано в контрольном примере 7-1 в качестве контрольного антитела для сравнения агонистической активности. Кроме того, представляющее интерес антитело (IC17HdK-G4d/IC17L-k0) экспрессируют и очищают способами, известными в данной области, путем комбинирования гена легкой цепи антитела IC17L-k0 (SEQ ID NO: 158, вариабельная область; SEQ ID NO: 141, константная область) с геном тяжелой цепи антитела IC17HdK-G4d, который получают путем комбинирования гена вариабельной области тяжелой цепи IC17HdK (SEQ ID NO: 152) с геном G4d (SEQ ID NO: 159), из которого удалены Gly и Lys на C-конце константной области тяжелой цепи IgG4 человека. Эти контрольные антитела использовали в контрольном примере 5.

(7-4) Оценка связывания рецептора Fcγ человека вариантов с повышенным показателем pI путем аминокислотной модификации константной области

Программное обеспечение Biacore T200 (фирма GE Healthcare) используют для оценки связывающей активности с соответствующим рецептором Fcγ человека (далее именуемым FcγR). Измерение выполняют при 25°C с использованием буфера, включающего 50 мМ фосфата, 150 мМ NaCl, 0,05 мас./об.% -P20, pH 7,4. Около 1000 RU антитела захвачено сенсорным чипом, иммобилизованным с CaptureSelect ™ Human Fab-lambda Kinetics Biotin Conjugate (фирма Thermo Fisher Scientific) в качестве молекулы для захвата лиганда. FcγR человека разбавляют до 8 нМ для FcγRIa и 1000 нМ для другого FcγR в буфере для измерения, после чего он взаимодействует с захваченным антителом. Связывающую активность каждого антитела с FcγR оценивают путем расчета связывающего количества FcγR (RU) на единицу количества антитела с использованием Biacore T200 Evaluation Software 2,0.

Внеклеточный домен FcγR получают описанными ниже методами. Во-первых, генный синтез внеклеточного домена FcγR осуществляют методом, известным специалистам в данной области. При этом последовательности FcγR получают на основе данных, зарегистрированных NCBI. В частности, последовательность FcγRI получают на основе последовательности из базы данных NCBI NM_000566.3, последовательность FcγRIIa на основе последовательности из базы данных NCBI NM_001136219.1, последовательности FcγRIIb на основе последовательности из базы данных NCBI NM_004001.3 и последовательности FcγRIIIa на основе последовательности из базы данных NCBI NM_001127593.1; и к их С-концам добавлена метка His. Полиморфный сайт FcγRIIa получают со ссылкой на публикацию *J. Exp. Med.*, 172, 1990, 19-25; и полиморфный сайт FcγRIIIa получают со ссылкой на публикацию *J. Clin. Invest.*, 100, 1997, 1059-1070. Полученные в результате фрагменты генов инсертируют в вектор экспрессии клеток животных для получения векторов экспрессии. Полученные векторы экспрессии временно вводят в клетки FreeStyle293, полученные из клеток эмбриональной почки человека (фирма Invitrogen), после чего экспрессируются представляющие интерес белки. Культуральные супернатанты собирают, пропускают через фильтр с порами 0,22 мкм и очищают в основном за четыре этапа, описанные ниже. Первый этап выполняют с помощью катионообменной колоночной хроматографии (SP Sepharose FF), второй этап – с помощью аффинной колоночной хроматографии (HisTrap HP) для His-метки, третий этап – с помощью гель-фильтрационной колоночной хроматографии (Superdex200), а четвертый этап - с помощью стерилизующей фильтрации. Однако для FcγRI на первом этапе проводят анионообменную колоночную хроматографию с Q Sepharose FF. Концентрации очищенных белков рассчитывают путем измерения адсорбции при 280 нм с помощью спектрофотометра, а коэффициенты адсорбции рассчитывают из полученных значений методами PACE с соавт. (*Protein Science*, 4, 1995, 2411-2423).

Табл. 73 показывает связывающееся количество на единицу количества антитела, а также количество относительно связывающегося количества A375-G1T3/B167-Lamlib. Все антитела в табл. 73 показывают большее связывающее количество с FcγRIIb человека на единицу количества антитела, чем у A375-G1T3/B167-Lamlib, и относительное значение составляет 2,85-14,26, тогда как связывающееся количество A375-G1T3/Значение B167-Lamlib с FcγRIIb человека установлено равным 1,0. Количество FcγRIIb человека, связывающееся с единицей количества антитела, и относительные связывающиеся количества были аналогичными в присутствии или в отсутствие аминокислотных модификаций для увеличения pI константной области. Кроме того, связывающееся количество антител, содержащих модификацию L235W, с hFcgRIa снижено по сравнению с таковым для A375-TT14/B167-Lamlib.

Таблица 73. Связывающая активность каждого из FcγR человека.

Аббревиатура	Связывающееся количество на 1 RU антитела (RU)						Относительное связанное количество				
	hFcgRIa	hFcgRIIaH	hFcgRIIaR	hFcgRIIb	hFcgRIIIaF	hFcgRIIIaV	hFcgRIIaH	hFcgRIIaR	hFcgRIIb	hFcgRIIIaF	hFcgRIIIaV
A375-G1T3/B167-Lamlib	0.0813	0.0567	0.0463	0.0110	0.0213	0.0700	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
A375-MY201a/B167-Lamlib	0.0396	0.0534	0.0338	0.0401	0.0007	0.0024	0.94	0.73	3.66	0.04	0.03
A375-MY201aPh/B167-Lamlib	0.0040	0.0328	0.0335	0.0313	0.0007	0.0011	0.58	0.72	2.85	0.03	0.02
A375-MY518/B167-Lamlib	0.0020	0.0466	0.0460	0.0482	0.0009	0.0015	0.82	0.99	4.40	0.04	0.02
A375-MY518a/B167-Lamlib	0.0033	0.0479	0.0470	0.0489	0.0006	0.0009	0.84	1.01	4.46	0.03	0.01
A375-TT11/B167-Lamlib	0.0075	0.0020	0.0041	0.0477	-0.0009	-0.0010	0.03	0.09	4.35	-0.04	-0.01
A375-TT14/B167-Lamlib	0.0045	0.0042	0.0067	0.0805	0.0000	0.0003	0.07	0.14	7.34	0.00	0.00
A375-TT16/B167-Lamlib	0.0034	0.0126	0.0359	0.1090	0.0001	-0.0002	0.22	0.77	9.94	0.00	0.00
A375-P587/B167-Lamlib	0.0962	0.0029	0.0371	0.1427	0.0001	0.0001	0.05	0.80	13.02	0.00	0.00
A375-P253/B167-Lamlib	0.0937	0.0497	0.1678	0.1563	0.0056	0.0019	0.88	3.62	14.26	0.26	0.03
A375-SCF025/B167-Lamlib	0.0022	0.0514	0.0519	0.0512	0.0012	0.0014	0.91	1.12	4.67	0.06	0.02
A375-SCF025a/B167-Lamlib	0.0021	0.0514	0.0518	0.0511	0.0009	0.0016	0.91	1.12	4.67	0.04	0.02
A375-SCF027/B167-Lamlib	0.0044	0.0031	0.0058	0.0766	-0.0005	-0.0006	0.06	0.12	6.99	-0.02	-0.01
A375-SCF028/B167-Lamlib	0.0027	0.0101	0.0299	0.0995	-0.0009	-0.0010	0.18	0.64	9.08	-0.04	-0.01
A375-SCF030/B167-Lamlib	0.0020	0.0533	0.0532	0.0532	0.0017	0.0020	0.94	1.15	4.85	0.08	0.03
A375-SCF032/B167-Lamlib	0.0049	0.0030	-0.0004	0.0782	-0.0007	-0.0007	0.05	-0.01	7.14	-0.03	-0.01
A375-SCF033/B167-Lamlib	0.0033	0.0103	0.0255	0.0979	0.0000	0.0002	0.18	0.55	8.94	0.00	0.00
A375-SCF039/B167-Lamlib	0.0018	0.0535	0.0542	0.0531	0.0008	0.0013	0.94	1.17	4.85	0.04	0.02
A375-SCF039a/B167-Lamlib	0.0018	0.0542	0.0554	0.0540	0.0012	0.0013	0.96	1.20	4.93	0.06	0.02
A375-SCF040/B167-Lamlib	0.0016	0.0454	0.0446	0.0465	0.0010	0.0013	0.80	0.96	4.24	0.05	0.02
A375-SCF041a/B167-Lamlib	0.0446	0.0571	0.0376	0.0433	0.0009	0.0022	1.01	0.81	3.95	0.04	0.03
A375-SCF042a/B167-Lamlib	0.0396	0.0522	0.0327	0.0393	0.0003	0.0014	0.92	0.71	3.59	0.01	0.02
A375-SCF043a/B167-Lamlib	0.0429	0.0552	0.0361	0.0419	0.0011	0.0025	0.97	0.78	3.82	0.05	0.04
A375-SCF056a/B167-Lamlib	0.0395	0.0529	0.0331	0.0399	0.0011	0.0023	0.93	0.71	3.64	0.05	0.03
A375-SCF057a/B167-Lamlib	0.0405	0.0525	0.0367	0.0412	0.0013	0.0025	0.93	0.79	3.76	0.06	0.04
A375-SCF059a/B167-Lamlib	0.0380	0.0502	0.0319	0.0358	0.0010	0.0021	0.88	0.69	3.27	0.05	0.03
A375-SCF060a/B167-Lamlib	0.0021	0.0463	0.0459	0.0472	0.0011	0.0008	0.82	0.99	4.31	0.05	0.01
A375-SCF041aPh/B167-Lamlib	0.0013	0.0371	0.0371	0.0350	0.0007	0.0005	0.65	0.80	3.20	0.03	0.01
A375-SCF043aPh/B167-Lamlib	0.0011	0.0349	0.0349	0.0339	0.0001	0.0001	0.62	0.75	3.10	0.00	0.00
A375-SCF056aPh/B167-Lamlib	0.0019	0.0314	0.0299	0.0292	0.0010	0.0010	0.55	0.64	2.67	0.05	0.01
A375-SCF057aPh/B167-Lamlib	0.0021	0.0365	0.0364	0.0345	-0.0003	0.0005	0.64	0.79	3.15	-0.02	0.01
A375-SCF059aPh/B167-Lamlib	0.0089	0.0332	0.0319	0.0291	0.0003	0.0028	0.59	0.69	2.66	0.01	0.04

(7-5) Оценка связывания FcRn человека у вариантов с увеличенным показателем pI путем аминокислотной модификации константной области

Программное обеспечение Biacore T200 (фирма GE Healthcare) используют для оценки связывающей активности с FcRn человека. Измерения выполняют при 25°C с использованием буфера, включающего 50 мМ фосфата, 150 мМ NaCl, 0,05 мас./об.% -P20, pH 6,0. Белки FcRn человека, используемые для этого определения, получены в соответствии с процедурой, описанной в WO2010107110. Около 400 RU антитела захвачено с использованием иммобилизованного CaptureSelect ™ Human Fab-lambda Kinetics Biotin Conjugate сенсорного чипа (фирма Thermo Fisher Scientific) в качестве молекулы для захвата лиганда с последующим связыванием FcRn человека, разведенного в буфере для измерений. Активность соответствующих антител по связыванию FcRn оценивают путем расчета KD (моль/л) с помощью стационарной модели с использованием Biacore T200 Evaluation Software 2,0. Значения KD были близкими в присутствии или в отсутствие аминокислотных модификаций для увеличения pI константной области. В табл. 74 представлена величина KD (моль/л) соответствующих антител к FcRn человека.

Таблица 74.

Аббревиатура	K_D (моль/л)
A375-G1T3/B167-Lamlib	1.27E-06
A375-MY201a/B167-Lamlib	1.19E-06
A375-MY201aPh/B167-Lamlib	1.18E-06
A375-MY518/B167-Lamlib	1.27E-06
A375-MY518a/B167-Lamlib	1.32E-06
A375-TT11/B167-Lamlib	1.56E-06
A375-TT14/B167-Lamlib	1.77E-06
A375-TT16/B167-Lamlib	1.51E-06
A375-P587/B167-Lamlib	1.70E-06
A375-P253/B167-Lamlib	1.42E-06
A375-SCF025/B167-Lamlib	1.10E-06
A375-SCF025a/B167-Lamlib	1.13E-06
A375-SCF027/B167-Lamlib	1.33E-06
A375-SCF028/B167-Lamlib	1.27E-06
A375-SCF030/B167-Lamlib	8.63E-07
A375-SCF032/B167-Lamlib	9.66E-07
A375-SCF033/B167-Lamlib	8.74E-07
A375-SCF039/B167-Lamlib	1.09E-06
A375-SCF039a/B167-Lamlib	1.11E-06
A375-SCF040/B167-Lamlib	1.46E-06
A375-SCF041a/B167-Lamlib	1.10E-06
A375-SCF042a/B167-Lamlib	1.49E-06
A375-SCF043a/B167-Lamlib	1.18E-06
A375-SCF056a/B167-Lamlib	9.56E-07
A375-SCF057a/B167-Lamlib	9.28E-07
A375-SCF059a/B167-Lamlib	1.03E-06
A375-SCF060a/B167-Lamlib	1.01E-06
A375-SCF041aPh/B167-Lamlib	1.13E-06
A375-SCF043aPh/B167-Lamlib	1.21E-06
A375-SCF056aPh/B167-Lamlib	1.00E-06
A375-SCF057aPh/B167-Lamlib	9.09E-07
A375-SCF059aPh/B167-Lamlib	1.05E-06

Контрольный пример 8. Оценка *in vitro* АТФ- и АДФ-зависимой CD137 агонистической активности модифицированных антител против CD137 человека с использованием анализа репортерного гена 4-1BB Jurkat

GloResponse™ NF-κB Luc2/4-1BB Jurkat линию клеток (фирма Promega, CS196004) используют для применения *in vitro* активности вариантов, полученных в примере 7-2 (табл. 72). В каждую лунку 384-луночных планшетов добавляют по 10 мкл каждой из клеток FcγRIIB CHO-K1 (фирма Promega), приготовленных в концентрации 4 × 10^5/мл в среде для анализа (99% RPMI, 1% ФСБ). Затем в каждую лунку добавляют 10 мкл раствора антитела, содержащего АДФ, или раствора антитела, содержащего АТФ, или раствора антитела без АТФ или без АДФ. Затем в каждую лунку добавляют 10 мкл клеточной линии GloResponseTM NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat, приготовленной в концентрации 2 × 10^6/мл в среде для анализа (99% RPMI, 1% ФСБ). Конечная концентрация АДФ составляет 10 мкМ, конечная концентрация АТФ составляет 10 мкМ. Планшеты оставляют на 6 ч при 37°C в инкубаторе с 5% CO_2 и 15 мин при комнатной температуре; 30 мкл реагента Bio-Glo добавляют в каждую лунку. Для реагента Bio-Glo используют систему анализа люциферазы Bio-Glo (буфер и субстрат). Затем количество люминесценции в каждой лунке измеряют с помощью планшет-ридера. Величину люминесценции каждой лунки, деленную на величину люминесценции лунки без добавления антитела, определяют как «относительную световую единицу» (кратная индукция), которая служит индикатором оценки агонистической активности в отношении CD137 каждого антитела.

Результаты представлены на фиг. 78. На фиг. 78 приводят подтверждение, что A375-P587/B167-LamLib, A551-P587/B256-LamLib, A551-P587/B379-LamLib, A375-SCF041aPh/B167-LamLib, A551-SCF041aPh/B256-LamLib, A551-SCF041aPh/B379-LamLib, A375-SCF043aPh/B167-LamLib, A551-SCF043aPh/B256-LamLib, A551-SCF043aPh/B379-LamLib, A375-SCF057aPh/B167-LamLib, A551-SCF057aPh/B256-LamLib и A551-SCF057aPh/B379-LamLib проявляют агонистическую активность в отношении CD137 человека АТФ- и АДФ-зависимым образом.

Контрольный пример 9. Повышение агонистической активности модифицированными анти-CD137 антителами

(9-1) Получение антител для оценки

Что касается случая, когда различные модификации аминокислот для увеличения pI были введены в константную область тяжелой цепи с повышенной активностью связывания с FcγRIIb, оценивают влияние таких модификаций аминокислот на активность агониста CD137 и на кинетику плазмы и эффективность лекарственного средства в hCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg #

90. Во-первых, как описано в контрольном примере 7-1, контрольном примере 7-2 и контрольном примере 7-3, получают A375-MY201aPh / B167-Lamlib, A375-SCF041aPh / B167-Lamlib, A375-SCF057aPh / B167-Lamlib и IC17HdK-MY201aPh / IC17L-k0.

(9-2) Оценка *in vitro* АТФ-зависимой агонистической активности CD137 модифицированных антител против CD137 человека с использованием анализа репортерного гена 4-1BB Jurkat

Что касается случая, когда различные модификации аминокислот для увеличения pI введены в константную область тяжелой цепи с повышенной активностью связывания с FcγRIIb, чтобы оценить влияние таких модификаций аминокислот на активность агониста CD137 оценивают активность агониста CD137 A375-MY201aPh/B167-Lamlib, A375-SCF041aPh/B167-Lamlib, A375-SCF057aPh/B167-Lamlib и IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0.

Клеточную линию GloResponseTM NF-κB-Luc2 / 4-1BB Jurkat (фирма Promega, CS196004) используют для измерения активности вырабатываемых антител *in vitro*. В каждую лунку 96-луночного планшета добавляют 200 мкл клеток FcγRIIB CHO-K1 (фирма Promega), приготовленных в концентрации 5 × 10^4/мл с культуральной средой, и планшет оставляют на ночь в инкубаторе в атмосфере 5% CO_2 при 37°C. В качестве питательной среды используют культуральную среду CHO (90% Ham's F12, 10% ФСБ). Затем всю культуральную среду удаляют отсасыванием, после чего 25 мкл клеточной линии GloResponseTM NF-κB-Luc2 / 4-1BB Jurkat, приготовленной с концентрацией 2 × 10^6 клеток/мл со средой для анализа (99% RPMI, 1% ФСБ) добавляют в каждую лунку. Затем добавляют 25 мкл каждого из растворов антител, разбавленных аналитической средой до конечной концентрации 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 и 10 мкг/мл. Потом добавляют 25 мкл раствора АТФ, разбавленного аналитической средой до конечной концентрации 250 мкМ. Планшет оставляют на 6 ч в инкубаторе в атмосфере 5% CO_2 при 37°C, а затем оставляют на 15 мин при комнатной температуре, и в каждую лунку добавляют 75 мкл реагента Bio-Glo. Для реагента Bio-Glo используют систему анализа люциферазы Bio-Glo (буфер и субстрат). После этого с помощью планшет-ридера определяют относительную световую единицу каждой лунки. Величину люминесценции в каждой лунке, деленную на величину люминесценции в лунке без добавления антител, определяют как «относительную световую единицу», и она служит индикатором для оценки активности агониста CD137 каждого антитела.

Результаты показаны на фиг. 79. Результаты показывают, что агонистическая активность CD137 увеличивается путем введения различных модификаций аминокислот для увеличения pI.

(9-3) Фармакокинетическое исследование на мышах модифицированных антител против CD137 человека

(9-3-1) Получение мыши hCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg # 90

Сначала получают мышь с нокином CD137 человека, в которой ген CD137 мыши заменен геном CD137 человека, путем введения вектора замены гена CD137 человека в эмбриональные стволовые клетки мыши (ES-клетки) вместе с нуклеазой цинкового пальца (ZFN), который нацелен на CD137 мыши. Затем мРНК ZFN, нацеленную на ген Fcgr2b мыши, путем микроинъекции вводят оплодотворенным яйцеклеткам мышей, и мышей с нокаутом Fcgr2b получают путем отбора мышей, которым была введена мутация в целевой сайт. Кроме того, вектор BAC, в котором клонирован ген FCGR2B человека, путем микроинъекции вводят оплодотворенным яйцеклеткам мышей, и путем отбора из мышей, полученных из этих клеток, тех, у которых была введена область генома гена FCGR2B человека, получают трансгенную мышь с FCGR2B человека (Iwayanagi. с соавт., *J Immunol*, 195, 2015, 3198-3205).

Путем скрещивания мышей трех вышеуказанных линий получают «трансгенную мышь с нокином Fcgr2b CD137 человека и нокаутом FCGR2B человека». Эту мышь обозначают как мышь hCD137KI / mFcγR2bKO / hFcγR2bTg # 90.

(9-3-2) Измерение концентрации антитела против CD137 человека в плазме модельных мышей hCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90

Соответствующие антитела против CD137 человека вводят внутривенно в виде однократной дозы мышам hCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90, как показано в табл. 75. Кровь собирают несколько раз в течение времени от 5 мин до 28 дней после введения. Полученную кровь центрифугируют для отделения плазмы. Плазму хранят в морозильной камере при температуре ниже -20°C до проведения измерения.

Таблица 75.

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза (мг/кг)
1	3	A375-MY201aPh/ B167-Lamlib	7,5 Однократное введение
2	3	A375-SCF041aPh/ B167-Lamlib	7,5 Однократное введение

Концентрацию в плазме каждого антитела против CD137 человека измеряют методом электрохемилюминесценции (ECL, electrochemiluminescence). hCD137 (фирма Sino Biological Inc.) разбавляют ФСБ (-) и добавляют в 96-луночный планшет MULTI-ARRAY (фирма Meso Scale Diagnostics, LLC). Планшет с добавлением hCD137 встряхивают в течение 1 ч при комнатной температуре, и hCD137 иммобилизуют на планшете. Затем для блокирования добавляют раствор ФСБ, содержащий 1 мМ АДФ, 1% БСА и 0,05% Tween-20, и планшет встряхивают в течение 1 ч при комнатной температуре. Калибровочные кривые для соответствующих антител против CD137 человека построены при концентрациях в плазме 640, 320, 160, 80, 40, 20 и 10 нг/мл. Образцы плазмы, разбавленные раствором ФСБ, содержащим 1 мМ АДФ, 1% БСА и 0,05% Tween-20, и образцы для калибровочной кривой добавляют в планшет с иммобилизованным hCD137. Затем планшет встряхивают в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем в качестве вторичного антитела добавляют антитело, описанное в WO 2019112027, которое специфически распознает константные области антител против CD137 человека. Планшет дополнительно встряхивают в течение 1 ч при комнатной температуре и затем добавляют в него меченые SULFO-TAG козьи анти-кроличьи антитела (фирма Meso Scale Diagnostics, LLC). Планшет дополнительно встряхивают в течение 1 ч при комнатной температуре и затем добавляют к нему меченые SULFO-TAG козьи анти-кроличьи антитела (фирма Meso Scale Diagnostics, LLC), разведенные двукратно и добавляют 1 мМ АДФ. Концентрацию каждого антитела в плазме мыши измеряют путем обнаружения SULFO-TAG с помощью SECTOR Imager (фирма Meso Scale Diagnostics, LLC). Концентрацию каждого антитела в плазме мыши рассчитывают с помощью SOFTmax PRO (фирма Molecular Devices).

Результаты показаны на фиг. 80. A375-SCF041aPh/B167-Lamlib демонстрирует более быструю элиминацию чем A375-MY201aPh/B167-Lamlib. Считается, что это связано с тем, что константная область тяжелой цепи A375-

SCF041aPh/B167-Lamlib введена с аминокислотными модификациями, которые увеличивают pI.

(9-4) Оценка лекарственной эффективности модифицированных антител против CD137 человека у мышей

(9-4-1) Получение клеточных линий и мышиной модели, трансплантированной сингенной опухолевой линией

Используют клетки LLC1/OVA/GPC3 клон C5, полученных путем интродукции плазмид экспрессии куриного овальбумина (OVA) и человеческого глипикана-3 (GPC3) в клетки рака легких мыши, полученные из клеточной линии LLC1 [LL/2 (обозначение: LLC1), дистрибьютор: фирма ATCC, номер в каталоге: CRL-1642]. Использовали мышь hCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90 (возраст 11 недель, самка), описанную выше в (19-3-1). Клеточную линию LLC1/OVA/GPC3 поддерживают и пассируют в среде RPMI1640 (фирма Sigma-Aldrich, Co. LLC.), содержащей 9,8% фетальной бычьей сыворотки (фирма Sigma-Aldrich, Co. LLC.), 0,44 мг/мл G418 (фирма Nacalai Tesque, Inc.) и 0,88 мг/мл зеоцина (фирма Thermo Fisher Scientific, Inc.). Клеточную линию LLC1/OVA/GPC3 трансплантируют подкожно в брюшную полость мыши, и считают, что модель сформировалась, когда объем опухоли достигал примерно 250-500 мм^3. После формирования модели мышей с трансплантированной клеточной линией LLC1/OVA/GPC3 группируют и затем вводят носитель и соответствующие антитела против CD137 человека.

(9-4-2) Приготовление и введение фармацевтических агентов, предназначенных для введения, и измерения опухолей

A375-MY201aPh/B167-Lamlib или A375-SCF041aPh /B167-Lamlib, приготовленные в дозировках, указанных в табл. 76, с ФСБ, содержащим 0,05% Tween-20, вводят в модель с трансплантированной клеточной линией LLC1/OVA/GPC3 на 11-е и 14-е сутки после трансплантации опухоли. ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20, вводят в группе контроля. Приготовленную жидкость для введения вводят в дозе 10 мл/кг в хвостовую вену.

Таблица 76. Измерение противоопухолевого действия в модели трансплантации клеточной линии LLC1/OVA/GPC3

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза	Способ введения	День введения
1	5	ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20	-	Хвостовая вена	11 день и 14 день после трансплантации

Группа	Число животных	Фармацевтический агент	Доза	Способ введения	День введения
2	5	A375-MY201aPh/ B167-Lamlib	2,50 мг/кг	Хвостовая вена	11 день и 14 день после трансплантации
3	5	A375-SCF041aPh/ B167-Lamlib	2,50 мг/кг	Хвостовая вена	11 день и 14 день после трансплантации

Для оценки противоопухолевого эффекта объем опухоли измеряют с частотой 1–2 раза в неделю. Объем опухоли рассчитывают по следующему уравнению:

Объем опухоли (мм^3) = длина (мм) × ширина (мм) × ширина (мм)/2

В итоге результаты контрольного примера (9-3-2) показывают, что изменение концентрации в крови у мышей, которым вводили A375-SCF041aPh/B167-Lamlib, меньше по сравнению с таковым для мышей, получавших A375-MY201aPh/B167-Lamlib; однако A375-SCF041aPh/B167-Lamlib проявляет усиленный противоопухолевый эффект по сравнению с A375-MY201aPh/B167-Lamlib (фиг. 81).

Основываясь на приведенных выше результатах в настоящей мышиной модели, противоопухолевый эффект антитела против CD137 человека было усилено путем введения аминокислотных модификаций, которые повышают pI константной области тяжелой цепи.

Вышеупомянутое изобретение подробно описано с примерами и иллюстрациями в целях содействия ясному пониманию, и приведенные в настоящем описании сведения и иллюстрации не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Все цитируемые патенты и научные публикации, приведенные в настоящем изобретении, включены в него в виде ссылок.

Промышленная применимость

Противораковые средства, содержащие анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента, комбинированная терапия с использованием такого противоракового средства, содержащего анти-CD137 антигенсвязывающий домен в качестве активного ингредиента, и другое противораковое средство в комбинации, фармацевтические композиции для использование в такой комбинированной терапии и т.п. применимы к разработке, производству, предоставлению и использованию фармацевтических препаратов, которые обладают эффектом активации иммунных клеток, цитотоксическим эффектом или противоопухолевым действием, но имеют слабое воздействие на неиммунные клетки, такие как нормальные ткани, и небольшое проявление побочных эффектов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Противораковое средство, содержащее в качестве активного ингредиента анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу, содержащую любую комбинацию HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, выбранную из представленных ниже (а)-(н):

(а) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(б) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(в) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(г) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(д) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(е) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28;

(ж) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29;

(з) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(и) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(к) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(л) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и

HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(м) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и

(н) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

2. Противораковое средство, содержащее анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу, содержащую любую комбинацию VH и LH, выбранную из представленных ниже (а)-(н):

(а) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54;

(б) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;

(в) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;

(г) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54;

(д) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54;

(е) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

(ж) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57;

(з) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

(и) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59;

(к) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60;

(л) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60;

(м) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59; и

(н) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54.

3. Противораковое средство по п.п. 1 или 2, в котором анти-CD137 антигенсвязывающая молекула является антителом человека, гуманизированным антителом, химерным антителом или антигенсвязывающим фрагментом любого из них.

4. Противораковое средство по п.п. 1-3, в котором анти-CD137 антигенсвязывающая молекула содержит измененную Fc-область, причем измененная Fc-область содержит любую комбинацию измененных аминокислот, выбранную из следующих комбинаций по нумерации EC:

L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K;

K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K;

L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/P343R/D413K;

L234Y/P238D/V264I/A330K/P343R/D413K;

L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/P343R/D413K;

L234Y/G237D/P238D/A330K/P343R/D413K;

L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R/P343R;

L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/Q311R/P343R;

L234Y/P238D/V264I/A330K/Q311R/P343R;

L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/Q311R/P343R;

L234Y/G237D/P238D/A330K/Q311R/P343R;

L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R;

K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R;

L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/D413K;

K214R/G236N/H268D/A330K/P343R;

K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R;

K214R/G236N/H268D/A330K/D413K;

K214R/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K;

K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K;

K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R;

K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R;

K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R;

K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R;

K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K;

K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K; и

K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R.

5. Противораковое средство, содержащее анти-CD137 антигенсвязывающую молекулу, которая содержит любую комбинацию VH, VL, CH и CL, выбранную из представленных ниже (i)-(xxxviii):

(i) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(ii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(iii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(iv) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(v) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(vi) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(vii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(viii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(ix) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(x) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xi) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xiii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, VL,

содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xiv) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xv) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xvi) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xvii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xviii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xix) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xx) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxi) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxiii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxiv) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxv) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxvi) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxvii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxviii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxix) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxx) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, VL,

содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxxi) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxxii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxxiii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxxiv) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxxv) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxxvi) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxxvii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

(xxxviii) VH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, CH, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, VL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и CL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63.

6. Противораковое средство по любому из п.п. 1-5, которое предназначено для введения онкологическому пациенту, у которого имеется (i) солидный рак, инфильтрированный одной или несколькими клетками, выбранными из B-клеток, дендритных клеток, природных клеток-киллеров, макрофагов и $CD8^+$ T-клеток и/или (ii) солидный рак, инфильтрированный регуляторными T-клетками (Treg) или $CD4^+$ T-клетками.

7. Противораковое средство по любому из п.п. 1-6, которое предназначено для введения онкологическому пациенту, у которого имеется рак, резистентный к лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа.

8. Противораковое средство по любому из п.п. 1-7, которое предназначено для введения онкологическому пациенту, у которого имеется один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, рака головы и шеи, рака пищевода, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака яичников, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака почки, рака кожи, опухоли мышц, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака семенников, рака матки, холангиокарциномы, карциномы из клеток Меркеля, рака мочевого пузыря, рака щитовидной железы, шванномы, рака надпочечников, рака анального канала, опухоли центральной нервной системы, опухоли нейроэндокринной ткани, рака полового члена, опухоли плевры, опухоли слюнной железы, рака вульвы, тимомы, лимфомы, миелоидного лейкоза и детского рака.

9. Противораковое средство по любому из п.п. 1-5 для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противораковым средством.

10. Противораковое средство по п. 9, отличающееся тем, что другое противораковое средство представляет собой по меньшей мере одно противораковое средство, выбранное из химиотерапевтического средства, активирующего T-клетки агониста, ингибитора контрольной точки иммунного ответа, перенаправляющей T-клетки антигенсвязывающей молекулы, антифиброзного средства и ингибитора ангиогенеза.

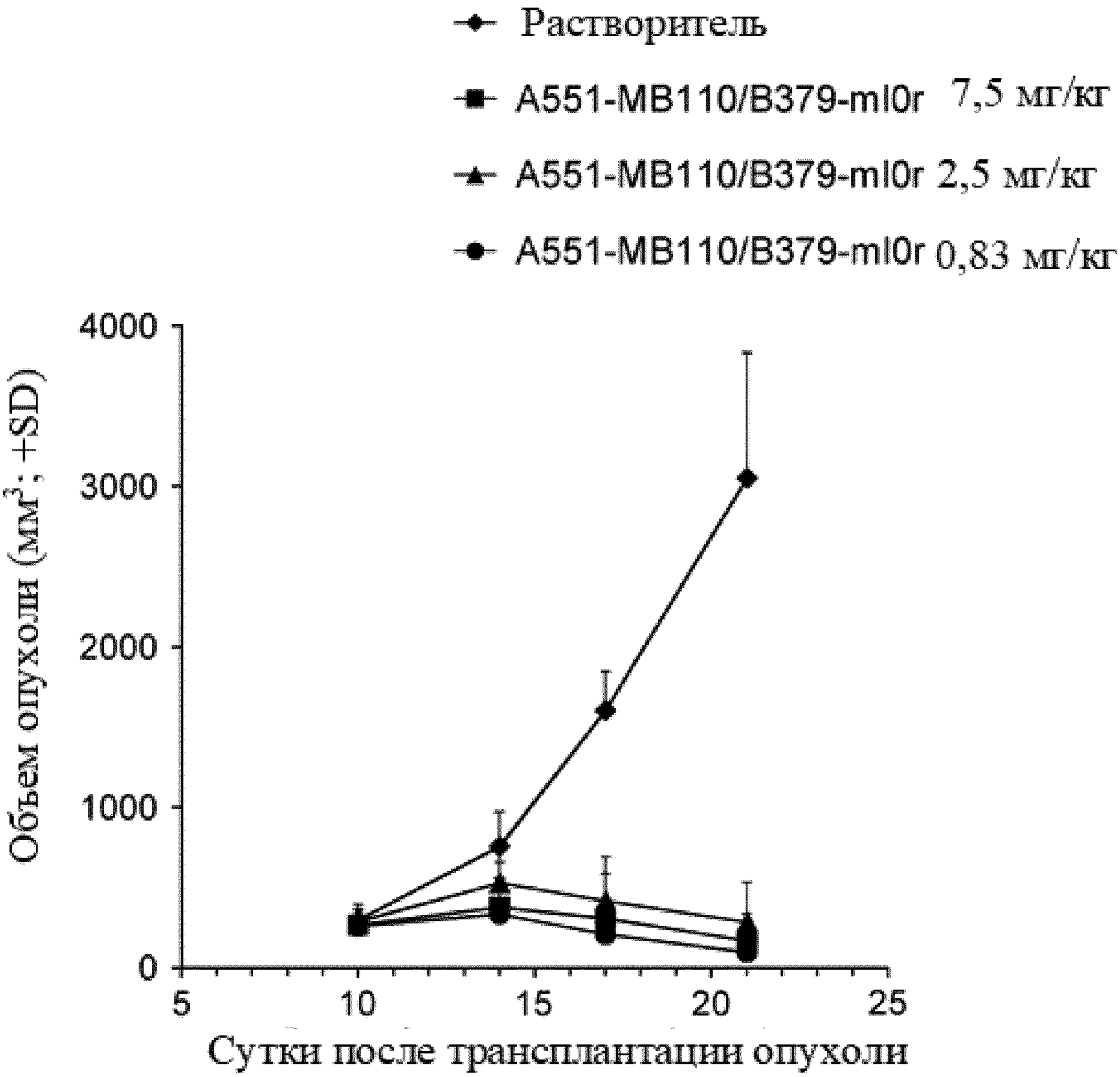
11. Противораковое средство по п. 10, отличающееся тем, что другое противораковое средство представляет собой ингибитор контрольной точки иммунного ответа.

12. Противораковое средство по п.п. 10 или 11, отличающееся тем, что другое противораковое средство представляет собой по меньшей мере один ингибитор контрольной точки иммунного ответа, выбранный из анти-PD1 антитела, анти-PDL1 антитела, анти-TIGIT антитела, анти-TIM3 антитела и анти-LAG3 антитела.

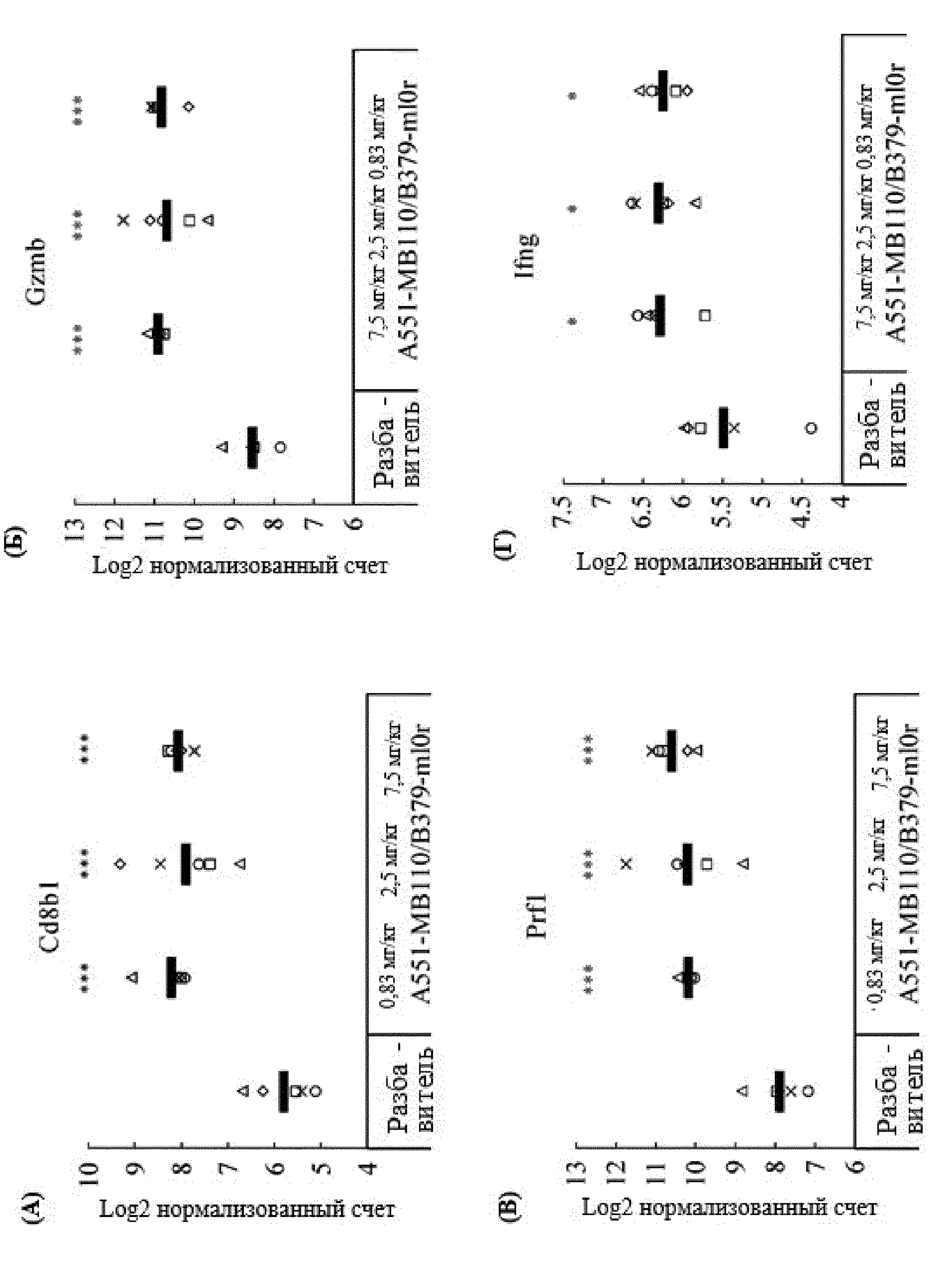
13. Противораковое средство по п. 10, отличающееся тем, что другое противораковое средство представляет собой перенаправляющую Т-клетки антигенсвязывающую молекулу.

14. Противораковое средство по п. 9, отличающееся тем, что другое противораковое средство представляет собой средство, которое истощает и/или инактивирует одну или несколько клеток, выбранных из регуляторных Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток, В-клеток, NK-клеток и макрофагов.

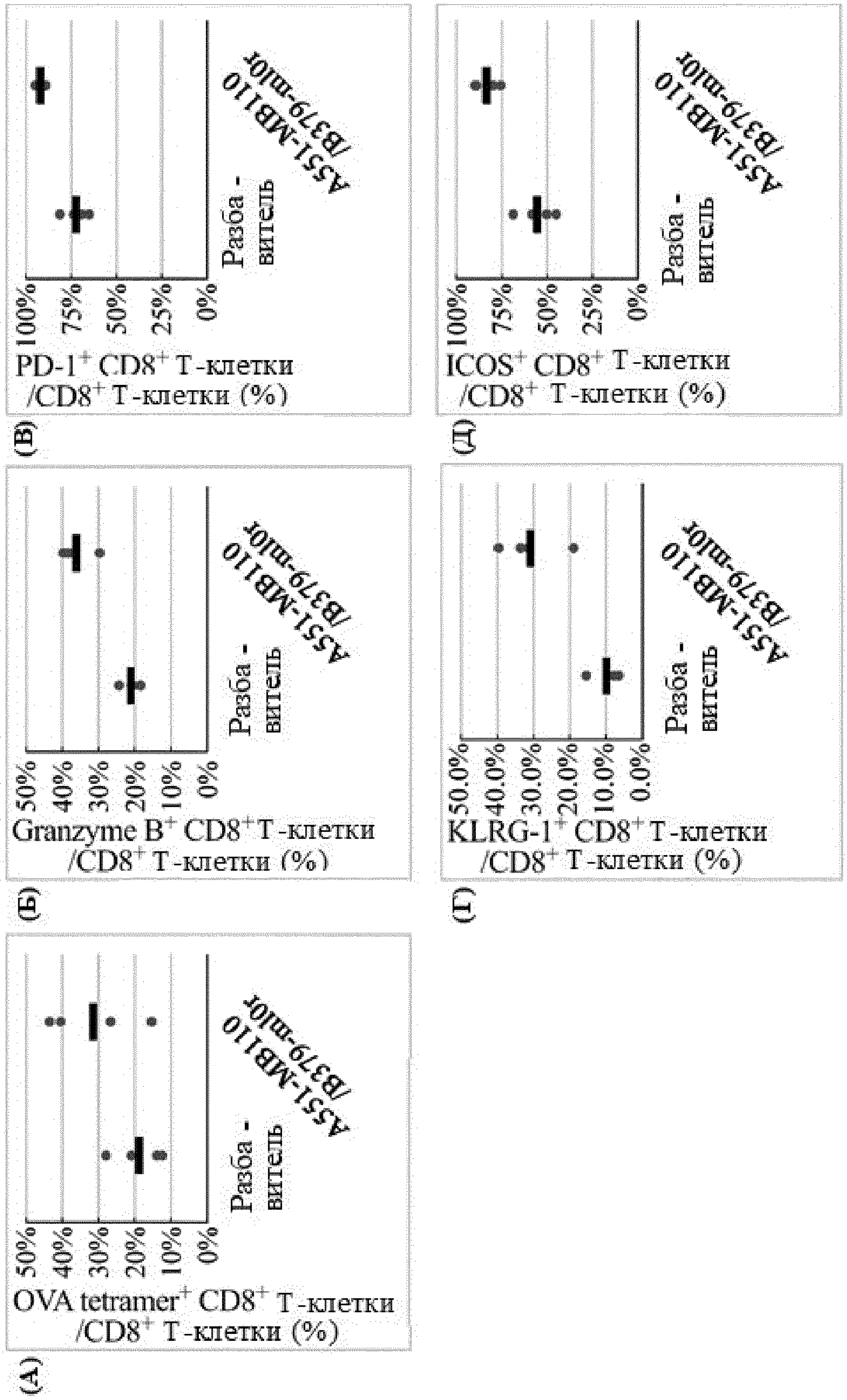
15. Противораковое средство по любому из п.п. 9-14, которое предназначено для введения онкологическому пациенту, у которого имеется один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака желудка, рака головы и шеи, рака пищевода, колоректального рака, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака яичников, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака почки, рака кожи, опухоли мышц, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака семенников, рака матки, холангиокарциномы, карциномы из клеток Меркеля, рака мочевого пузыря, рака щитовидной железы, шванномы, рака надпочечников, рака анального канала, опухоли центральной нервной системы, опухоли нейроэндокринной ткани, рака полового члена, опухоли плевры, опухоли слюнной железы, рака вульвы, тимомы, лимфомы, миелоидного лейкоза и детского рака.


Растворитель
A551-MB110/B379-ml0r 7,5 мг/кг
A551-MB110/B379-ml0r 2,5 мг/кг
A551-MB110/B379-ml0r 0,83 мг/кг
4000
3000
2000
1000
0
5
10
15
20
25
Объем опухоли (мм³; +SD)
Сутки после трансплантации опухоли

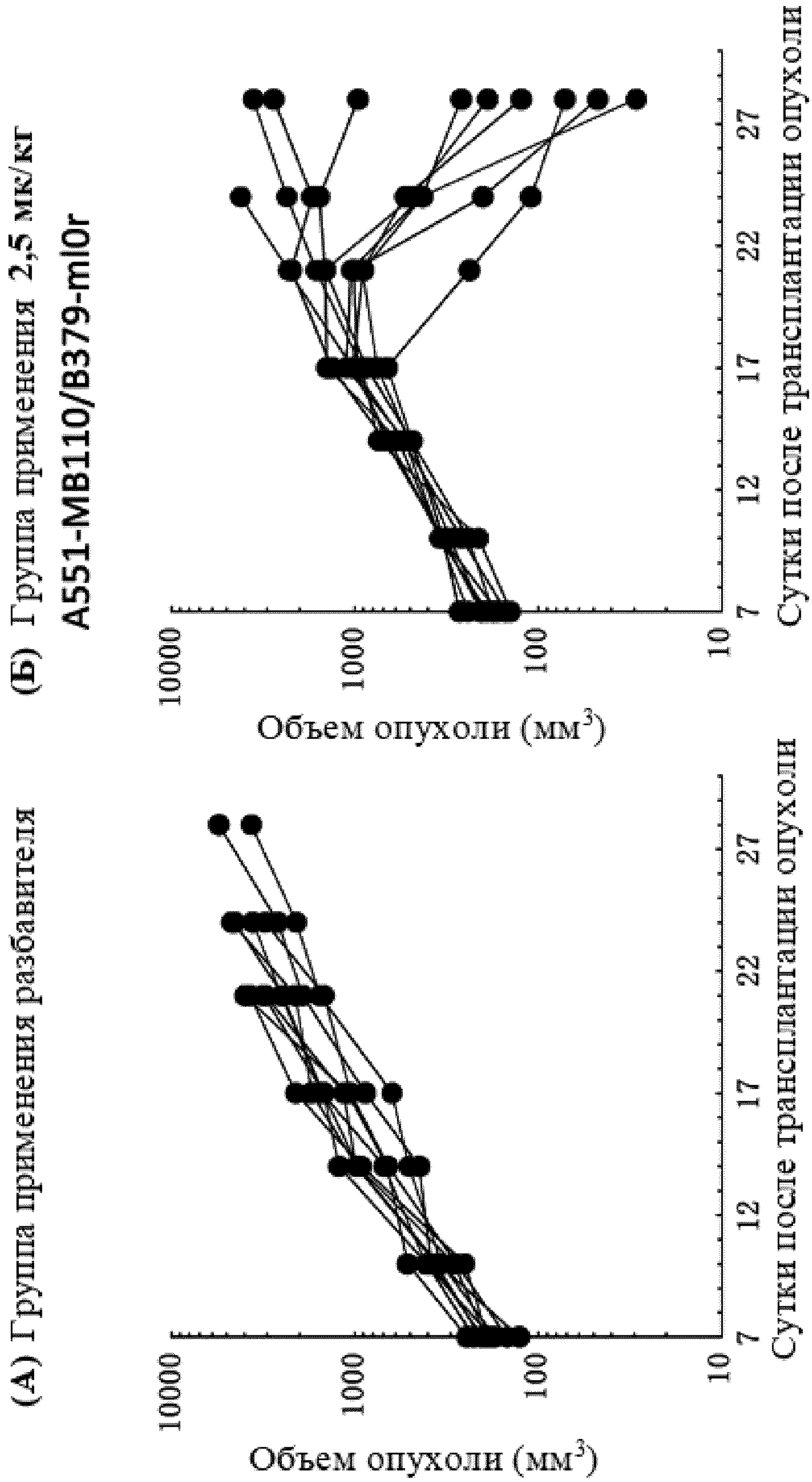
Фигура 1.


(А)
Cd8b1
Log2 нормализованный счет
Разба - витель
0,83 мг/кг 2,5 мг/кг 7,5 мг/кг
A551-MB110/B379-ml0r
(Б)
Gzmb
Log2 нормализованный счет
Разба - витель
7,5 мг/кг 2,5 мг/кг 0,83 мг/кг
A551-MB110/B379-ml0r
(В)
Prf1
Log2 нормализованный счет
Разба - витель
0,83 мг/кг 2,5 мг/кг 7,5 мг/кг
A551-MB110/B379-ml0r
(Г)
Ifng
Log2 нормализованный счет
Разба - витель
7,5 мг/кг 2,5 мг/кг 0,83 мг/кг
A551-MB110/B379-ml0r

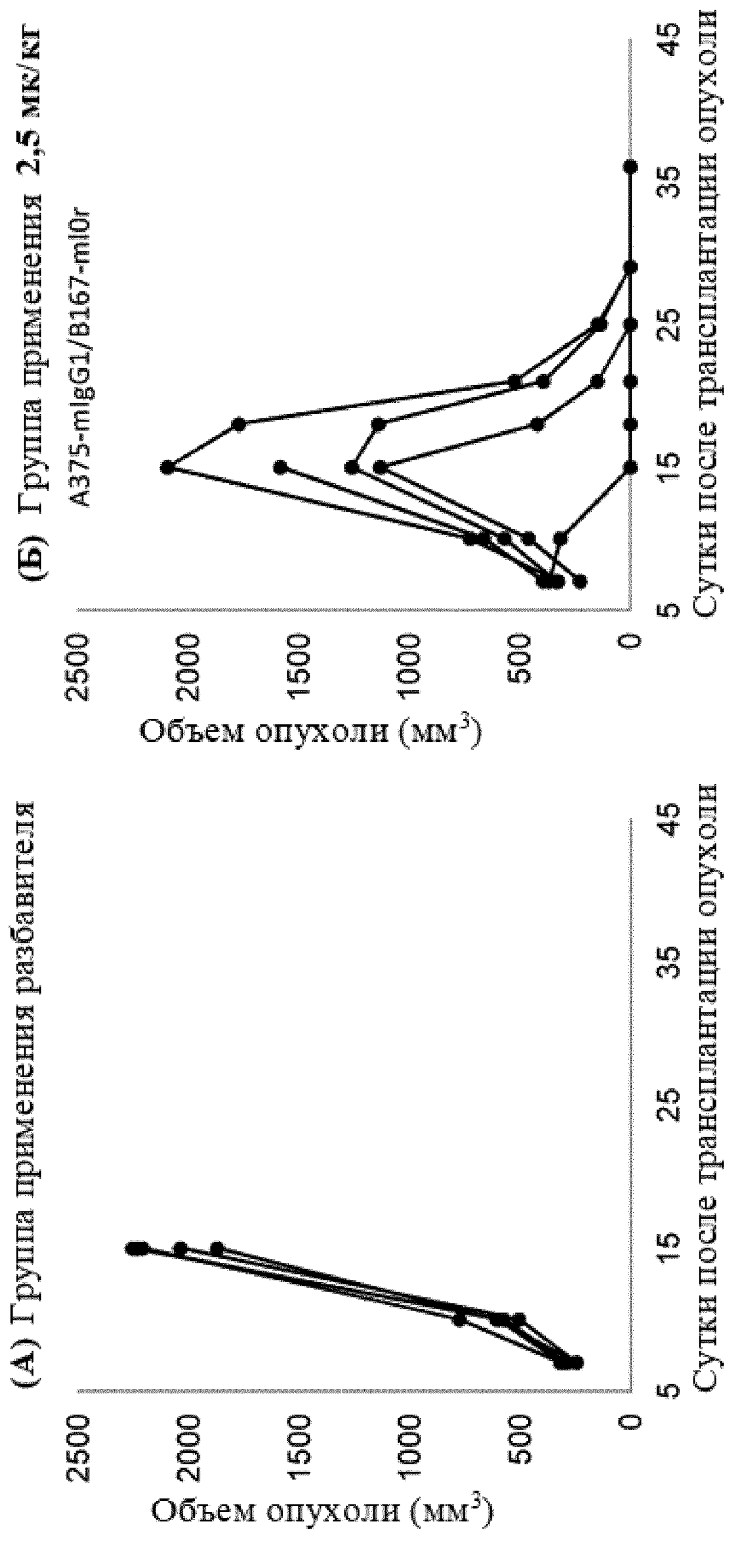
Фигура 2.


(А)
OVA tetramer+ CD8+ Т-клетки /CD8+ Т-клетки (%)
50%
40%
30%
20%
10%
0%
Разба - витель
A551-MB110 /B379-mIo
(Б)
Granzyme B+ CD8+ Т-клетки /CD8+ Т-клетки (%)
50%
40%
30%
20%
10%
0%
Разба - витель
A551-MB110 /B379-mIo
(В)
PD-1+ CD8+ Т-клетки /CD8+ Т-клетки (%)
100%
75%
50%
25%
0%
Разба - витель
A551-MB110 /B379-mIo
(Г)
KLRG-1+ CD8+ Т-клетки /CD8+ Т-клетки (%)
50.0%
40.0%
30.0%
20.0%
10.0%
0.0%
Разба - витель
A551-MB110 /B379-mIo
(Д)
ICOS+ CD8+ Т-клетки /CD8+ Т-клетки (%)
100%
75%
50%
25%
0%
Разба - витель
A551-MB110 /B379-mIo

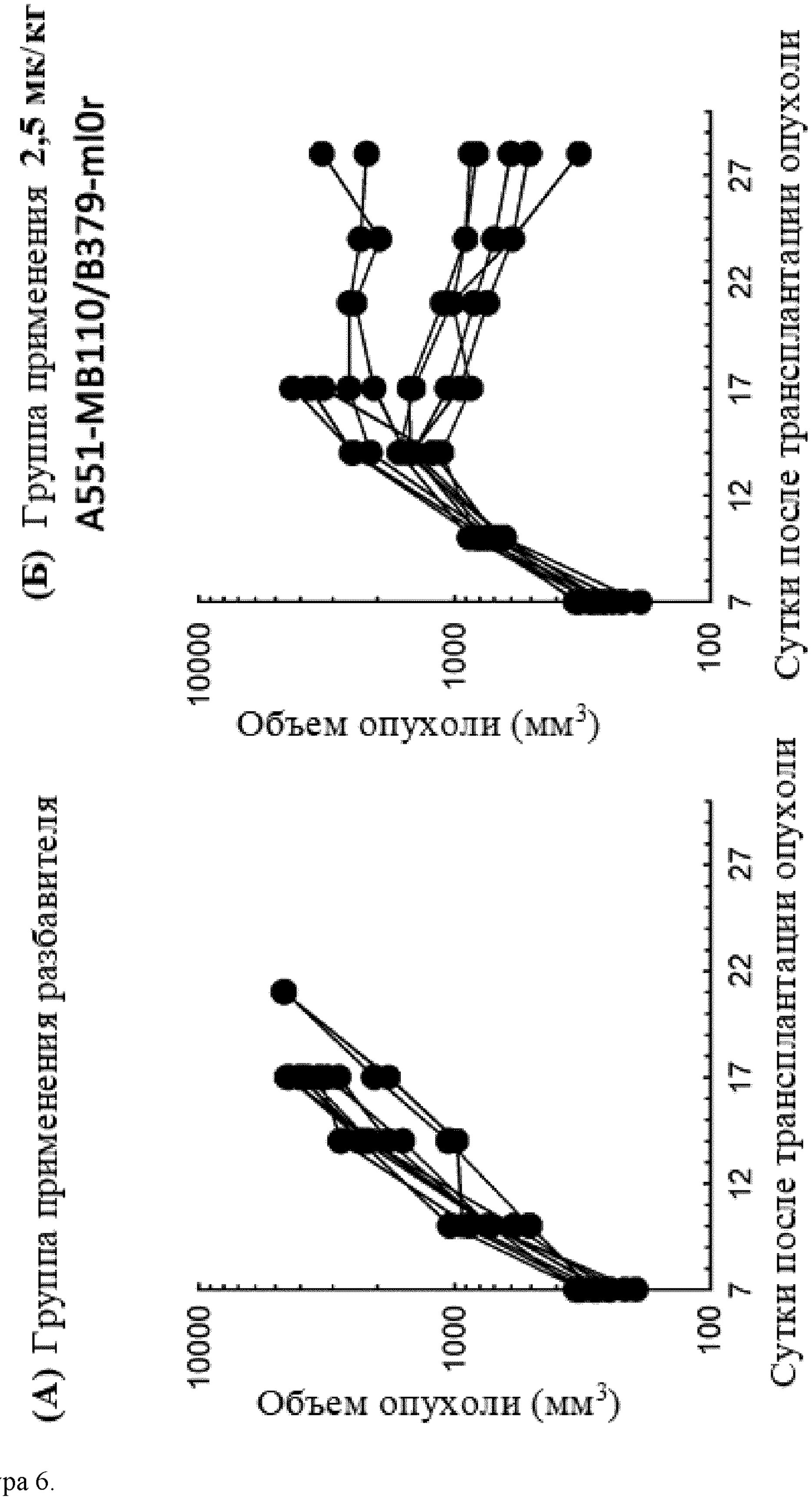
Фигура 3.


(А) Группа применения разбавителя
Объем опухоли (мм3)
10000
1000
100
10
7
12
17
22
27
Сутки после трансплантации опухоли
(Б) Группа применения 2,5 мк/кг
A551-MB110/B379-ml0r
Объем опухоли (мм3)
10000
1000
100
10
7
12
17
22
27
Сутки после трансплантации опухоли

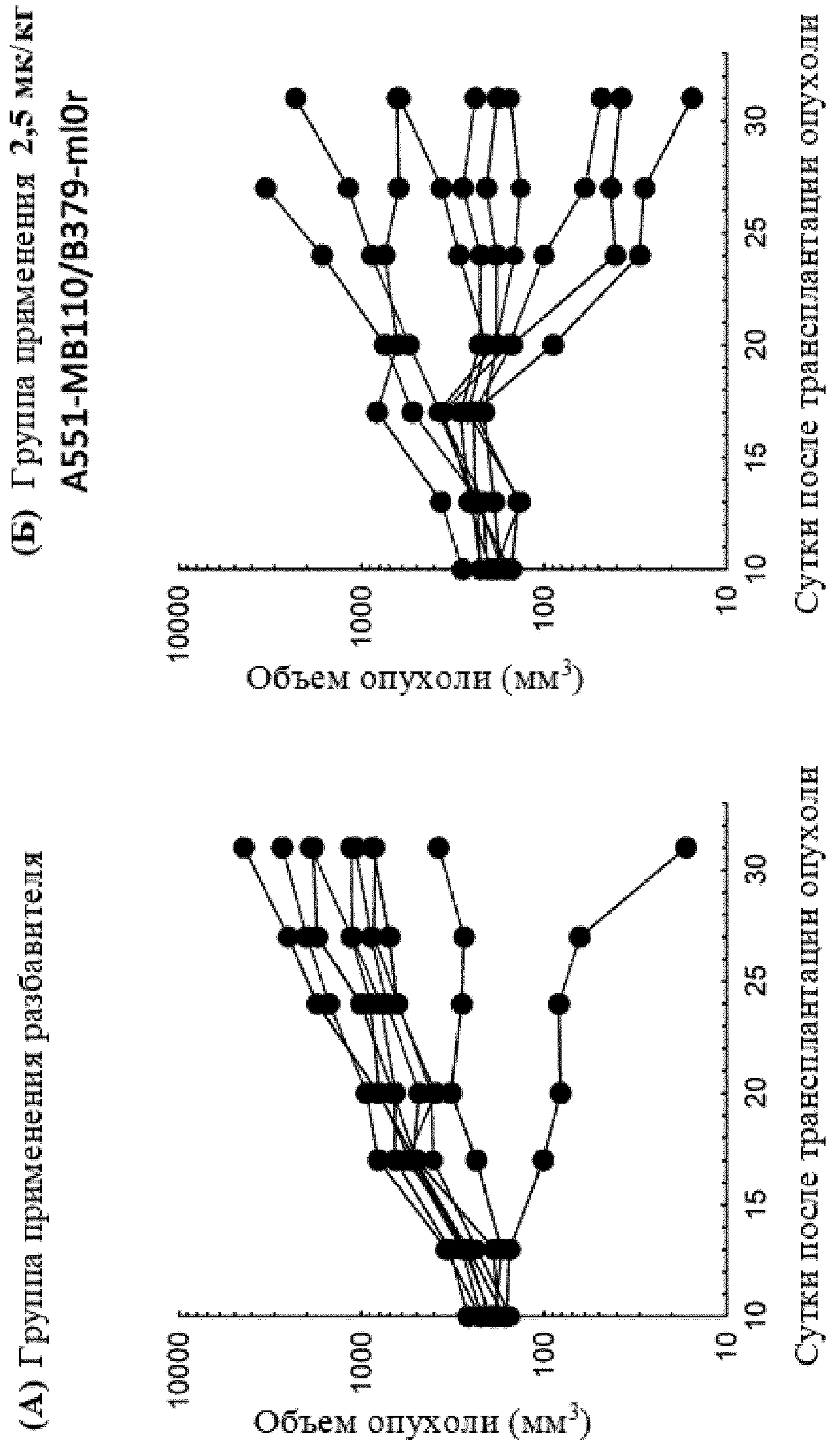
Фигура 4.


(A) Группа применения разбавителя
Объем опухоли (мм^3)
2500
2000
1500
1000
500
0
5
15
25
35
45
Сутки после трансплантации опухоли
(Б) Группа применения 2,5 мк/кг
A375-mIgG1/B167-ml0r
Объем опухоли (мм^3)
2500
2000
1500
1000
500
0
5
15
25
35
45
Сутки после трансплантации опухоли

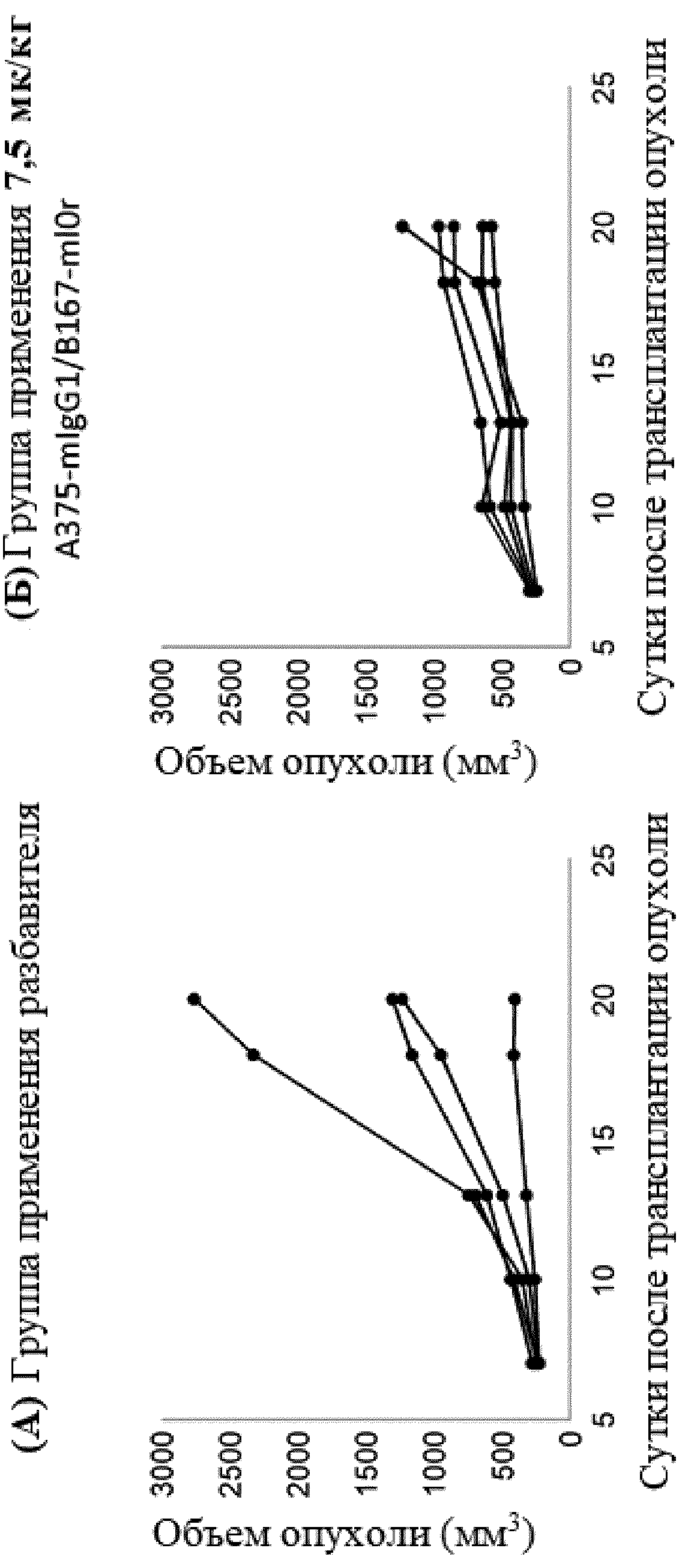
Фигура 5.


(Б) Группа применения 2,5 мк/кг
A551-MB110/B379-ml0r
10000
1000
100
Объем опухоли (мм3)
7
12
17
22
27
Сутки после трансплантации опухоли
(А) Группа применения разбавителя
10000
1000
100
Объем опухоли (мм3)
7
12
17
22
27
Сутки после трансплантации опухоли

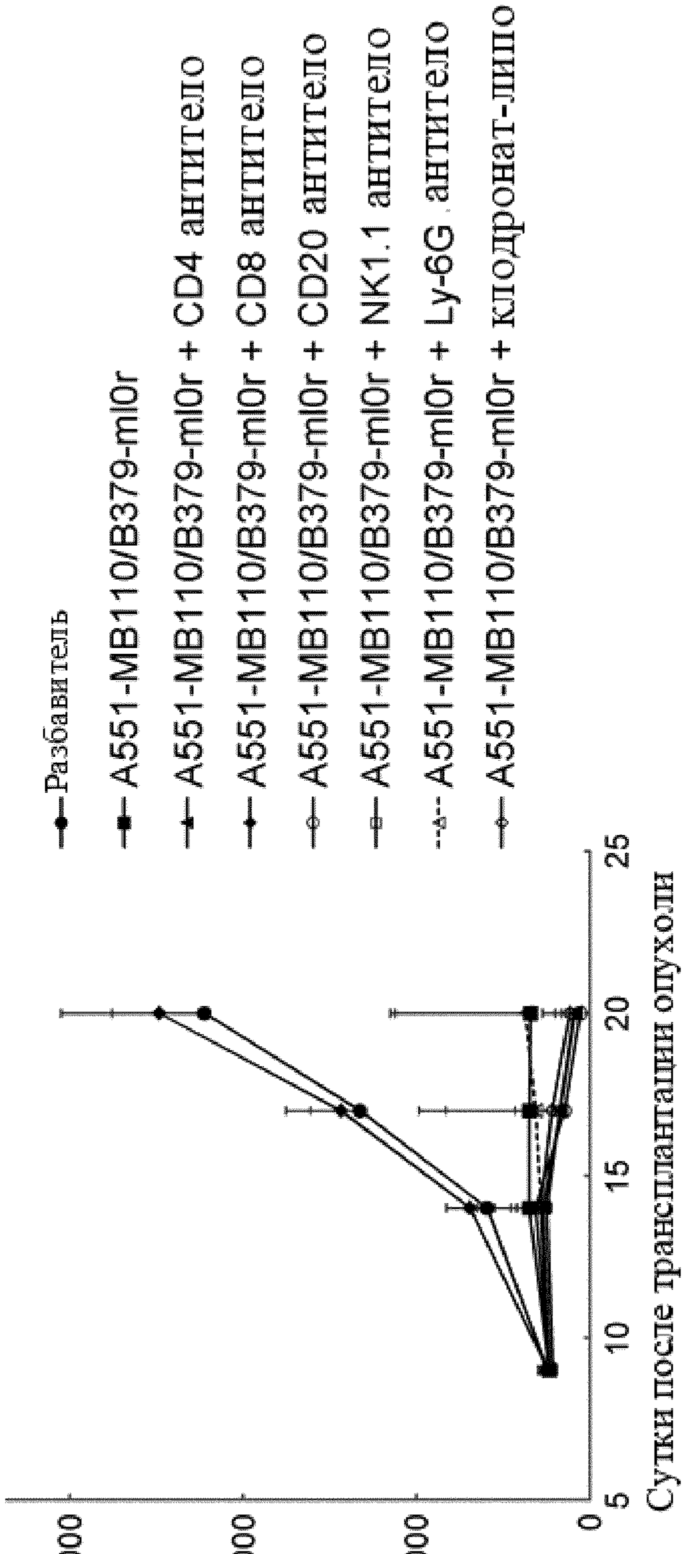
Фигура 6.


(Б) Группа применения 2,5 мк/кг
A551-MB110/B379-ml0r
Объем опухоли (мм3)
Сутки после трансплантации опухоли
(А) Группа применения разбавителя
Объем опухоли (мм3)
Сутки после трансплантации опухоли
10000
1000
100
10
10
15
20
25
30

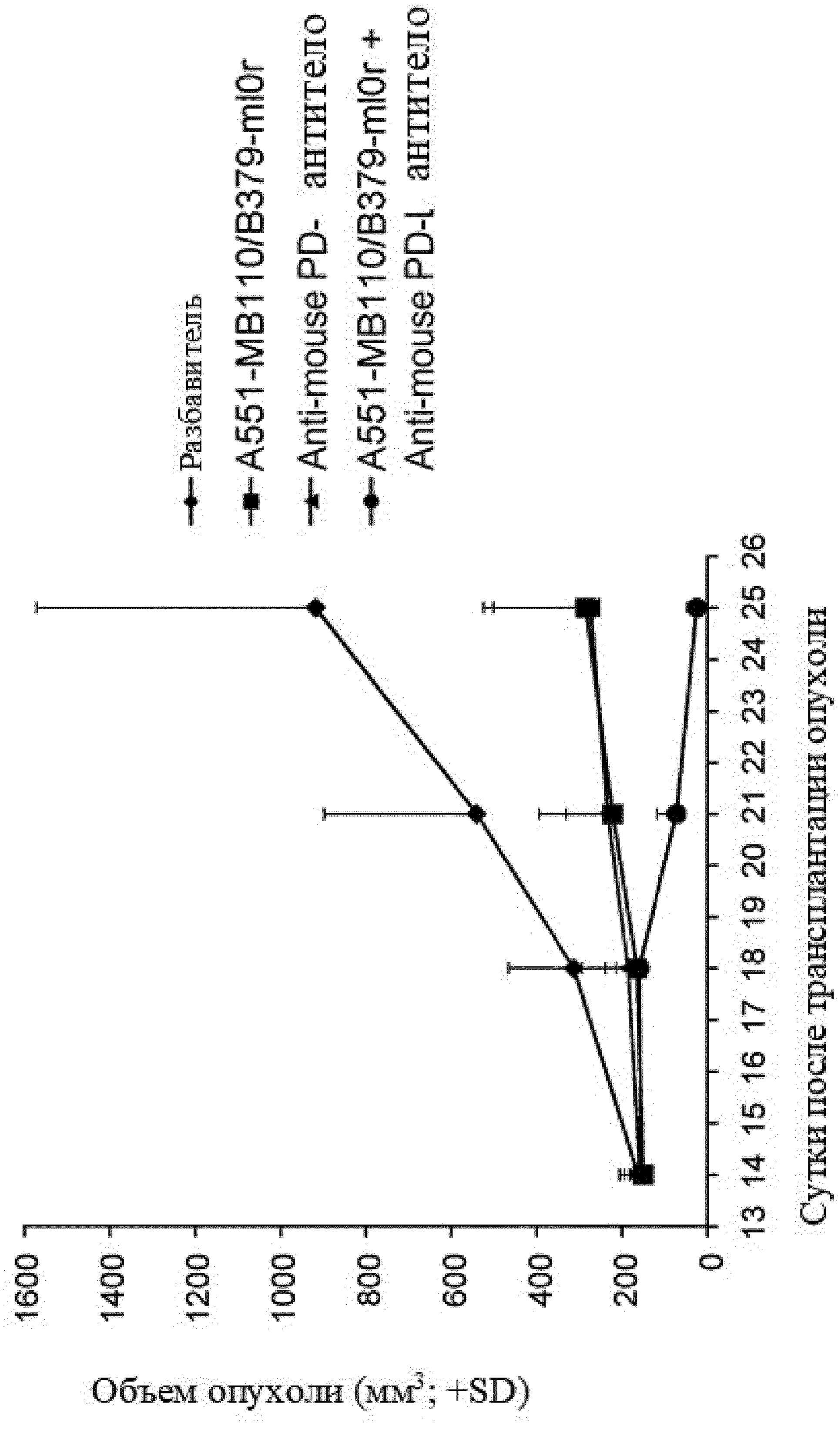
Фигура 7.


(А) Группа применения разбавителя
(Б) Группа применения 7,5 мк/кг
A375-mIgG1/B167-mI0r
Объем опухоли (мм^3)
Сутки после трансплантации опухоли
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
5
10
15
20
25

Фигура 8.

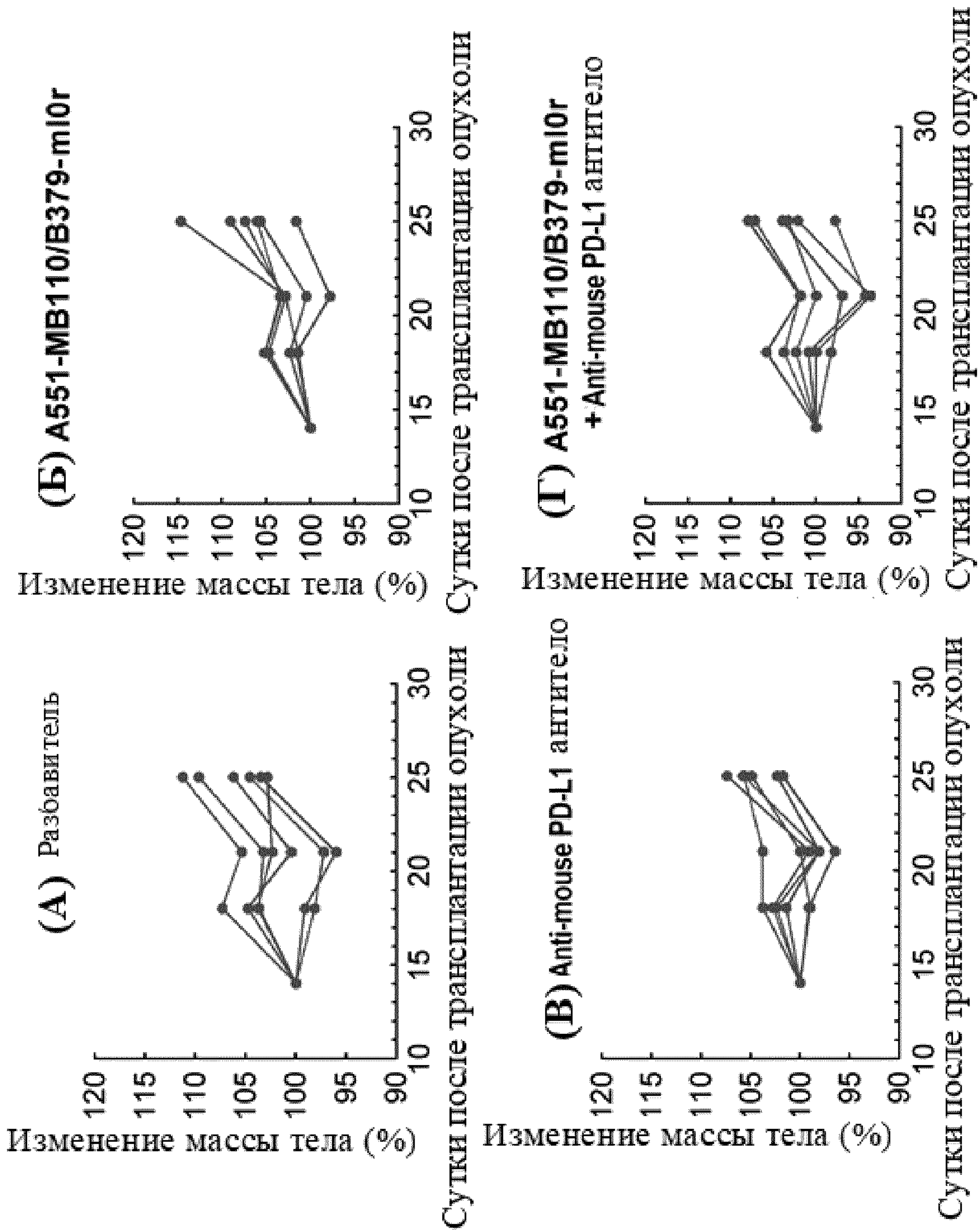

Объем опухоли (мм3; +SD)
0
1000
2000
3000
5
10
15
20
25
Сутки после трансплантации опухоли
Разбавитель
A551-MB110/B379-ml0r
A551-MB110/B379-ml0r + CD4 антитело
A551-MB110/B379-ml0r + CD8 антитело
A551-MB110/B379-ml0r + CD20 антитело
A551-MB110/B379-ml0r + NK1.1 антитело
A551-MB110/B379-ml0r + Ly-6G антитело
A551-MB110/B379-ml0r + клодронат-липо

Фигура 9.

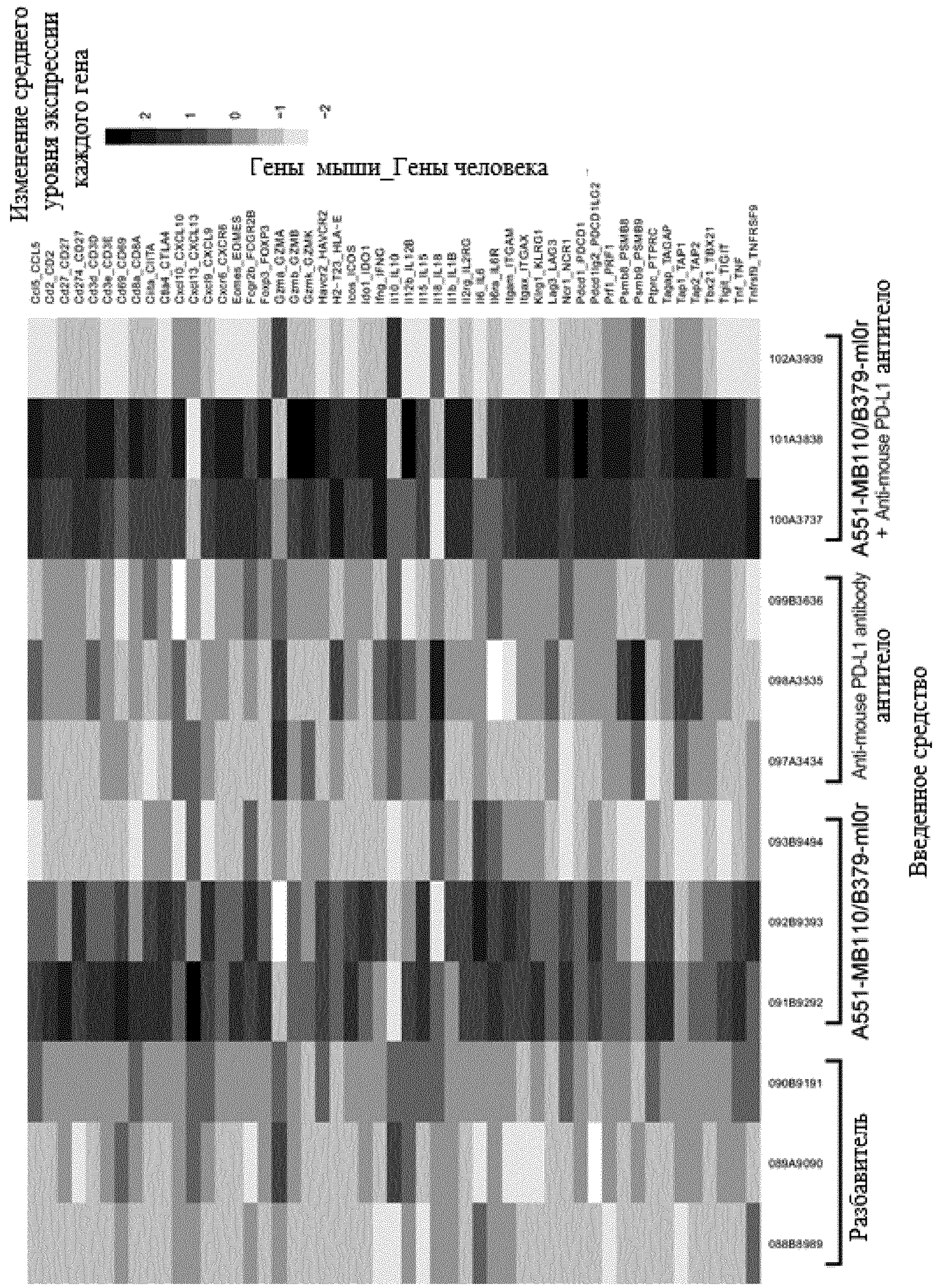


Разбавитель
A551-MB110/B379-ml0r
Anti-mouse PD- антитело
A551-MB110/B379-ml0r + Anti-mouse PD-l антитело
Объем опухоли (мм3; +SD)
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26
Сутки после трансплантации опухоли

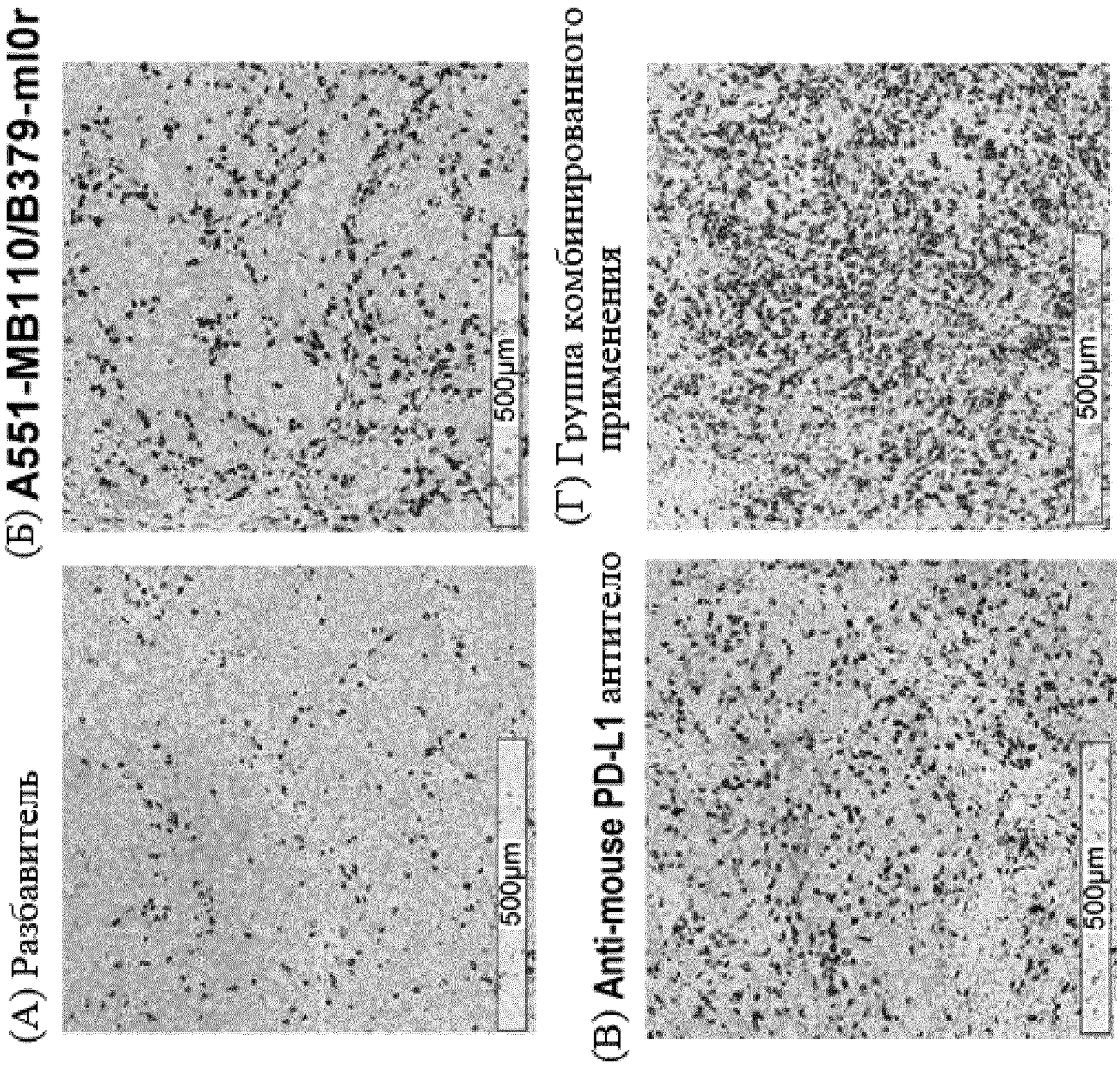
Фигура 10.


(А) Разбавитель
(Б) A551-MB110/B379-ml0r
(В) Anti-mouse PD-L1 антитело
(Г) A551-MB110/B379-ml0r
+ Anti-mouse PD-L1 антитело
Изменение массы тела (%)
Сутки после трансплантации опухоли
120
115
110
105
100
95
90
10
15
20
25
30

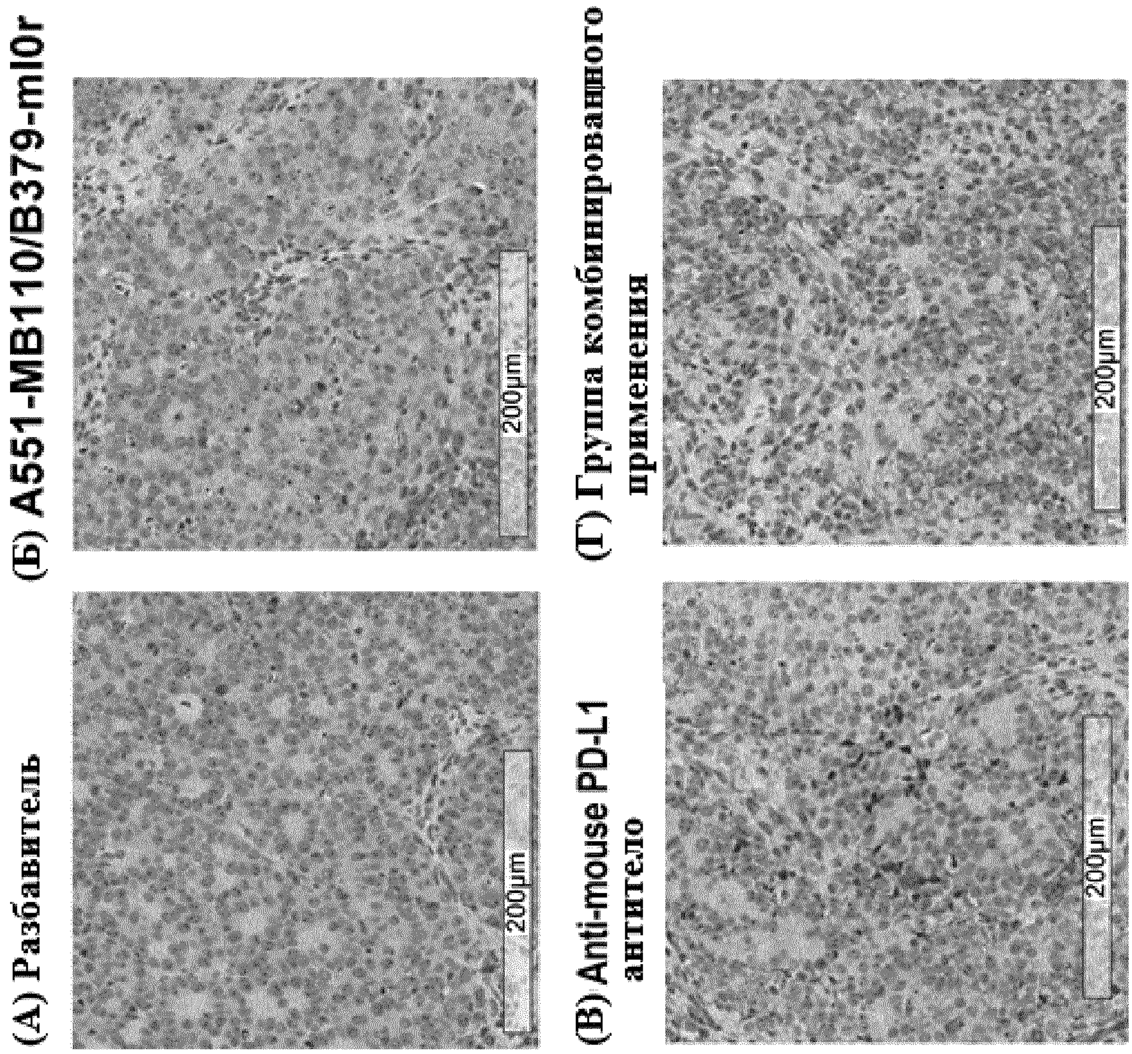
Фигура 11.


Изменение среднего уровня экспрессии каждого гена
2
1
0
−1
−2
Гены мыши_Гены человека
Ccl5_CCL5
Cd2_CD2
Cd27_CD27
Cd274_CD27
Cd3d_CD3D
Cd3e_CD3E
Cd69_CD69
Cd8a_CD8A
Ciita_CIITA
Ctla4_CTLA4
Cxcl10_CXCL10
Cxcl13_CXCL13
Cxcl9_CXCL9
Cxcr6_CXCR6
Eomes_EOMES
Fcgr2b_FCGR2B
Foxp3_FOXP3
Gzma_GZMA
Gzmb_GZMB
Gzmk_GZMK
Havcr2_HAVCR2
H2-T23_HLA-E
Icos_ICOS
Ido1_IDO1
Ifng_IFNG
Il10_IL10
Il12b_IL12B
Il15_IL15
Il18_IL18
Il1b_IL1B
Il2rg_IL2RG
Il6_IL6
Il6ra_IL6R
Itgam_ITGAM
Itgax_ITGAX
Klrg1_KLRG1
Lag3_LAG3
Ncr1_NCR1
Pdcd1_PDCD1
Pdcd1lg2_PDCD1LG2
Prf1_PRF1
Psmb8_PSMB8
Psmb9_PSMB9
Ptprc_PTPRC
Tagap_TAGAP
Tap1_TAP1
Tap2_TAP2
Tbx21_TBX21
Tigit_TIGIT
Tnf_TNF
Tnfrsf9_TNFRSF9
102A3939
101A3838
100A3737
099B3636
098A3535
097A3434
093B9494
092B9393
091B9292
090B9191
089A9090
088B8989
A551-MB110/B379-ml0r + Anti-mouse PD-L1 антитело
Anti-mouse PD-L1 antibody антитело
A551-MB110/B379-ml0r
Разбавитель
Введенное средство

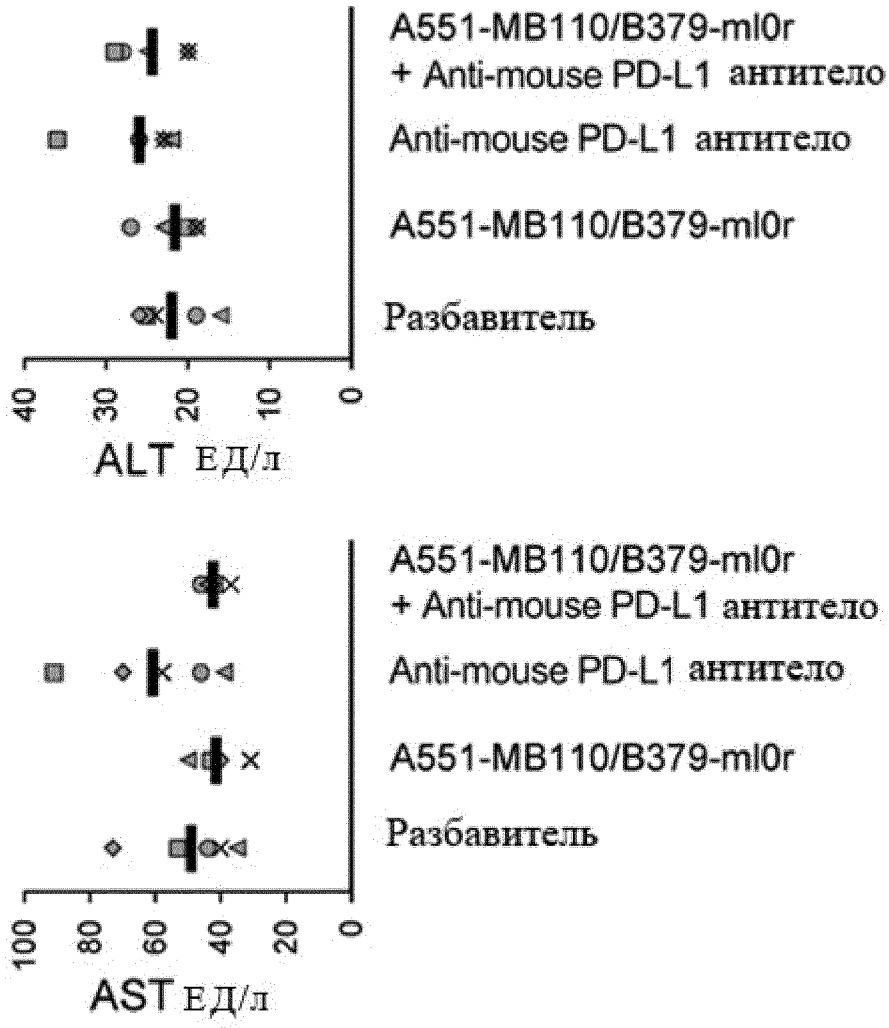
Фигура 12.


(А) Разбавитель
500µm
(Б) A551-MB110/B379-ml0r
500µm
(В) Anti-mouse PD-L1 антитело
500µm
(Г) Группа комбинированного применения
500µm

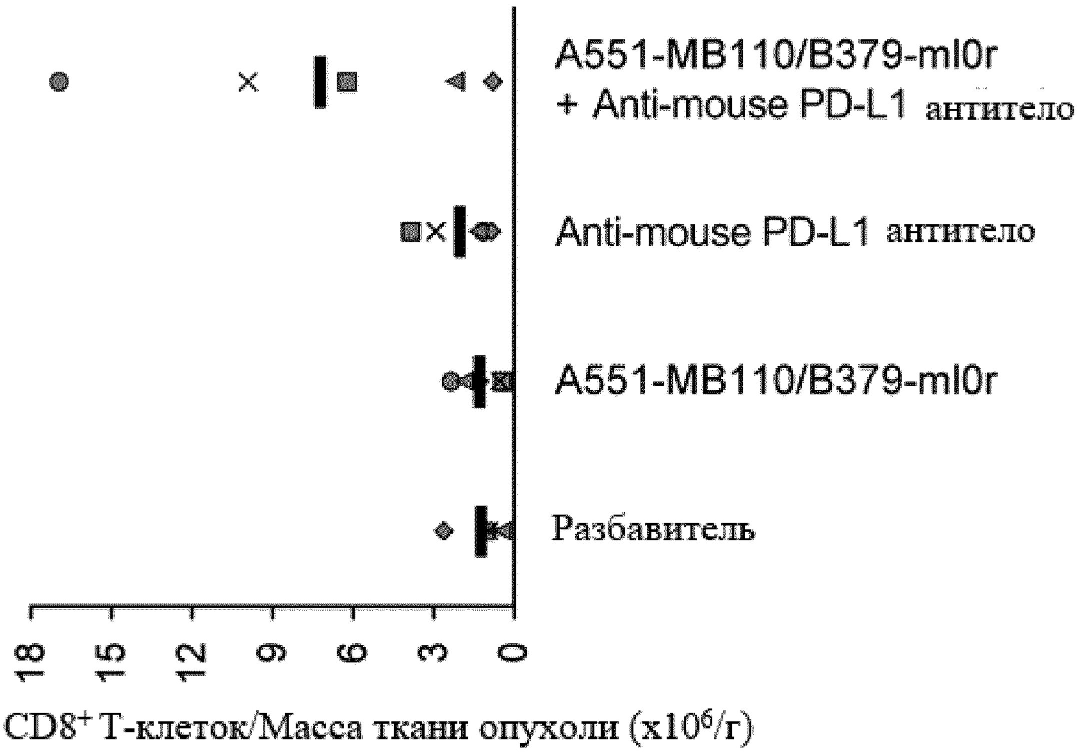
Фигура 13.


(А) Разбавитель
200µm
(Б) A551-MB110/B379-mI0r
200µm
(В) Anti-mouse PD-L1 антитело
200µm
(Г) Группа комбинированного применения
200µm

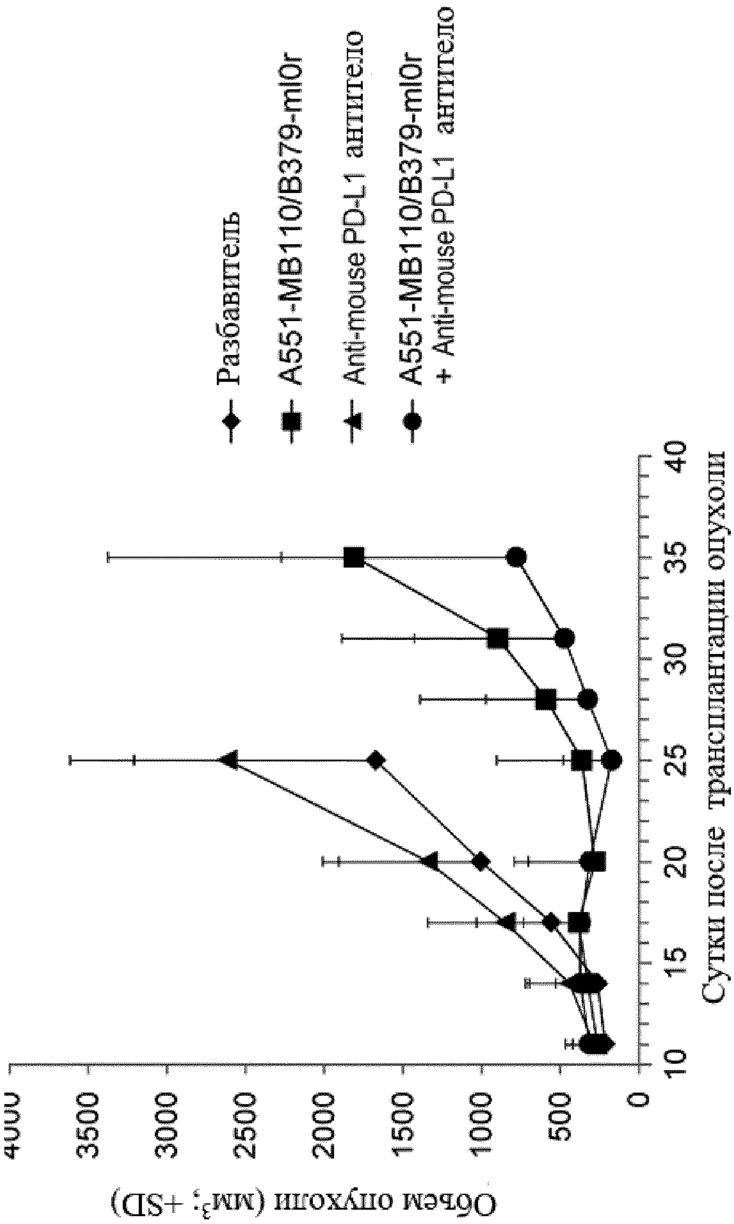
Фигура 14.


A551-MB110/B379-ml0r
+ Anti-mouse PD-L1 антитело
Anti-mouse PD-L1 антитело
A551-MB110/B379-ml0r
Разбавитель
40
30
20
10
0
ALT ЕД/л
A551-MB110/B379-ml0r
+ Anti-mouse PD-L1 антитело
Anti-mouse PD-L1 антитело
A551-MB110/B379-ml0r
Разбавитель
100
80
60
40
20
0
AST ЕД/л

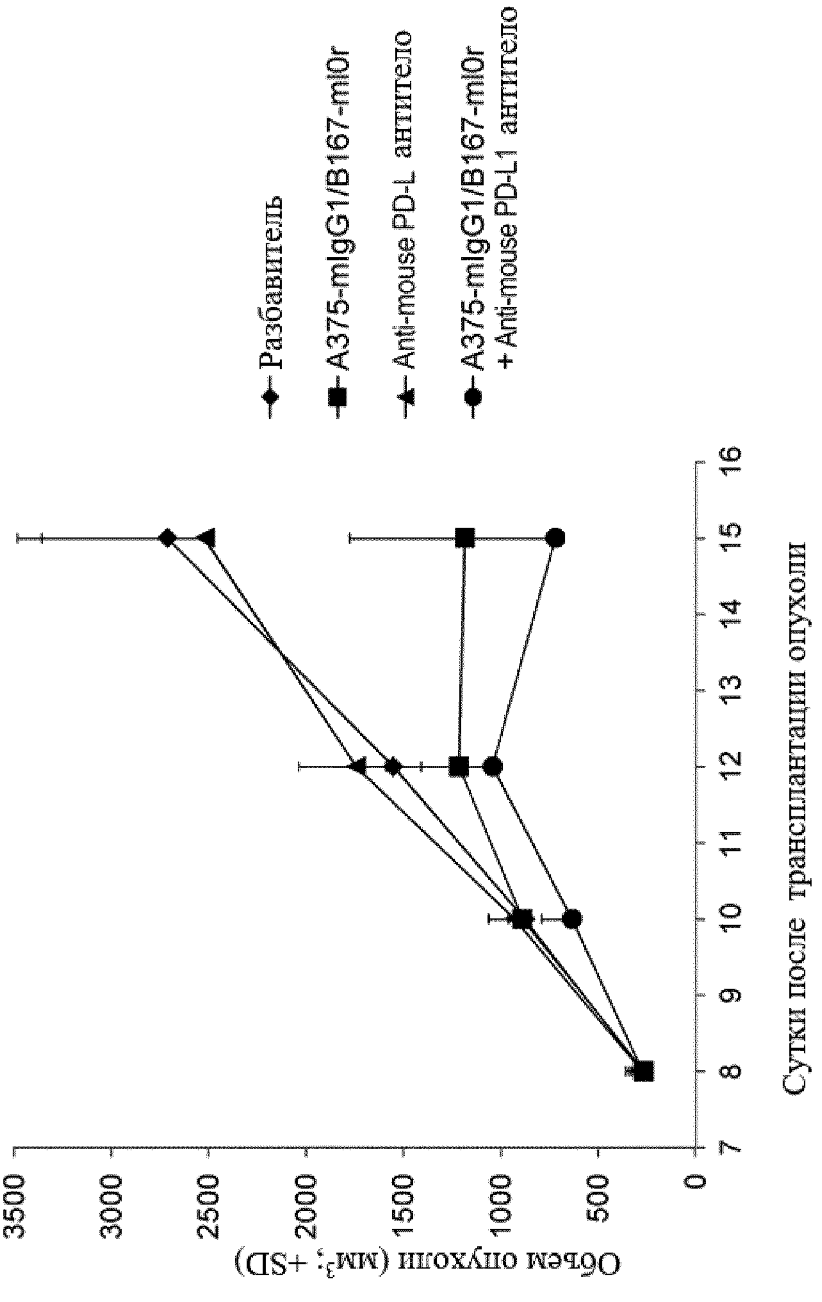
Фигура 15.


A551-MB110/B379-ml0r
+ Anti-mouse PD-L1 антитело
Anti-mouse PD-L1 антитело
A551-MB110/B379-ml0r
Разбавитель
18
15
12
9
6
3
0
CD8+ Т-клеток/Масса ткани опухоли (x10^6/г)

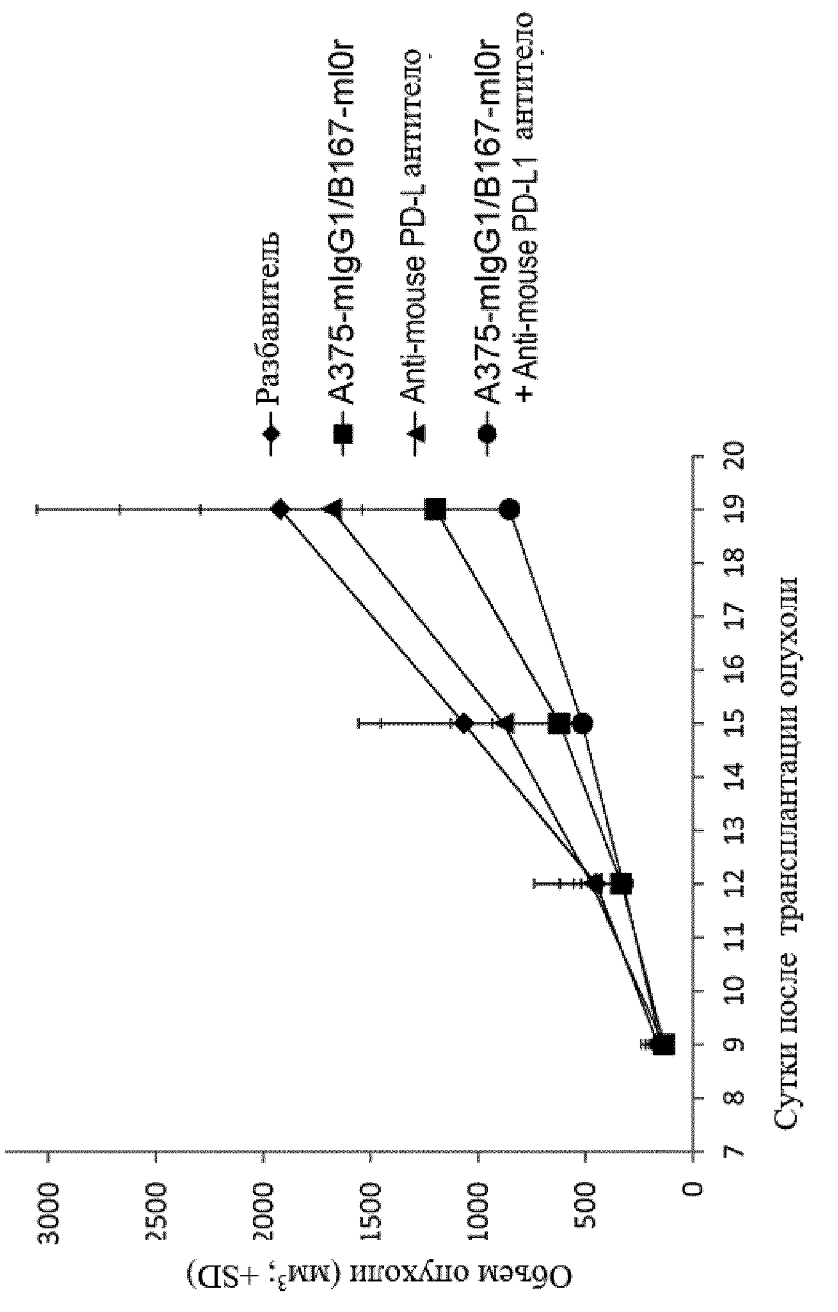
Фигура 16.


Разбавитель
A551-MB110/B379-ml0r
Anti-mouse PD-L1 антитело
A551-MB110/B379-ml0r
+ Anti-mouse PD-L1 антитело
Объем опухоли (мм³; +SD)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10
15
20
25
30
35
40
Сутки после трансплантации опухоли

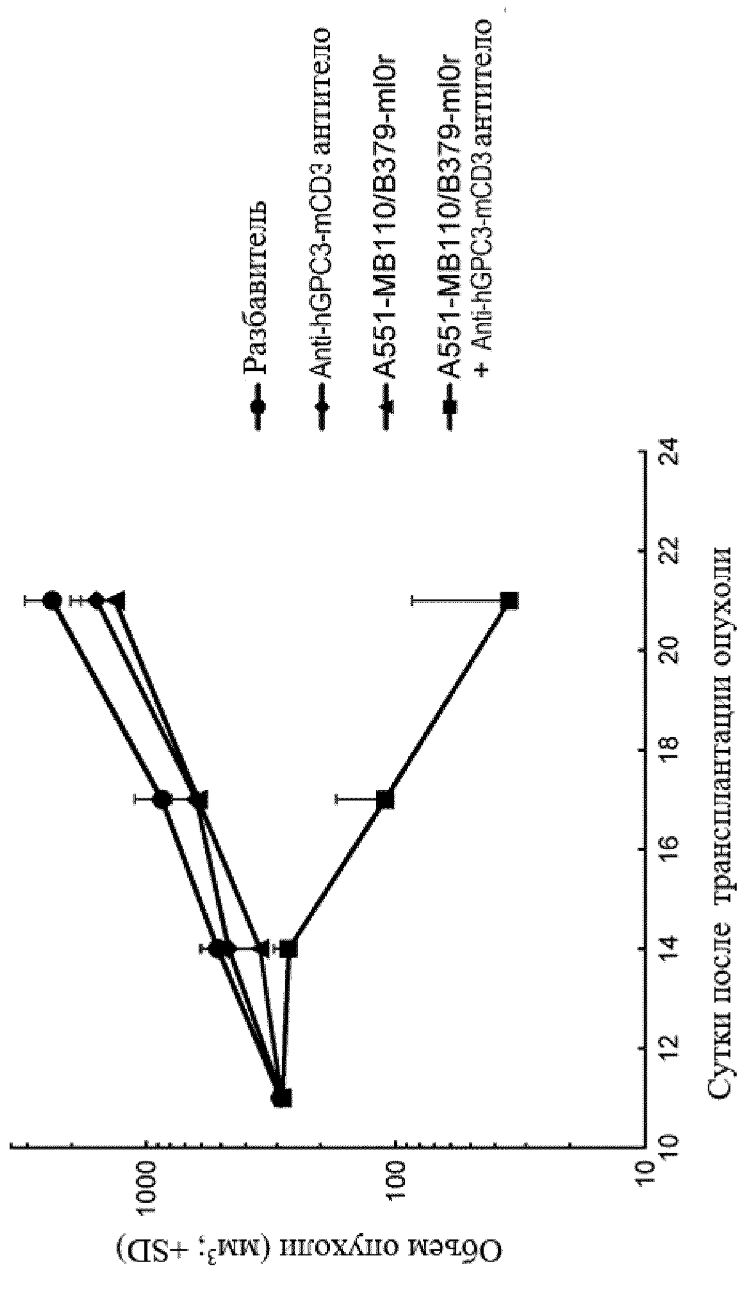
Фигура 17.


Разбавитель
A375-mIgG1/B167-ml0r
Anti-mouse PD-L антитело
A375-mIgG1/B167-ml0r
+ Anti-mouse PD-L1 антитело
Объем опухоли (мм³; +SD)
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
Сутки после трансплантации опухоли

Фигура 18.

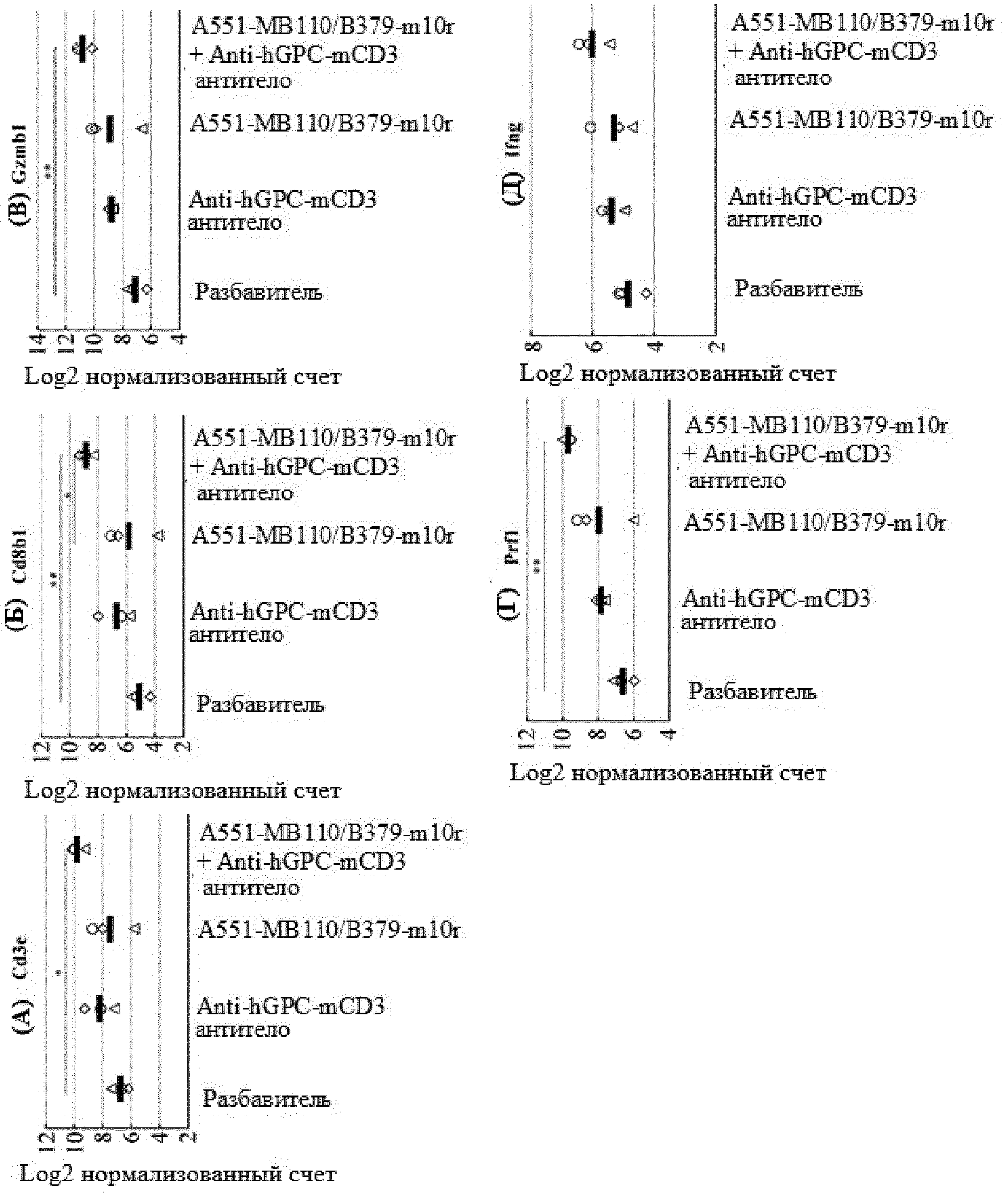

Разбавитель
A375-mIgG1/B167-ml0r
Anti-mouse PD-L антитело
A375-mIgG1/B167-ml0r
+ Anti-mouse PD-L1 антитело
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
Объем опухоли (мм³; +SD)
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
Сутки после трансплантации опухоли

Фигура 19.

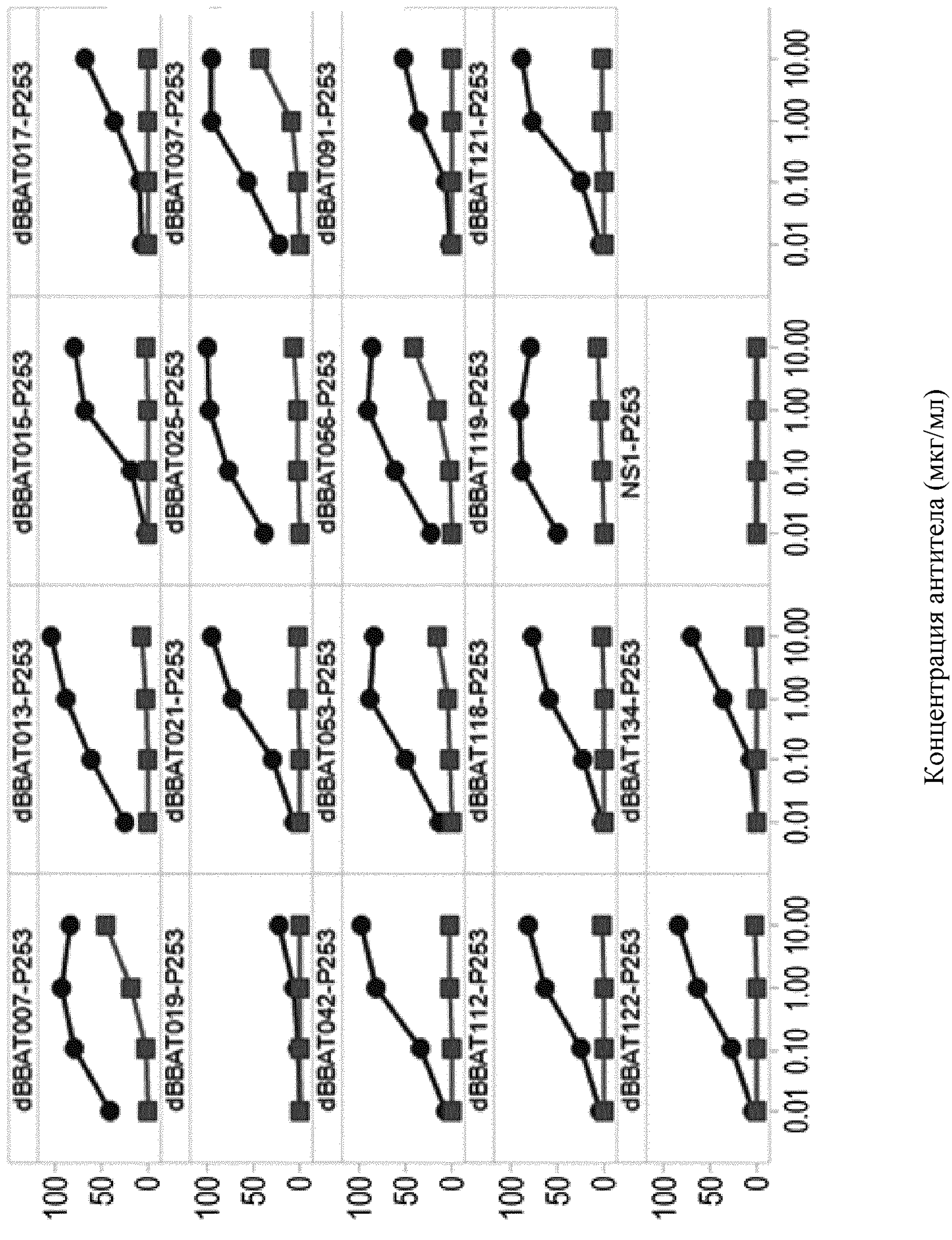


Разбавитель
Anti-hGPC3-mCD3 антитело
A551-MB110/B379-ml0r
A551-MB110/B379-ml0r + Anti-hGPC3-mCD3 антитело
Объем опухоли (мм3; +SD)
10
100
1000
10
12
14
16
18
20
22
24
Сутки после трансплантации опухоли

Фигура 20.


(В) Gzmb1
A551-MB110/B379-m10r
+ Anti-hGPC-mCD3
антитело
A551-MB110/B379-m10r
Anti-hGPC-mCD3
антитело
Разбавитель
14 12 10 8 6 4
Log2 нормализованный счет
(Д) Ifng
A551-MB110/B379-m10r
+ Anti-hGPC-mCD3
антитело
A551-MB110/B379-m10r
Anti-hGPC-mCD3
антитело
Разбавитель
8 6 4 2
Log2 нормализованный счет
(Б) Cd8b1
A551-MB110/B379-m10r
+ Anti-hGPC-mCD3
антитело
A551-MB110/B379-m10r
Anti-hGPC-mCD3
антитело
Разбавитель
12 10 8 6 4 2
Log2 нормализованный счет
(Г) Prf1
A551-MB110/B379-m10r
+ Anti-hGPC-mCD3
антитело
A551-MB110/B379-m10r
Anti-hGPC-mCD3
антитело
Разбавитель
12 10 8 6 4
Log2 нормализованный счет
(А) Cd3e
A551-MB110/B379-m10r
+ Anti-hGPC-mCD3
антитело
A551-MB110/B379-m10r
Anti-hGPC-mCD3
антитело
Разбавитель
12 10 8 6 4 2
Log2 нормализованный счет

Фигура 21.



Относительные световые единицы

Обозначения цветом:

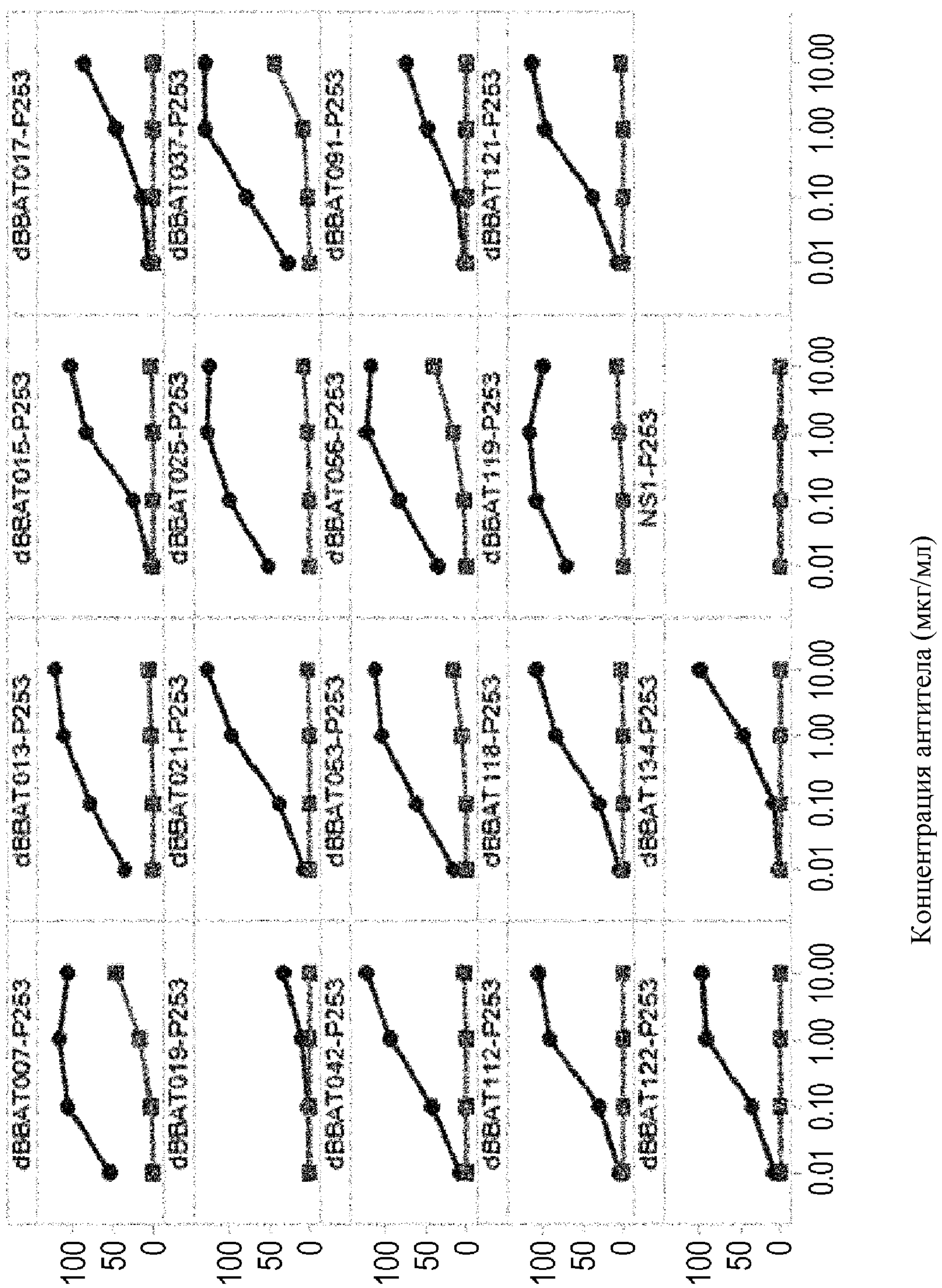
Концентрация низкомолекулярных соединений

● АТФ 50 мкМ/мл ● Низкомолекулярное соединение(-)

Обозначение формой:

● АТФ 50 мкМ/мл ■ Низкомолекулярное соединение(-)

Фигура 22.



Относительные световые единицы

Обозначения цветом:

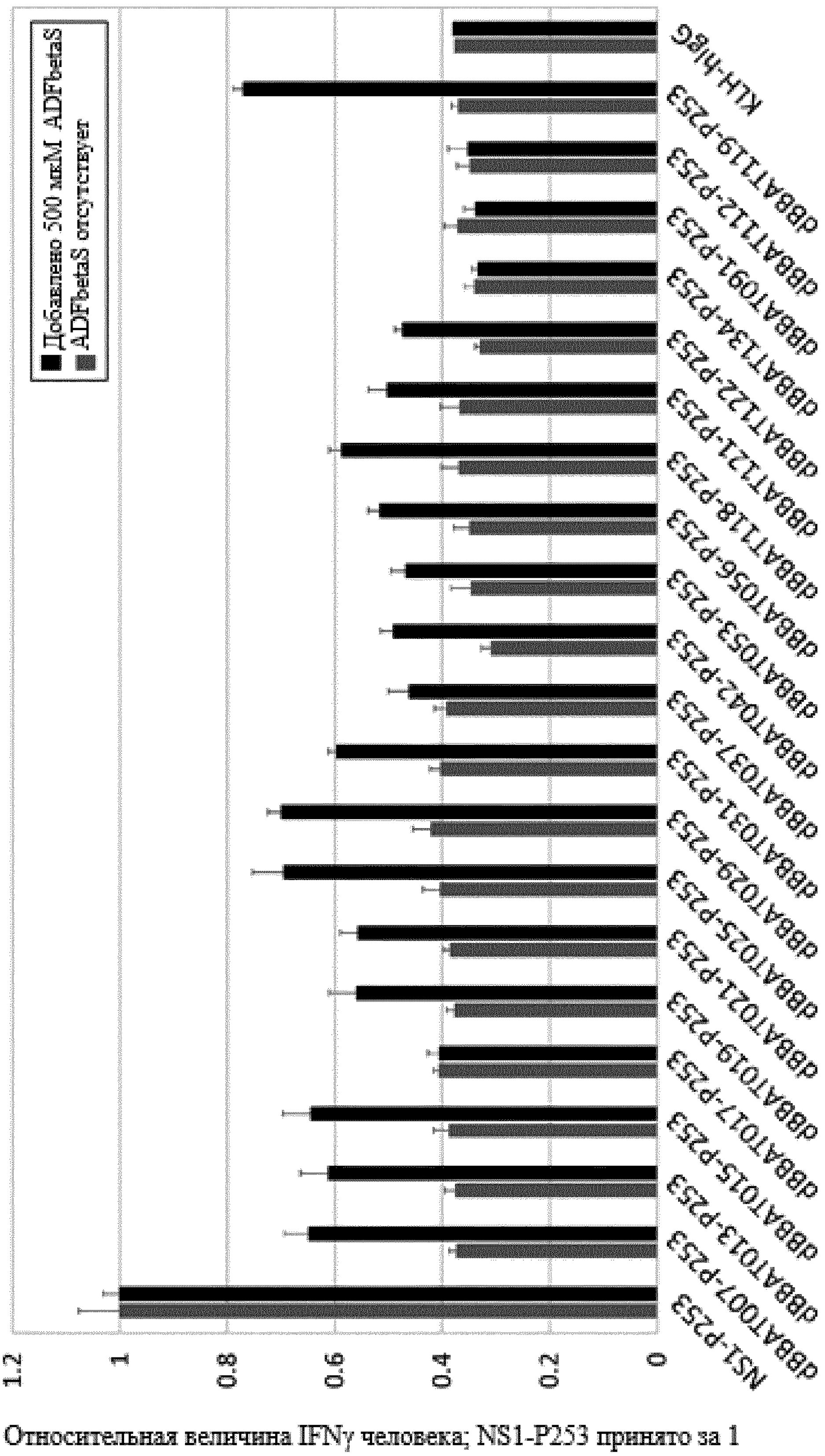
Концентрация низкомолекулярных соединений

● АТФ 50 мкМ/мл ● Низкомолекулярное соединение(-)

Обозначение формой:

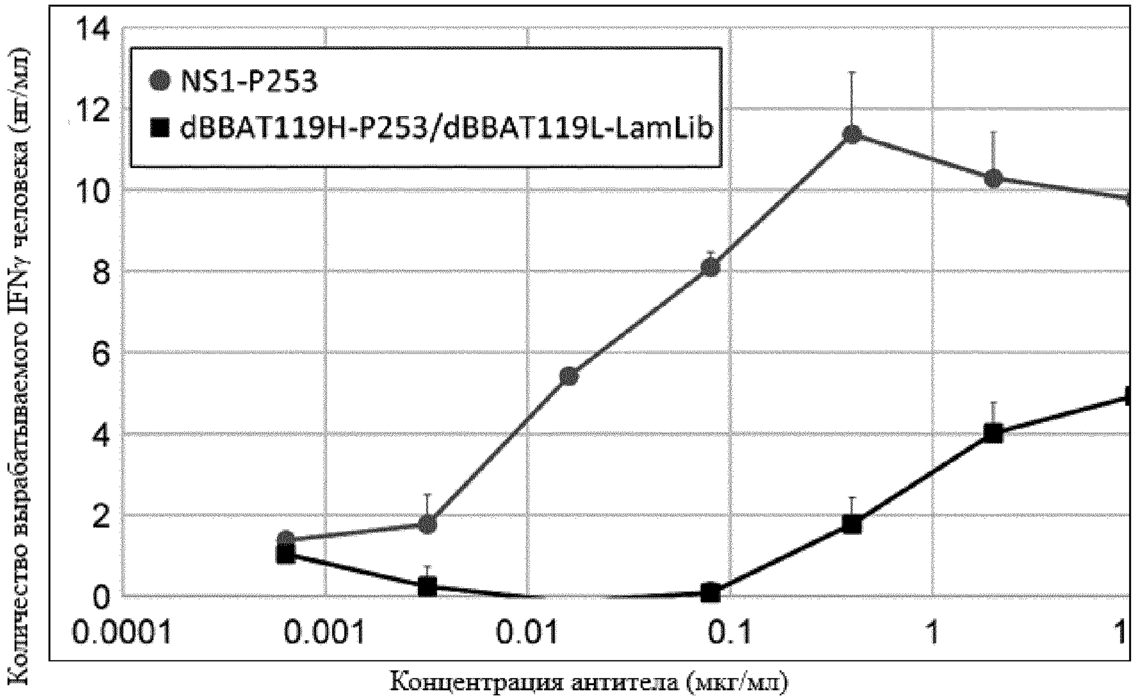
● АТФ 50 мкМ/мл ■ Низкомолекулярное соединение(-)

Фигура 23.



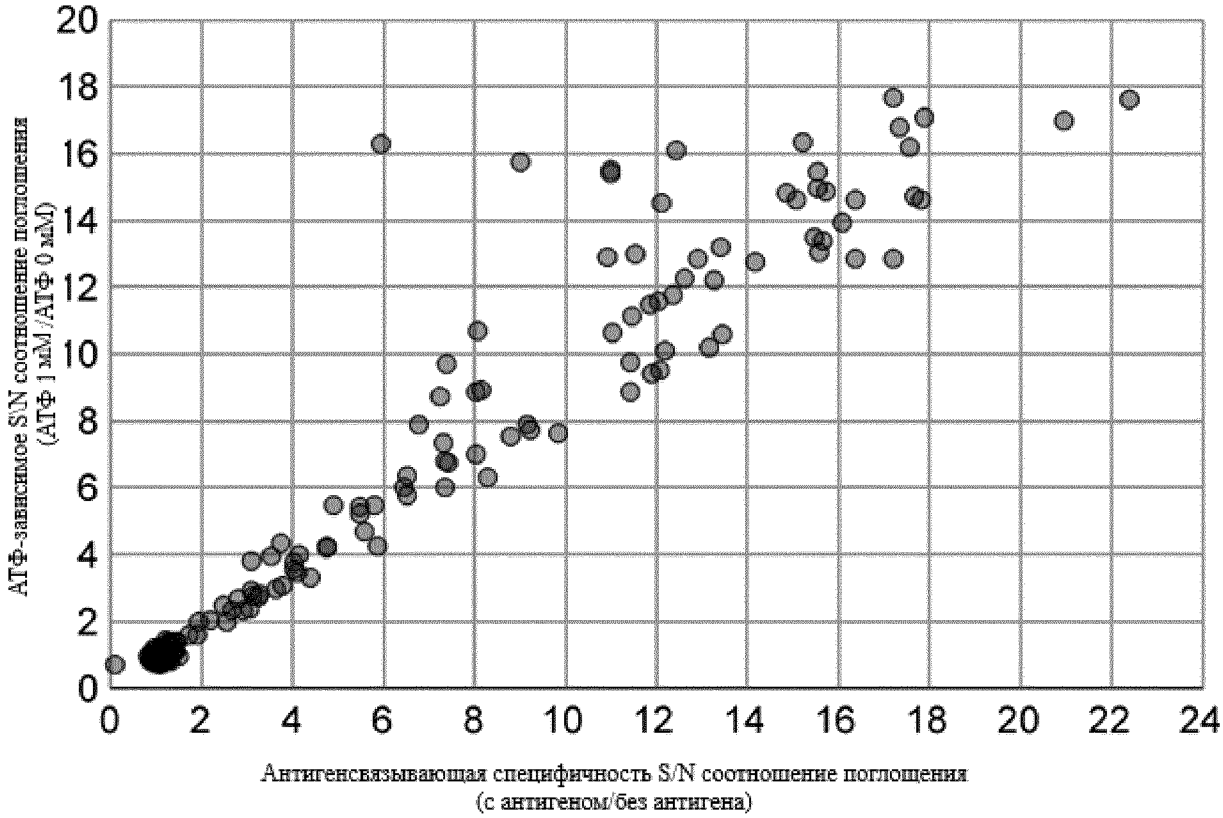
Добавлено 500 мкМ ADFbetaS
ADFbetaS отсутствует
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
NS1-P253
dBBAT007-P253
dBBAT013-P253
dBBAT015-P253
dBBAT017-P253
dBBAT019-P253
dBBAT021-P253
dBBAT025-P253
dBBAT029-P253
dBBAT031-P253
dBBAT037-P253
dBBAT042-P253
dBBAT053-P253
dBBAT056-P253
dBBAT118-P253
dBBAT121-P253
dBBAT122-P253
dBBAT134-P253
dBBAT091-P253
dBBAT112-P253
dBBAT119-P253
KLH-hIgG
Относительная величина IFNγ человека; NS1-P253 принято за 1

Фигура 24.

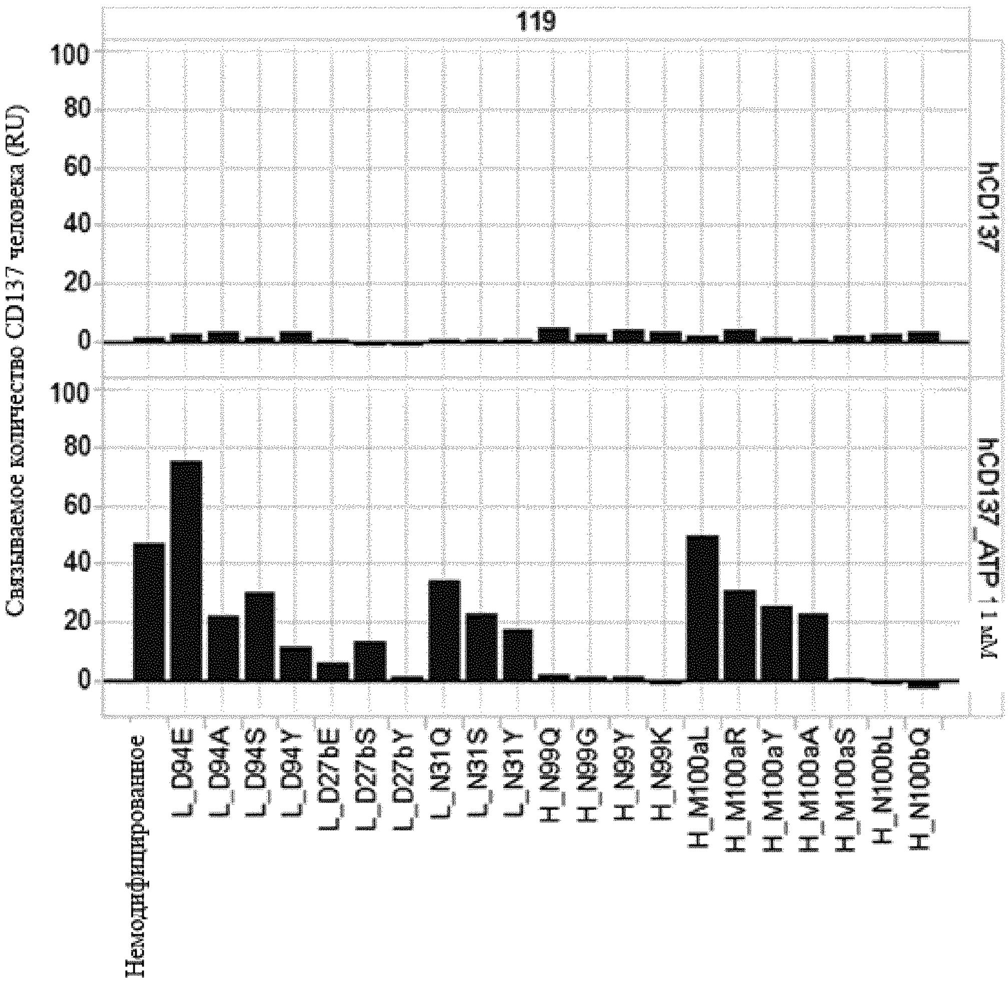


14
12
10
8
6
4
2
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
1
NS1-P253
dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib
Количество вырабатываемого IFNγ человека (нг/мл)
Концентрация антитела (мкг/мл)

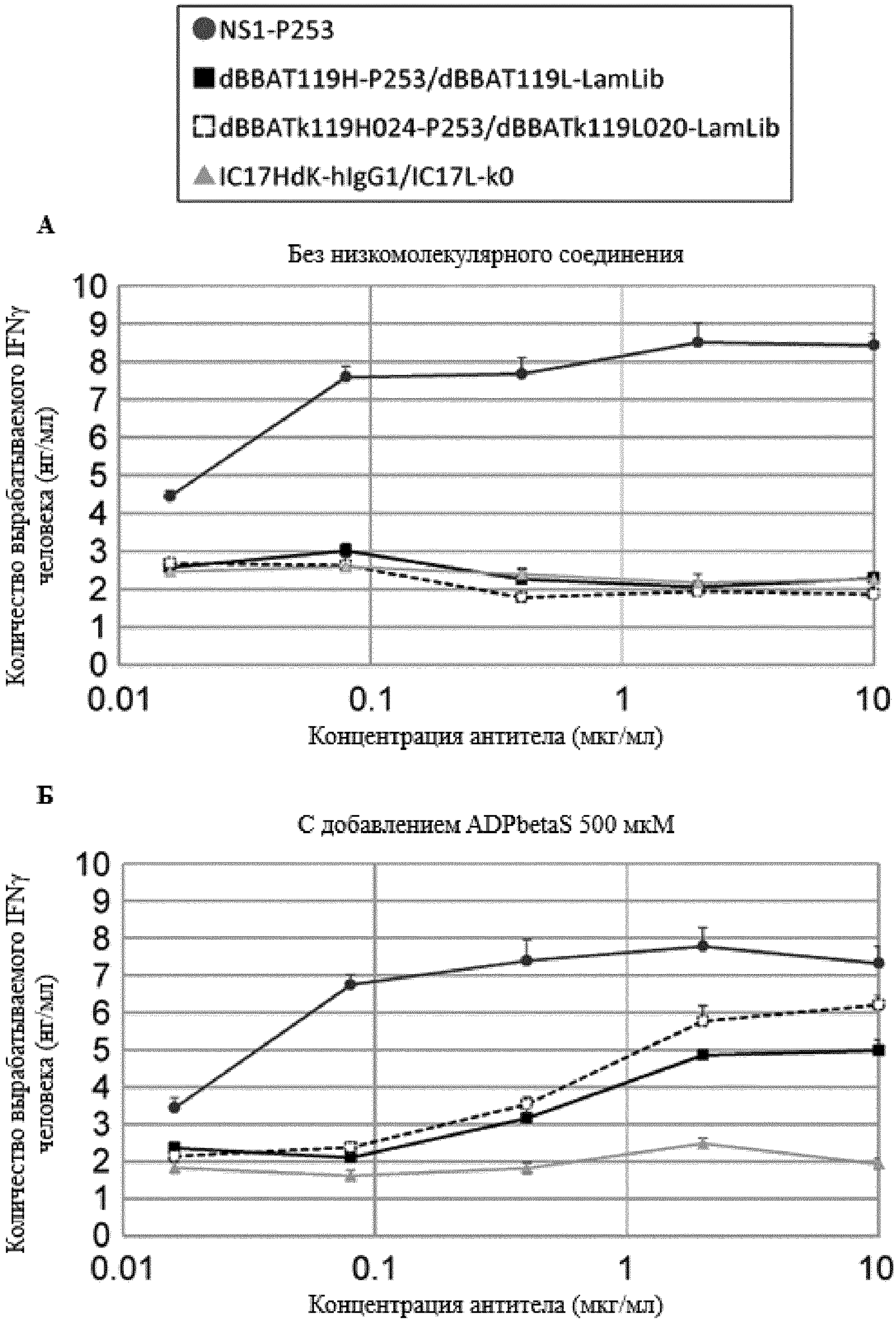
Фигура 25.


АТФ-зависимое S/N соотношение поглощения
(АТФ 1 мМ/АТФ 0 мМ)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
Антигенсвязывающая специфичность S/N соотношение поглощения
(с антигеном/без антигена)

Фигура 26.

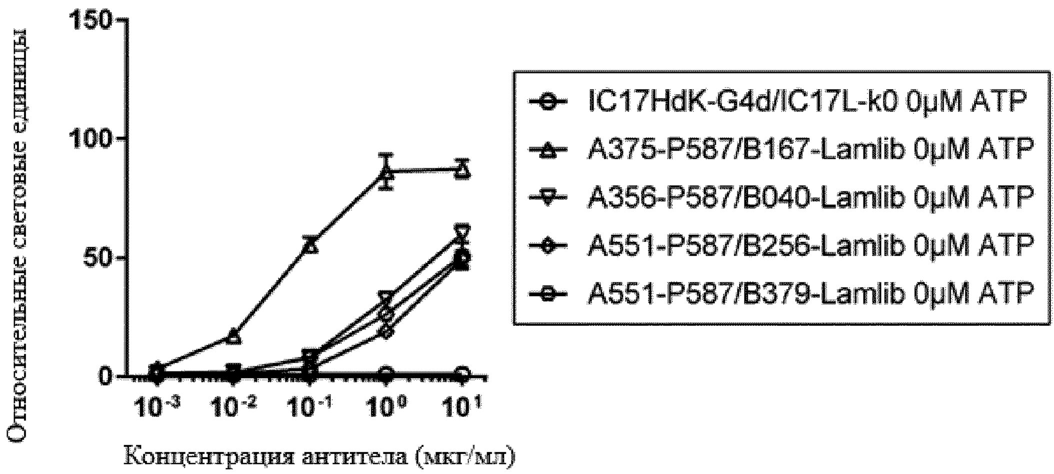

119
Связываемое количество CD137 человека (RU)
100
80
60
40
20
0
hCD137
hCD137_ATP 1 мМ
Немодифицированное
L_D94E
L_D94A
L_D94S
L_D94Y
L_D27bE
L_D27bS
L_D27bY
L_N31Q
L_N31S
L_N31Y
H_N99Q
H_N99G
H_N99Y
H_N99K
H_M100aL
H_M100aR
H_M100aY
H_M100aA
H_M100aS
H_N100bL
H_N100bQ

Фигура 27.

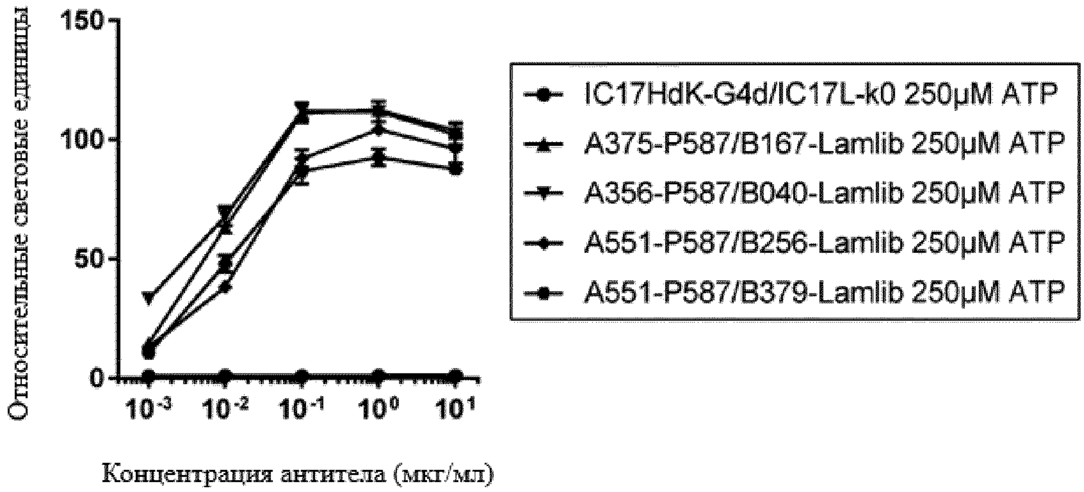

NS1-P253
dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib
dBBATk119H024-P253/dBBATk119L020-LamLib
IC17HdK-hIgG1/IC17L-k0
A
Без низкомолекулярного соединения
Количество вырабатываемого IFNγ человека (нг/мл)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
0.01 0.1 1 10
Концентрация антитела (мкг/мл)
Б
С добавлением ADPbetaS 500 мкМ
Количество вырабатываемого IFNγ человека (нг/мл)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
0.01 0.1 1 10
Концентрация антитела (мкг/мл)

Фигура 28.

А

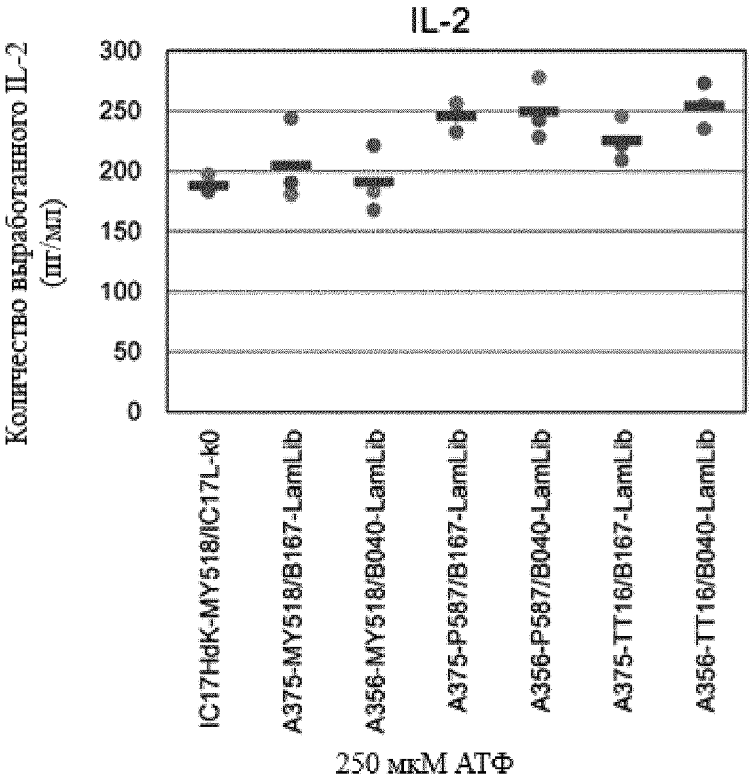

150
100
50
0
10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1}
Относительные световые единицы
Концентрация антитела (мкг/мл)
IC17HdK-G4d/IC17L-k0 0μM ATP
A375-P587/B167-Lamlib 0μM ATP
A356-P587/B040-Lamlib 0μM ATP
A551-P587/B256-Lamlib 0μM ATP
A551-P587/B379-Lamlib 0μM ATP

Б

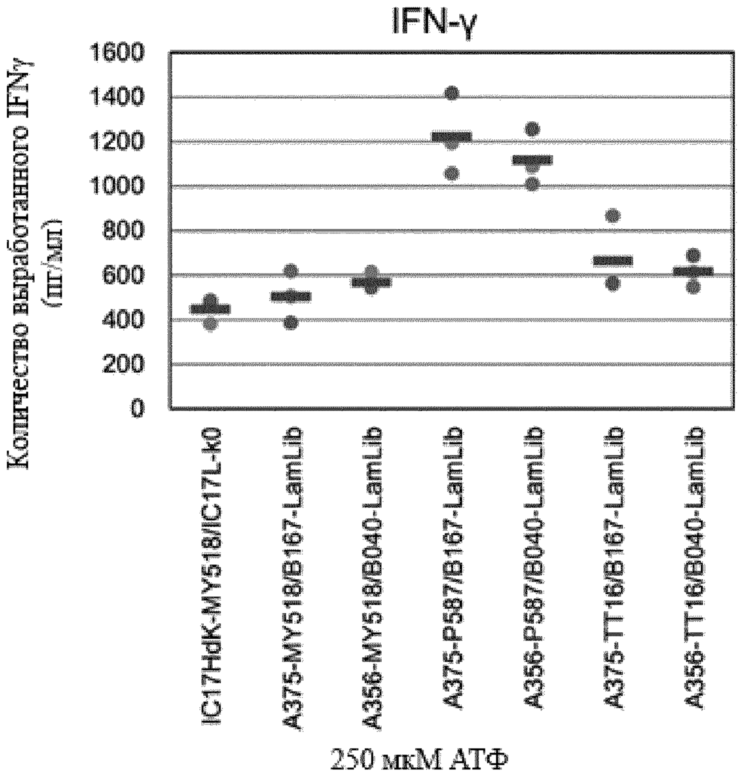

150
100
50
0
10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1}
Относительные световые единицы
Концентрация антитела (мкг/мл)
IC17HdK-G4d/IC17L-k0 250μM ATP
A375-P587/B167-Lamlib 250μM ATP
A356-P587/B040-Lamlib 250μM ATP
A551-P587/B256-Lamlib 250μM ATP
A551-P587/B379-Lamlib 250μM ATP

Фигура 29.

(А)

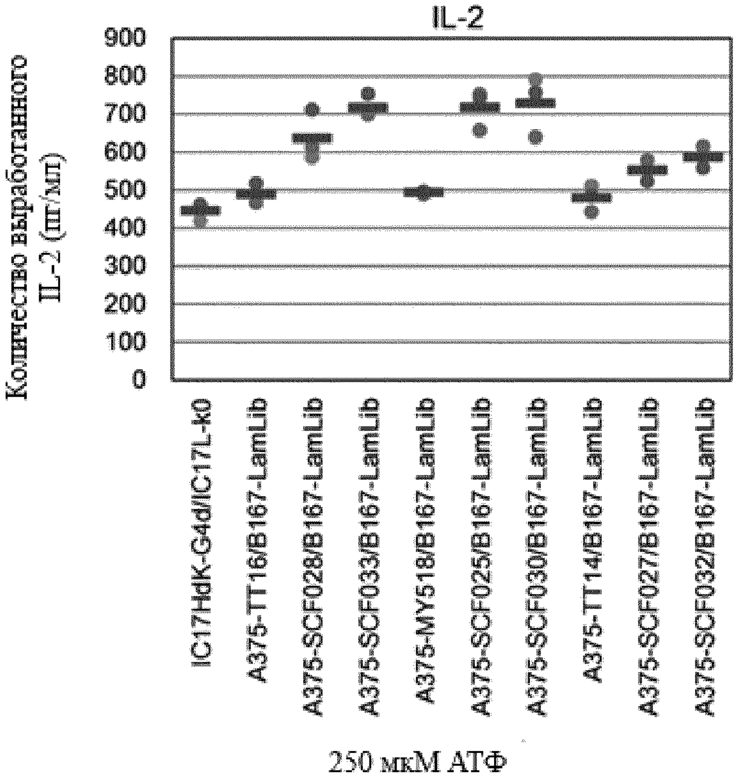

IL-2
Количество выработанного IL-2 (пг/мл)
300
250
200
150
100
50
0
IC17HdK-MY518/IC17L-k0
A375-MY518/B167-LamLib
A356-MY518/B040-LamLib
A375-P587/B167-LamLib
A356-P587/B040-LamLib
A375-TT16/B167-LamLib
A356-TT16/B040-LamLib
250 мкМ АТФ

(Б)

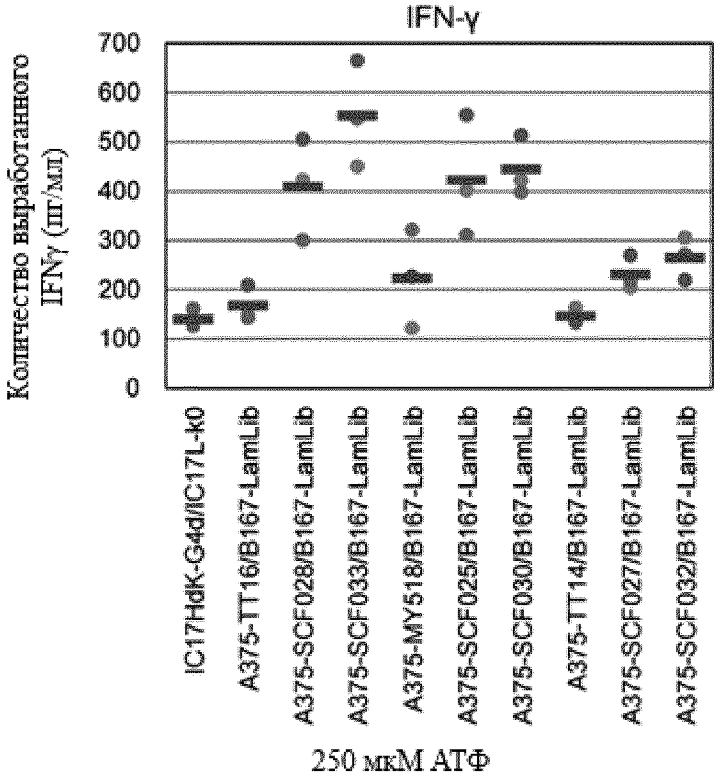

IFN-γ
Количество выработанного IFNγ (пг/мл)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
IC17HdK-MY518/IC17L-k0
A375-MY518/B167-LamLib
A356-MY518/B040-LamLib
A375-P587/B167-LamLib
A356-P587/B040-LamLib
A375-TT16/B167-LamLib
A356-TT16/B040-LamLib
250 мкМ АТФ

Фигура 30.

(A)

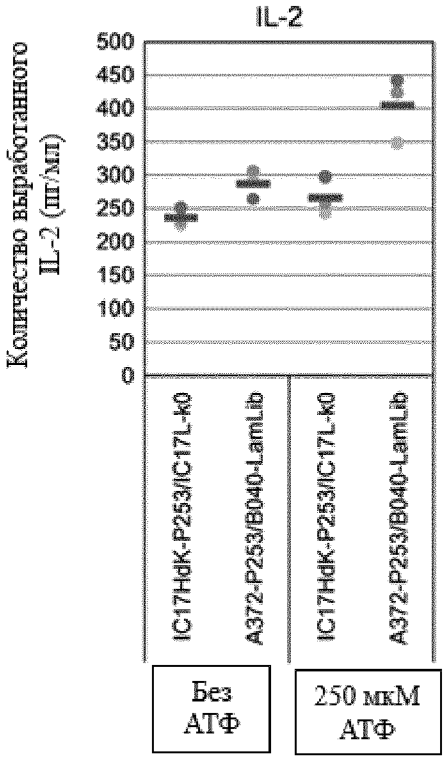

IL-2
Количество выработанного IL-2 (пг/мл)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
IC17HdK-G4d/IC17L-k0
A375-TT16/B167-LamLib
A375-SCF028/B167-LamLib
A375-SCF033/B167-LamLib
A375-MY518/B167-LamLib
A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib
A375-TT14/B167-LamLib
A375-SCF027/B167-LamLib
A375-SCF032/B167-LamLib
250 мкМ АТФ

(Б)

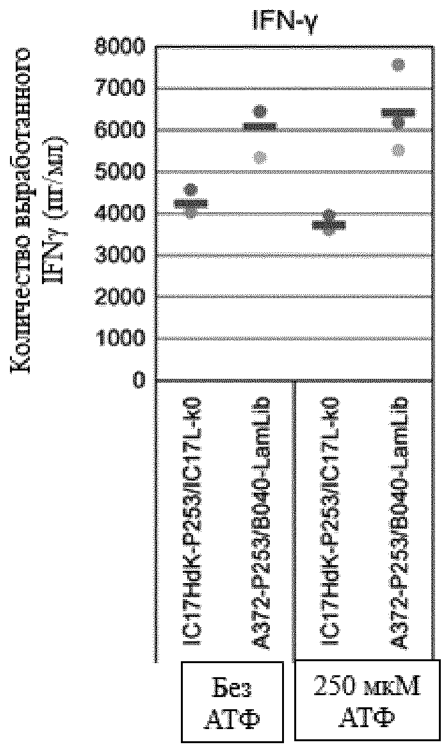

IFN-γ
Количество выработанного IFNγ (пг/мл)
700
600
500
400
300
200
100
0
IC17HdK-G4d/IC17L-k0
A375-TT16/B167-LamLib
A375-SCF028/B167-LamLib
A375-SCF033/B167-LamLib
A375-MY518/B167-LamLib
A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib
A375-TT14/B167-LamLib
A375-SCF027/B167-LamLib
A375-SCF032/B167-LamLib
250 мкМ АТФ

Фигура 31.

(A)

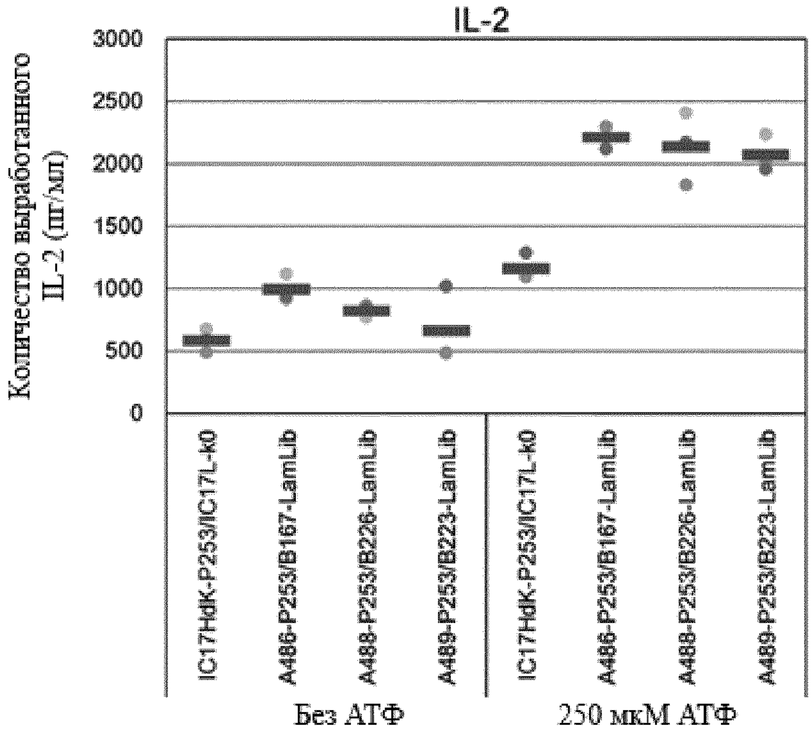

IL-2
Количество выработанного IL-2 (пг/мл)
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
IC17HdK-P253/IC17L-k0
A372-P253/B040-LamLib
IC17HdK-P253/IC17L-k0
A372-P253/B040-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

(Б)

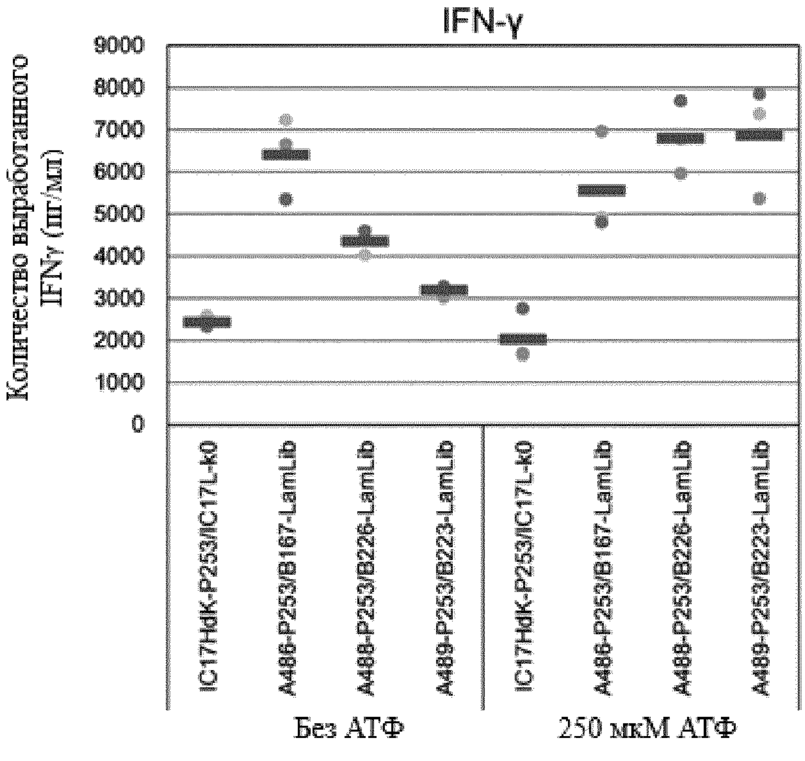

IFN-γ
Количество выработанного IFNγ (пг/мл)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
IC17HdK-P253/IC17L-k0
A372-P253/B040-LamLib
IC17HdK-P253/IC17L-k0
A372-P253/B040-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

Фигура 32.

(A)

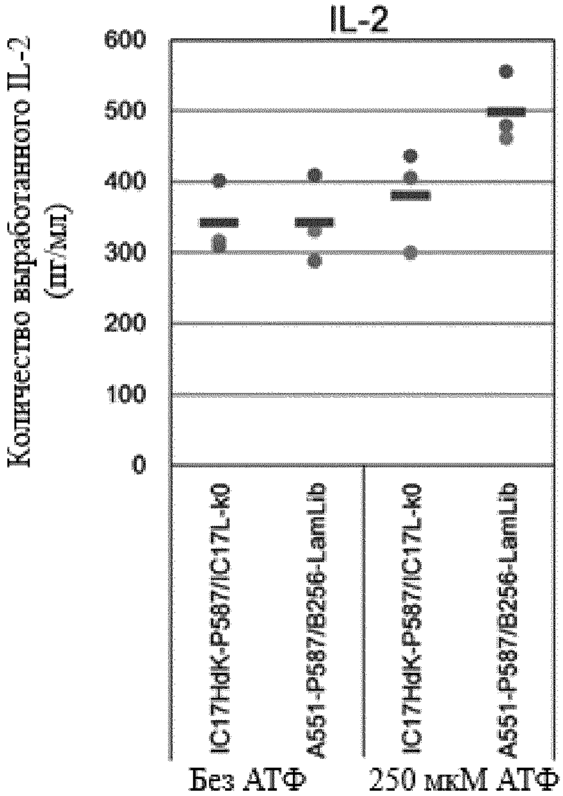

IL-2
Количество выработанного IL-2 (пг/мл)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
IC17HdK-P253/IC17L-k0
A486-P253/B167-LamLib
A488-P253/B226-LamLib
A489-P253/B223-LamLib
IC17HdK-P253/IC17L-k0
A486-P253/B167-LamLib
A488-P253/B226-LamLib
A489-P253/B223-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

(Б)

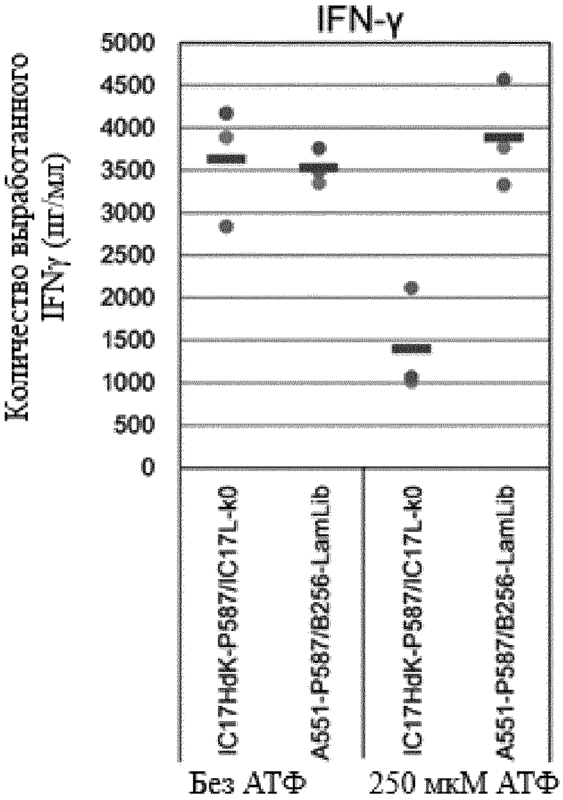

IFN-γ
Количество выработанного IFNγ (пг/мл)
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
IC17HdK-P253/IC17L-k0
A486-P253/B167-LamLib
A488-P253/B226-LamLib
A489-P253/B223-LamLib
IC17HdK-P253/IC17L-k0
A486-P253/B167-LamLib
A488-P253/B226-LamLib
A489-P253/B223-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

Фигура 33.

(A)

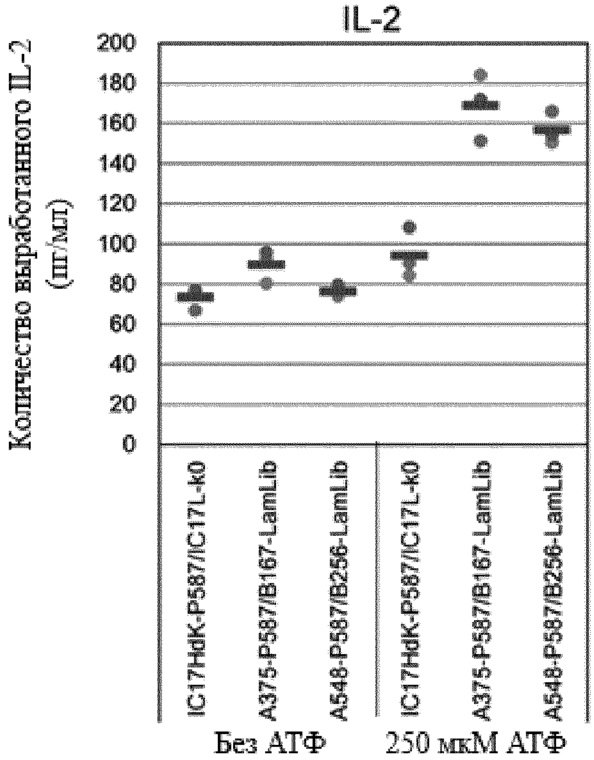

IL-2
Количество выработанного IL-2 (пг/мл)
600
500
400
300
200
100
0
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A551-P587/B256-LamLib
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A551-P587/B256-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

(Б)

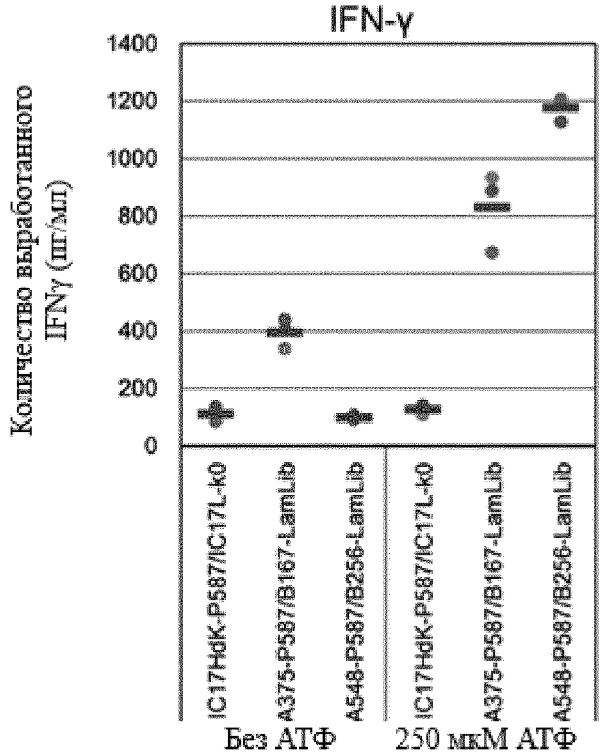

IFN-γ
Количество выработанного IFNγ (пг/мл)
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A551-P587/B256-LamLib
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A551-P587/B256-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

Фигура 34.

(A)

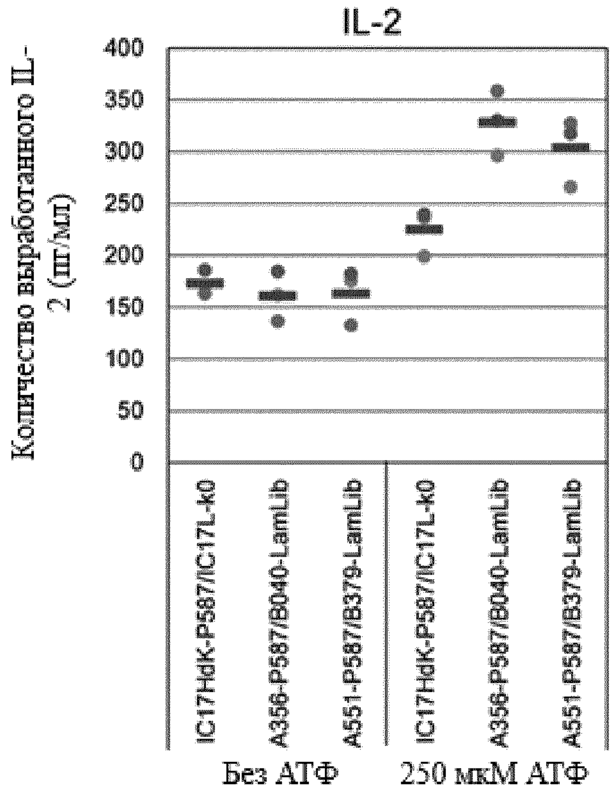

IL-2
Количество выработанного IL-2 (пг/мл)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A375-P587/B167-LamLib
A548-P587/B256-LamLib
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A375-P587/B167-LamLib
A548-P587/B256-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

(Б)

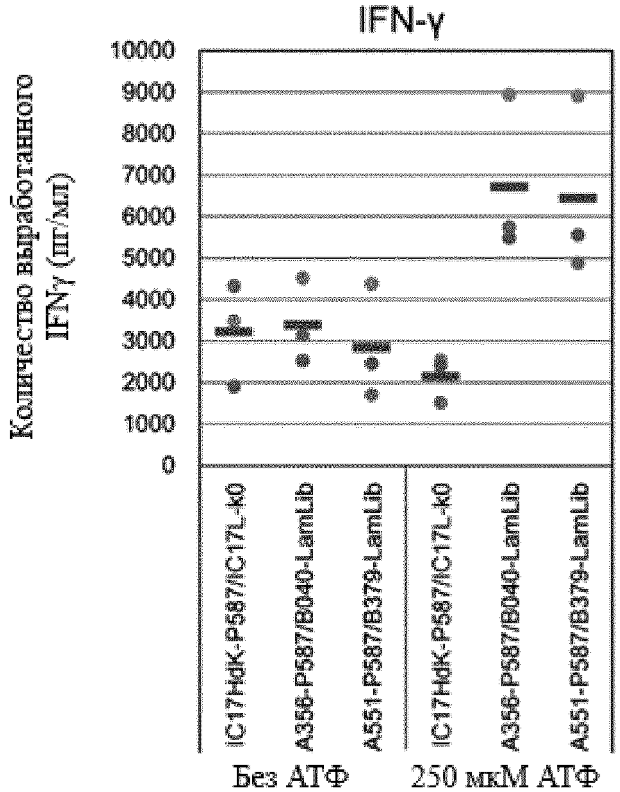

IFN-γ
Количество выработанного IFNγ (пг/мл)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A375-P587/B167-LamLib
A548-P587/B256-LamLib
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A375-P587/B167-LamLib
A548-P587/B256-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

Фигура 35.

(А)

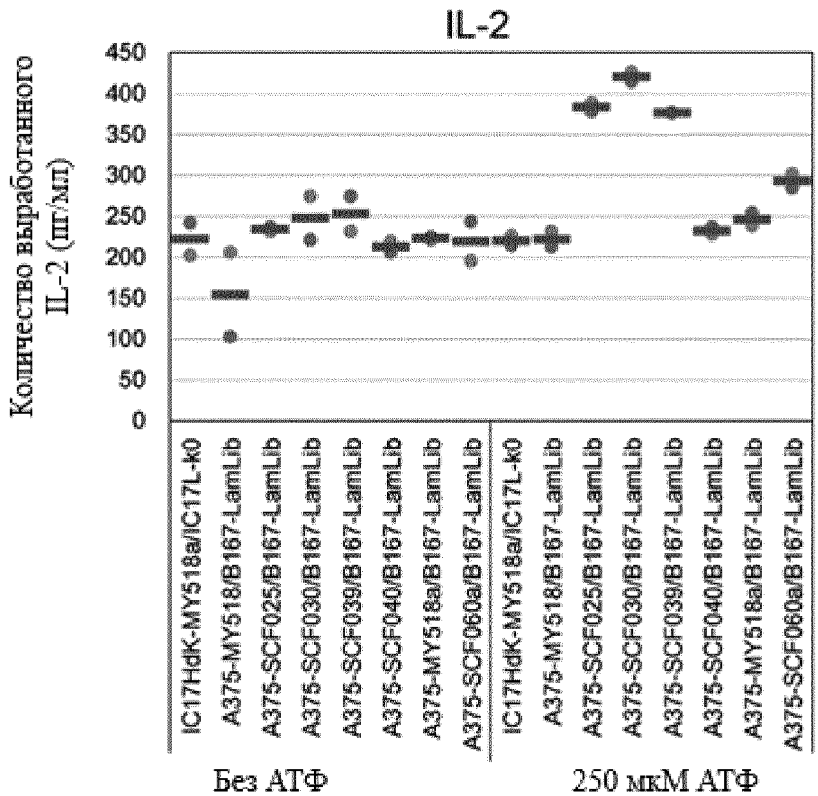

IL-2
Количество выработанного IL-2 (пг/мл)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A356-P587/B040-LamLib
A551-P587/B379-LamLib
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A356-P587/B040-LamLib
A551-P587/B379-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

(Б)

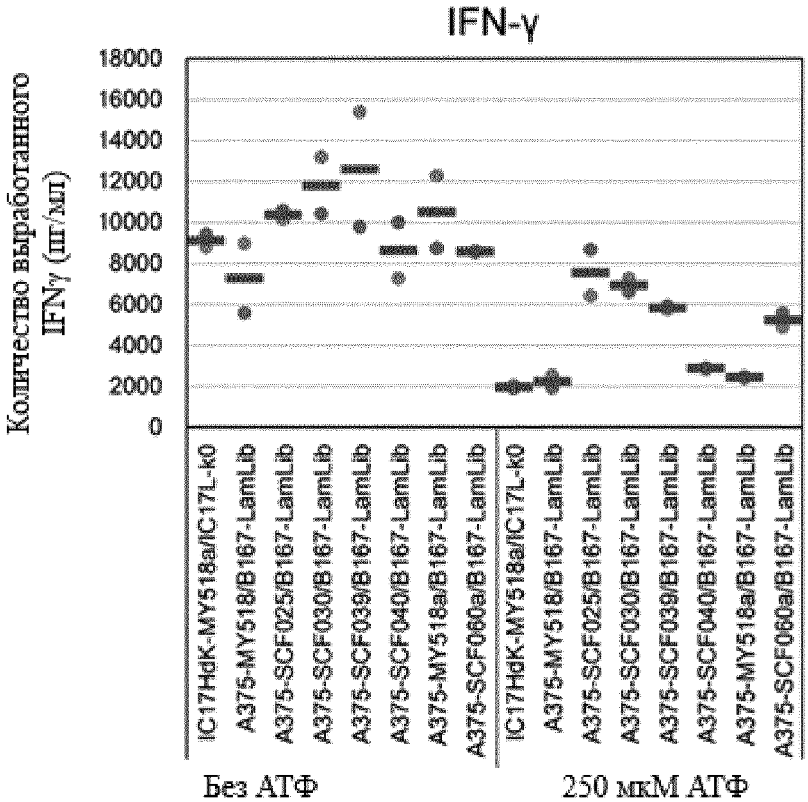

IFN-γ
Количество выработанного IFNγ (пг/мл)
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A356-P587/B040-LamLib
A551-P587/B379-LamLib
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A356-P587/B040-LamLib
A551-P587/B379-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

Фигура 36.

(A)

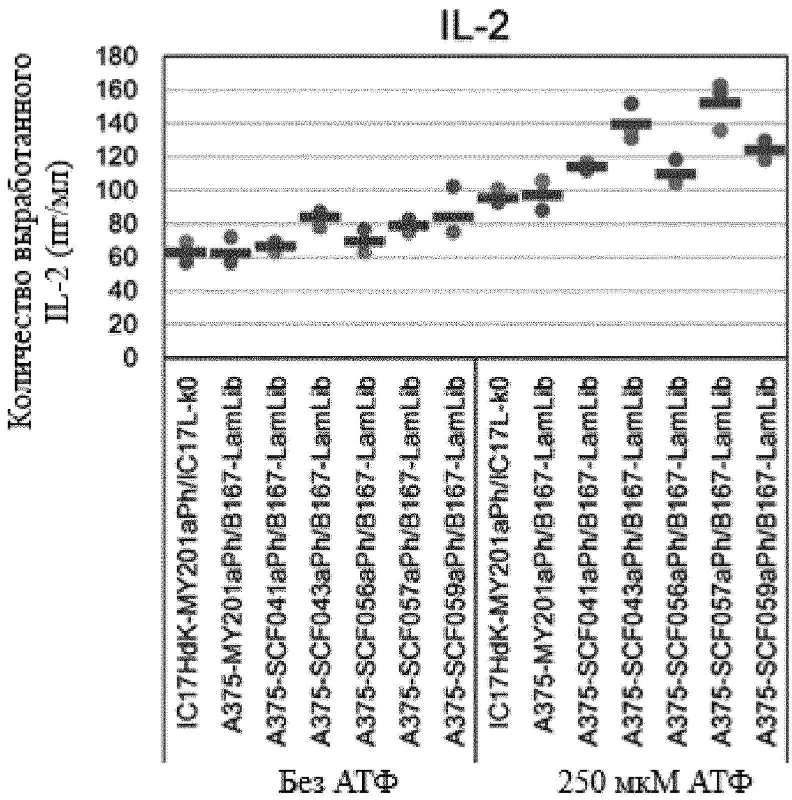

IL-2
Количество выработанного IL-2 (пг/мл)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
IC17HdK-MY518a/IC17L-k0
A375-MY518/B167-LamLib
A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib
A375-SCF039/B167-LamLib
A375-SCF040/B167-LamLib
A375-MY518a/B167-LamLib
A375-SCF060a/B167-LamLib
IC17HdK-MY518a/IC17L-k0
A375-MY518/B167-LamLib
A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib
A375-SCF039/B167-LamLib
A375-SCF040/B167-LamLib
A375-MY518a/B167-LamLib
A375-SCF060a/B167-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

(Б)

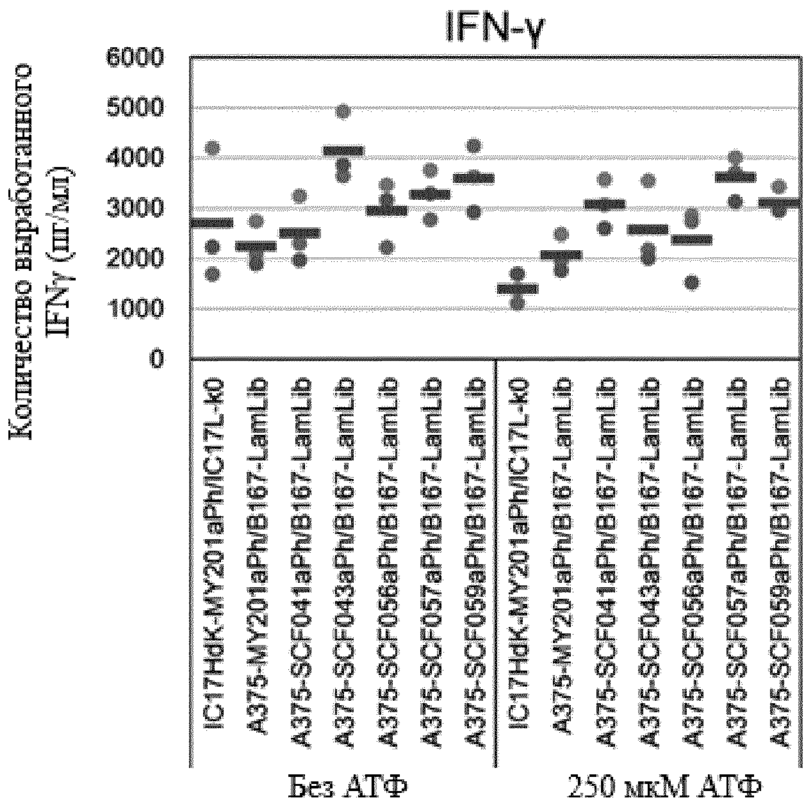

IFN-γ
Количество выработанного IFNγ (пг/мл)
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
IC17HdK-MY518a/IC17L-k0
A375-MY518/B167-LamLib
A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib
A375-SCF039/B167-LamLib
A375-SCF040/B167-LamLib
A375-MY518a/B167-LamLib
A375-SCF060a/B167-LamLib
IC17HdK-MY518a/IC17L-k0
A375-MY518/B167-LamLib
A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib
A375-SCF039/B167-LamLib
A375-SCF040/B167-LamLib
A375-MY518a/B167-LamLib
A375-SCF060a/B167-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

Фигура 37.

(А)

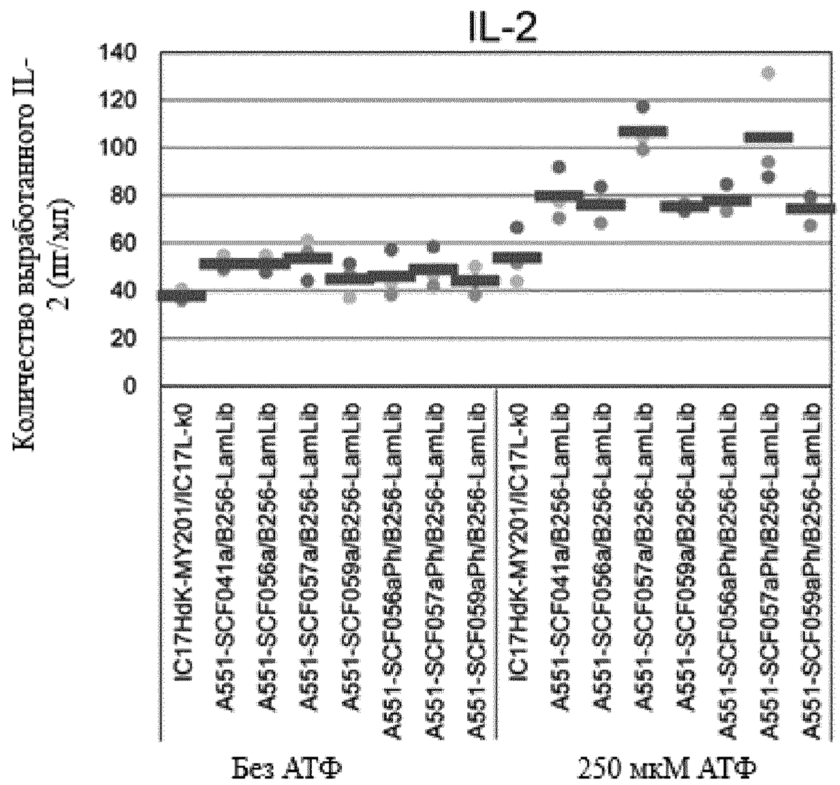

IL-2
Количество выработанного IL-2 (пг/мл)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0
A375-MY201aPh/B167-LamLib
A375-SCF041aPh/B167-LamLib
A375-SCF043aPh/B167-LamLib
A375-SCF056aPh/B167-LamLib
A375-SCF057aPh/B167-LamLib
A375-SCF059aPh/B167-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

(Б)

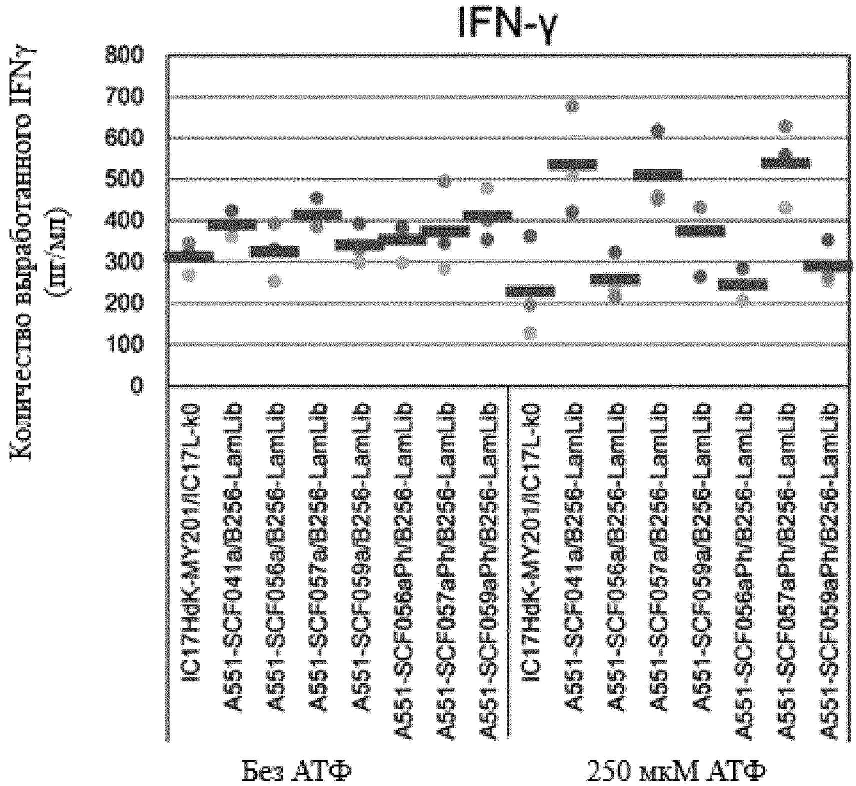

IFN-γ
Количество выработанного IFNγ (пг/мл)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0
A375-MY201aPh/B167-LamLib
A375-SCF041aPh/B167-LamLib
A375-SCF043aPh/B167-LamLib
A375-SCF056aPh/B167-LamLib
A375-SCF057aPh/B167-LamLib
A375-SCF059aPh/B167-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

Фигура 38.

(A)

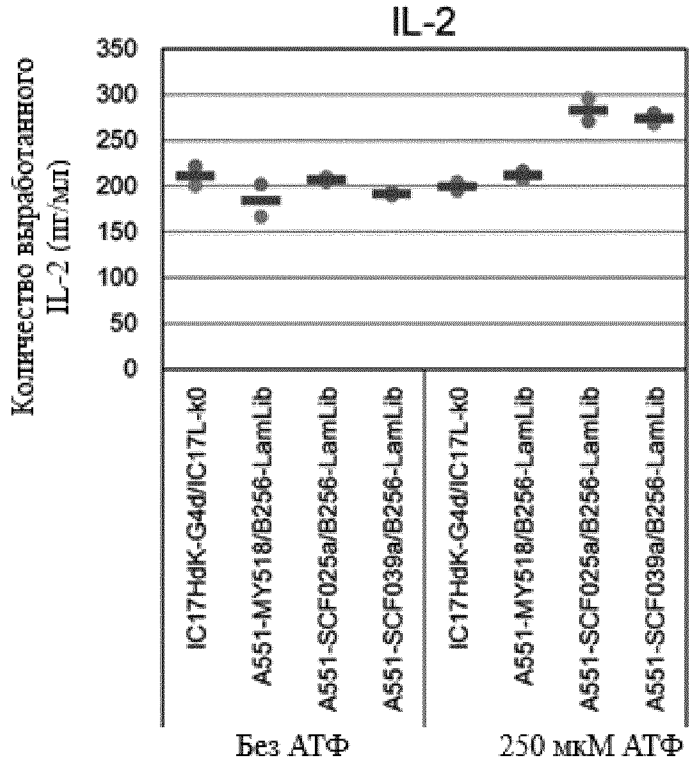

IL-2
Количество выработанного IL-2 (пг/мл)
140
120
100
80
60
40
20
0
IC17HdK-MY201/IC17L-k0
A551-SCF041a/B256-LamLib
A551-SCF056a/B256-LamLib
A551-SCF057a/B256-LamLib
A551-SCF059a/B256-LamLib
A551-SCF056aPh/B256-LamLib
A551-SCF057aPh/B256-LamLib
A551-SCF059aPh/B256-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

(Б)

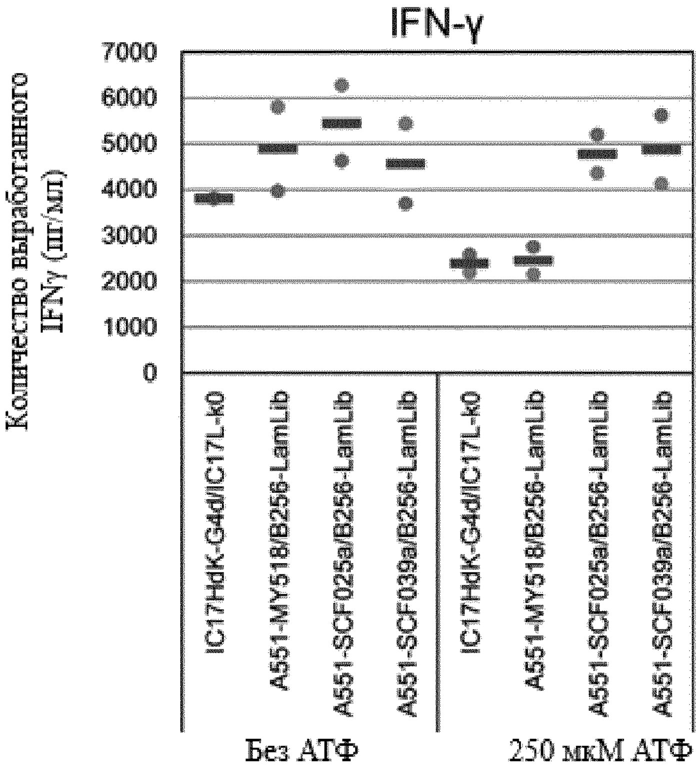

IFN-γ
Количество выработанного IFNγ (пг/мл)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
IC17HdK-MY201/IC17L-k0
A551-SCF041a/B256-LamLib
A551-SCF056a/B256-LamLib
A551-SCF057a/B256-LamLib
A551-SCF059a/B256-LamLib
A551-SCF056aPh/B256-LamLib
A551-SCF057aPh/B256-LamLib
A551-SCF059aPh/B256-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

Фигура 39.

(A)

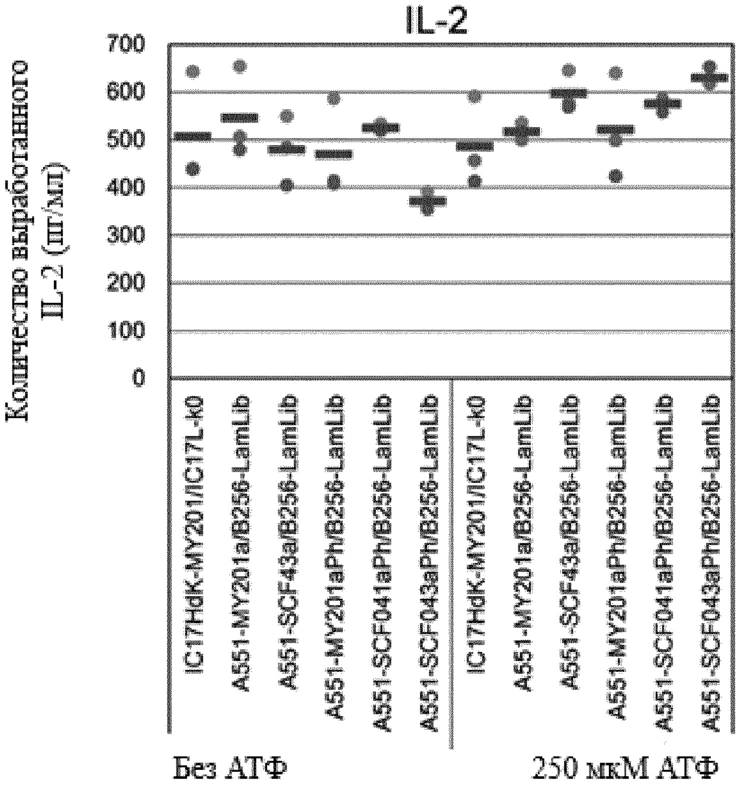

IL-2
Количество выработанного IL-2 (пг/мл)
350
300
250
200
150
100
50
0
IC17HdK-G4d/IC17L-k0
A551-MY518/B256-LamLib
A551-SCF025a/B256-LamLib
A551-SCF039a/B256-LamLib
IC17HdK-G4d/IC17L-k0
A551-MY518/B256-LamLib
A551-SCF025a/B256-LamLib
A551-SCF039a/B256-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

(Б)

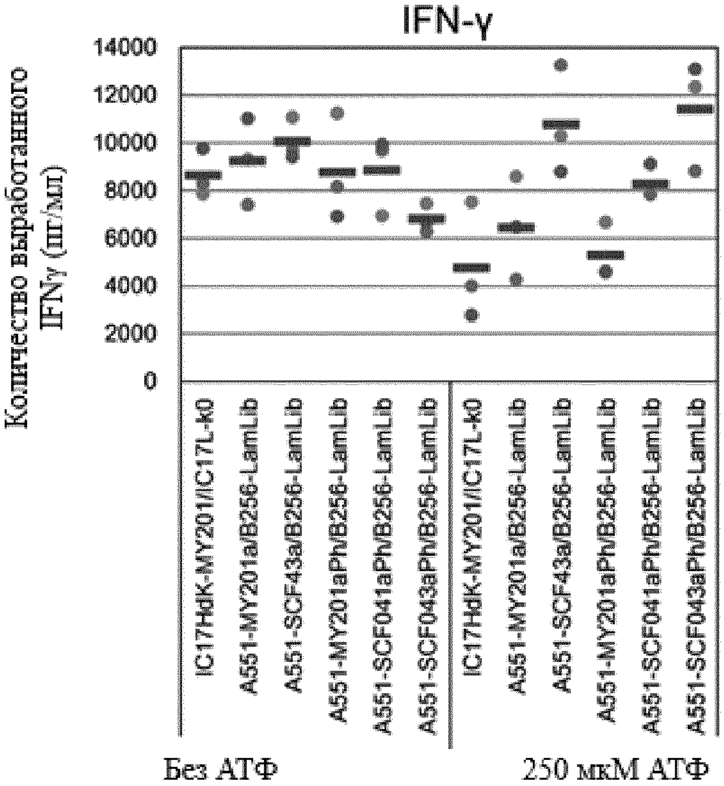

IFN-γ
Количество выработанного IFNγ (пг/мл)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
IC17HdK-G4d/IC17L-k0
A551-MY518/B256-LamLib
A551-SCF025a/B256-LamLib
A551-SCF039a/B256-LamLib
IC17HdK-G4d/IC17L-k0
A551-MY518/B256-LamLib
A551-SCF025a/B256-LamLib
A551-SCF039a/B256-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

Фигура 40.

(А)

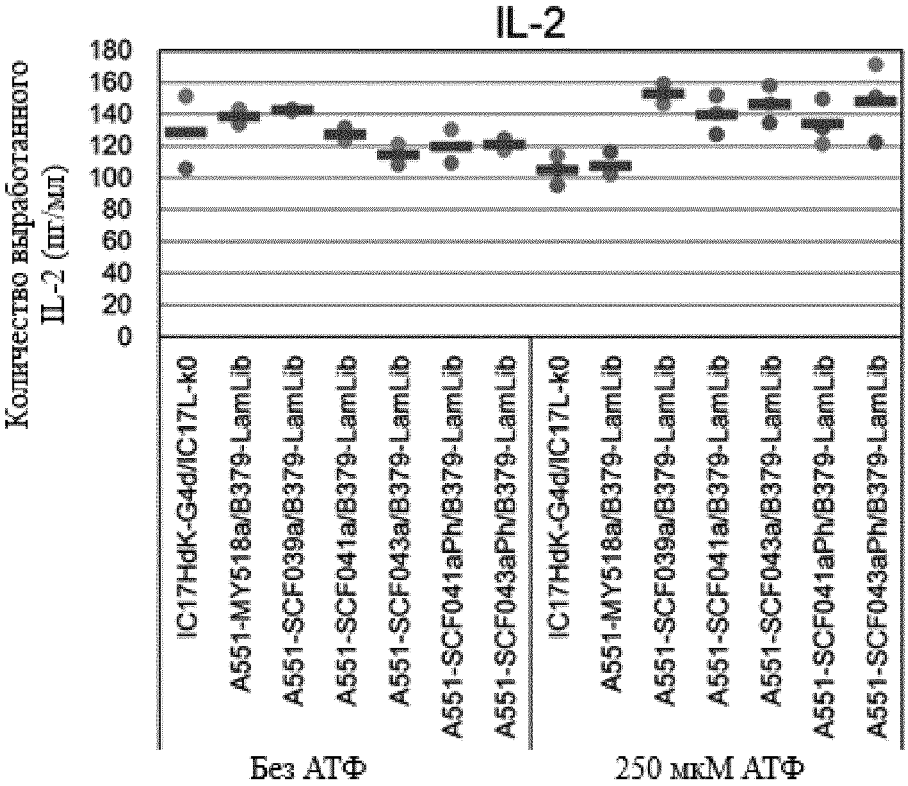

IL-2
Количество выработанного IL-2 (пг/мл)
700
600
500
400
300
200
100
0
IC17HdK-MY201/IC17L-k0
A551-MY201a/B256-LamLib
A551-SCF43a/B256-LamLib
A551-MY201aPh/B256-LamLib
A551-SCF041aPh/B256-LamLib
A551-SCF043aPh/B256-LamLib
IC17HdK-MY201/IC17L-k0
A551-MY201a/B256-LamLib
A551-SCF43a/B256-LamLib
A551-MY201aPh/B256-LamLib
A551-SCF041aPh/B256-LamLib
A551-SCF043aPh/B256-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

(Б)

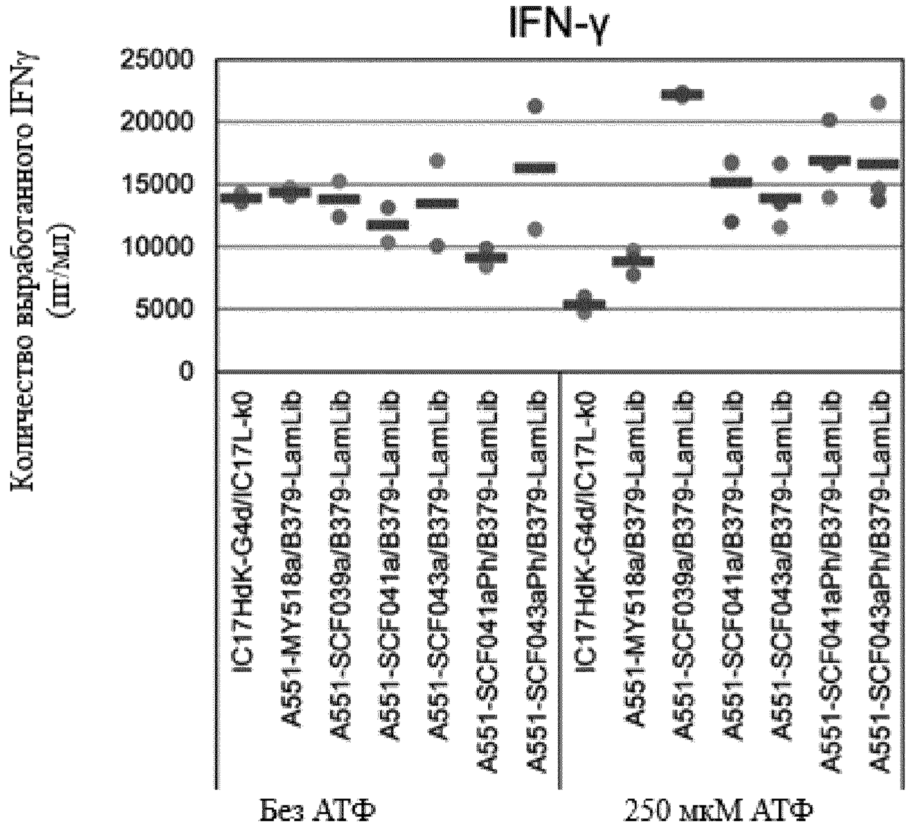

IFN-γ
Количество выработанного IFNγ (пг/мл)
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
IC17HdK-MY201/IC17L-k0
A551-MY201a/B256-LamLib
A551-SCF43a/B256-LamLib
A551-MY201aPh/B256-LamLib
A551-SCF041aPh/B256-LamLib
A551-SCF043aPh/B256-LamLib
IC17HdK-MY201/IC17L-k0
A551-MY201a/B256-LamLib
A551-SCF43a/B256-LamLib
A551-MY201aPh/B256-LamLib
A551-SCF041aPh/B256-LamLib
A551-SCF043aPh/B256-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

Фигура 41.

(A)

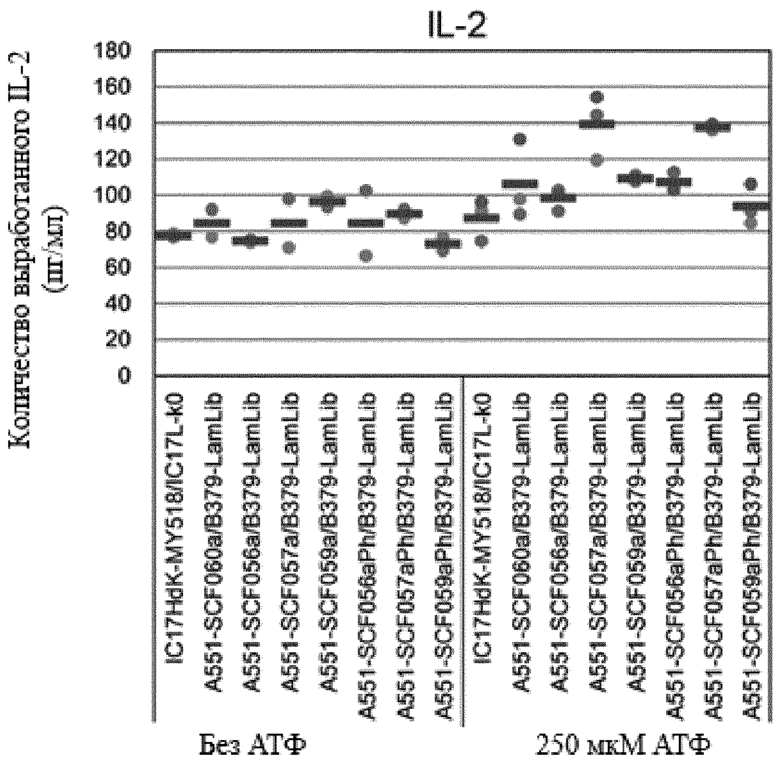

IL-2
Количество выработанного IL-2 (пг/мл)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
IC17HdK-G4d/IC17L-k0
A551-MY518a/B379-LamLib
A551-SCF039a/B379-LamLib
A551-SCF041a/B379-LamLib
A551-SCF043a/B379-LamLib
A551-SCF041aPh/B379-LamLib
A551-SCF043aPh/B379-LamLib
IC17HdK-G4d/IC17L-k0
A551-MY518a/B379-LamLib
A551-SCF039a/B379-LamLib
A551-SCF041a/B379-LamLib
A551-SCF043a/B379-LamLib
A551-SCF041aPh/B379-LamLib
A551-SCF043aPh/B379-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

(Б)

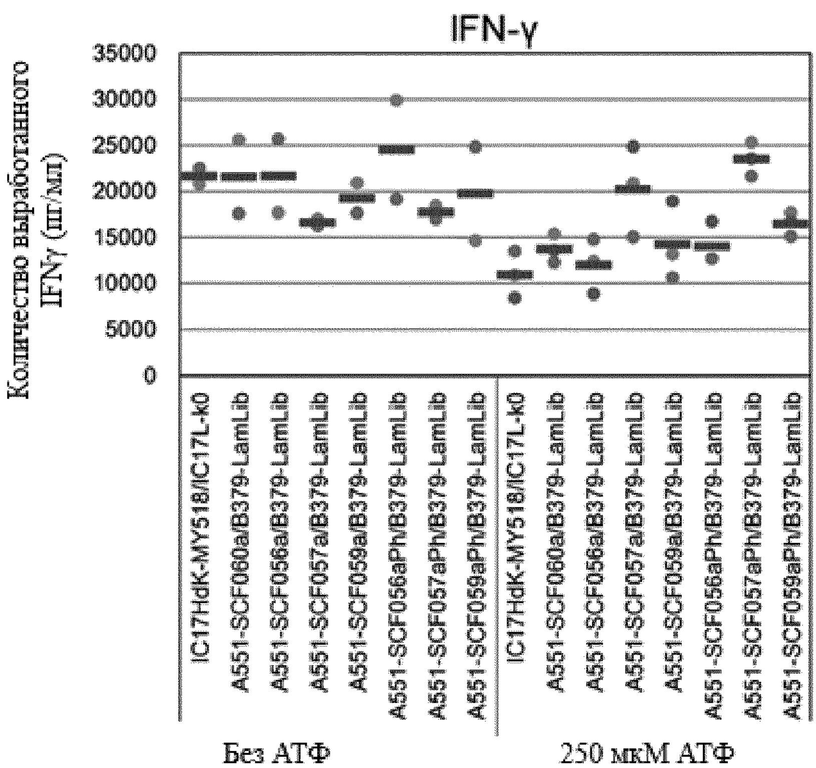

IFN-γ
Количество выработанного IFNγ (пг/мл)
25000
20000
15000
10000
5000
0
IC17HdK-G4d/IC17L-k0
A551-MY518a/B379-LamLib
A551-SCF039a/B379-LamLib
A551-SCF041a/B379-LamLib
A551-SCF043a/B379-LamLib
A551-SCF041aPh/B379-LamLib
A551-SCF043aPh/B379-LamLib
IC17HdK-G4d/IC17L-k0
A551-MY518a/B379-LamLib
A551-SCF039a/B379-LamLib
A551-SCF041a/B379-LamLib
A551-SCF043a/B379-LamLib
A551-SCF041aPh/B379-LamLib
A551-SCF043aPh/B379-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

Фигура 42.

(A)

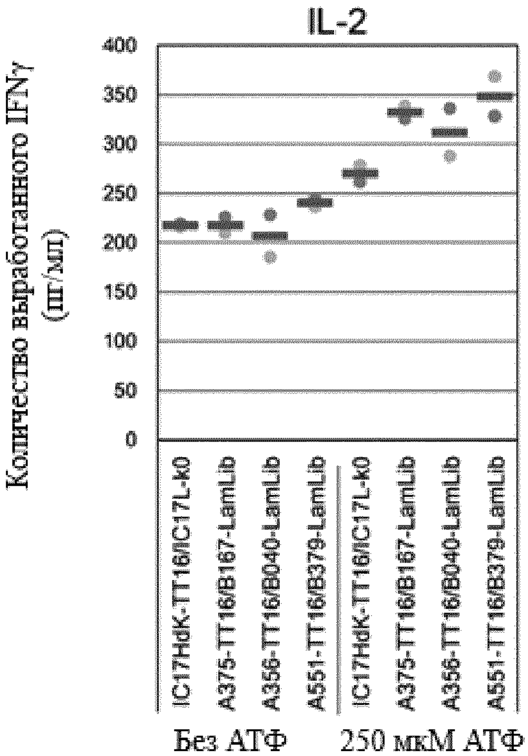

IL-2
Количество выработанного IL-2 (пг/мл)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
IC17HdK-MY518/IC17L-k0
A551-SCF060a/B379-LamLib
A551-SCF056a/B379-LamLib
A551-SCF057a/B379-LamLib
A551-SCF059a/B379-LamLib
A551-SCF056aPh/B379-LamLib
A551-SCF057aPh/B379-LamLib
A551-SCF059aPh/B379-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

(Б)

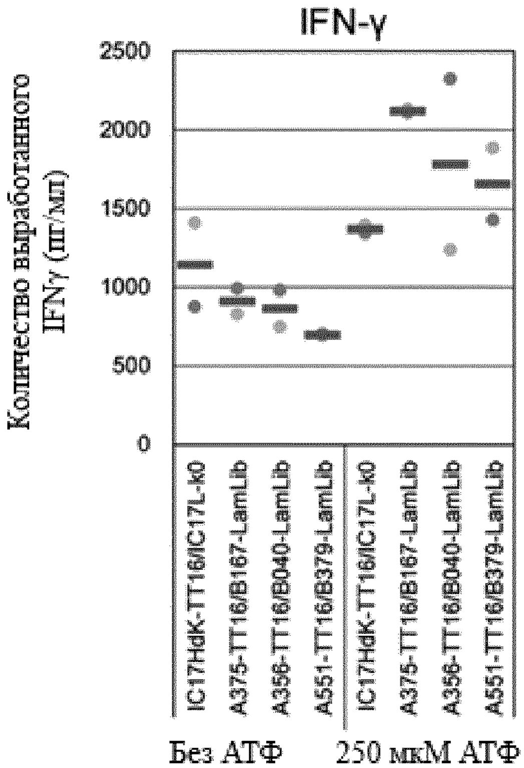

IFN-γ
Количество выработанного IFNγ (пг/мл)
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
IC17HdK-MY518/IC17L-k0
A551-SCF060a/B379-LamLib
A551-SCF056a/B379-LamLib
A551-SCF057a/B379-LamLib
A551-SCF059a/B379-LamLib
A551-SCF056aPh/B379-LamLib
A551-SCF057aPh/B379-LamLib
A551-SCF059aPh/B379-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

Фигура 43.

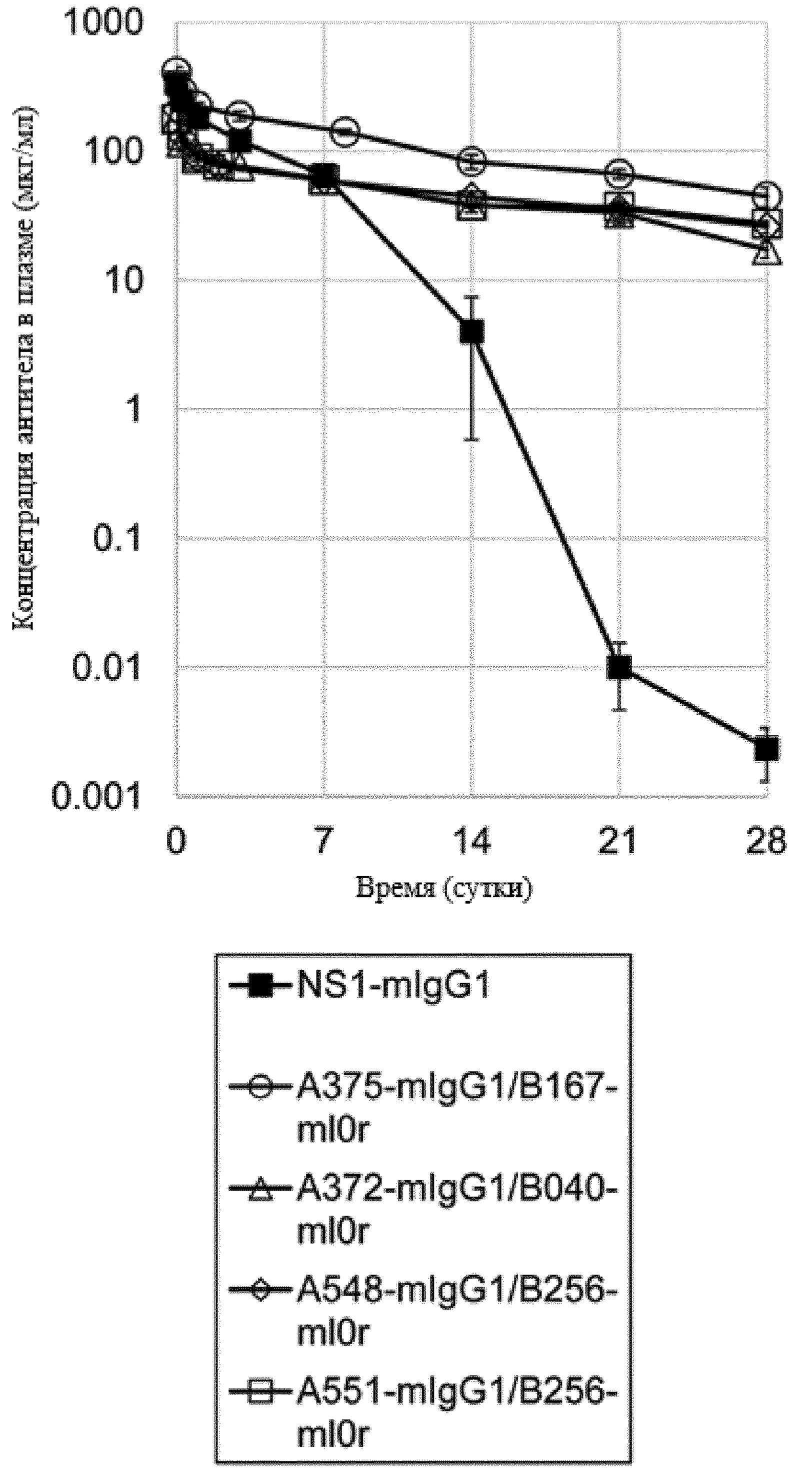
(A)


IL-2
Количество выработанного IFNγ (пг/мл)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
IC17HdK-TT16/IC17L-k0
A375-TT16/B167-LamLib
A356-TT16/B040-LamLib
A551-TT16/B379-LamLib
IC17HdK-TT16/IC17L-k0
A375-TT16/B167-LamLib
A356-TT16/B040-LamLib
A551-TT16/B379-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

(Б)

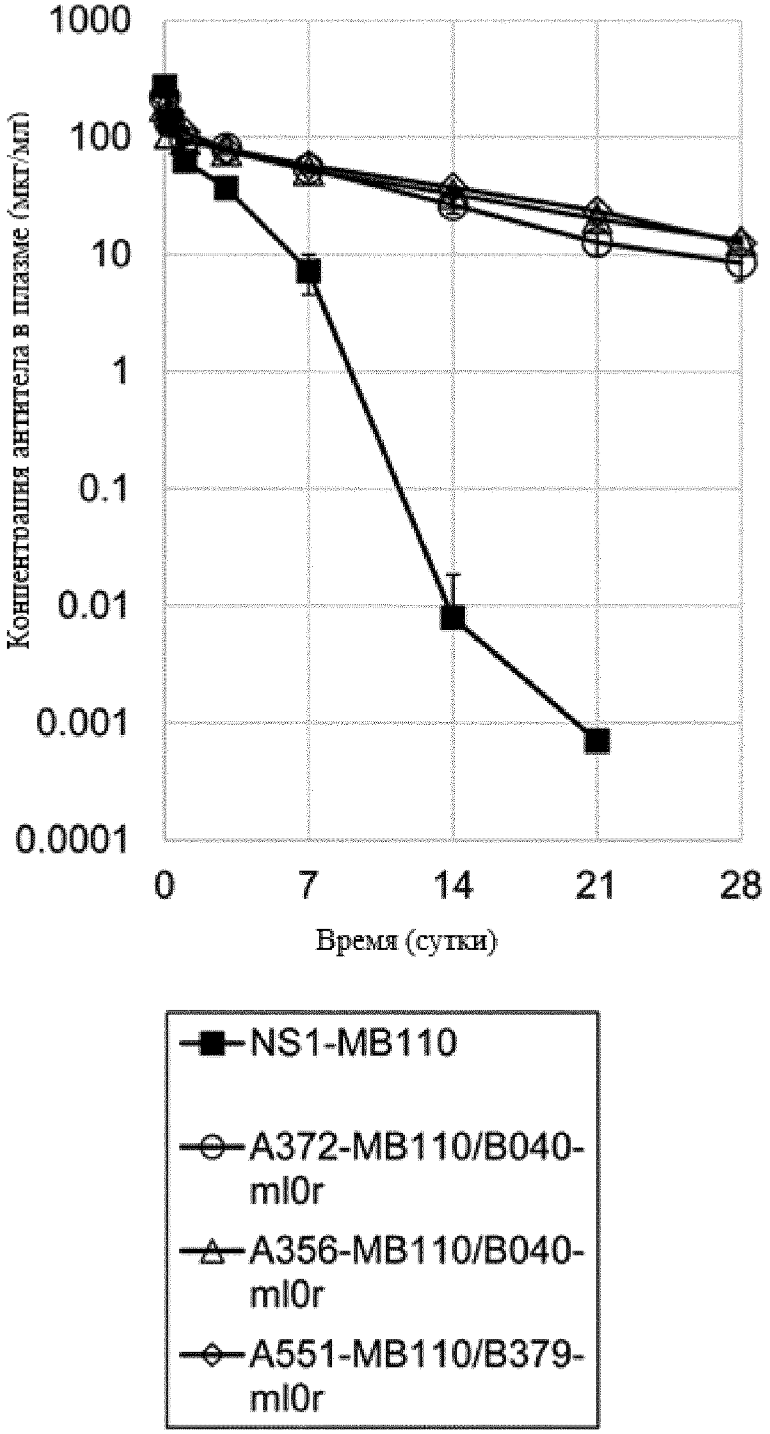

IFN-γ
Количество выработанного IFNγ (пг/мл)
2500
2000
1500
1000
500
0
IC17HdK-TT16/IC17L-k0
A375-TT16/B167-LamLib
A356-TT16/B040-LamLib
A551-TT16/B379-LamLib
IC17HdK-TT16/IC17L-k0
A375-TT16/B167-LamLib
A356-TT16/B040-LamLib
A551-TT16/B379-LamLib
Без АТФ
250 мкМ АТФ

Фигура 44.



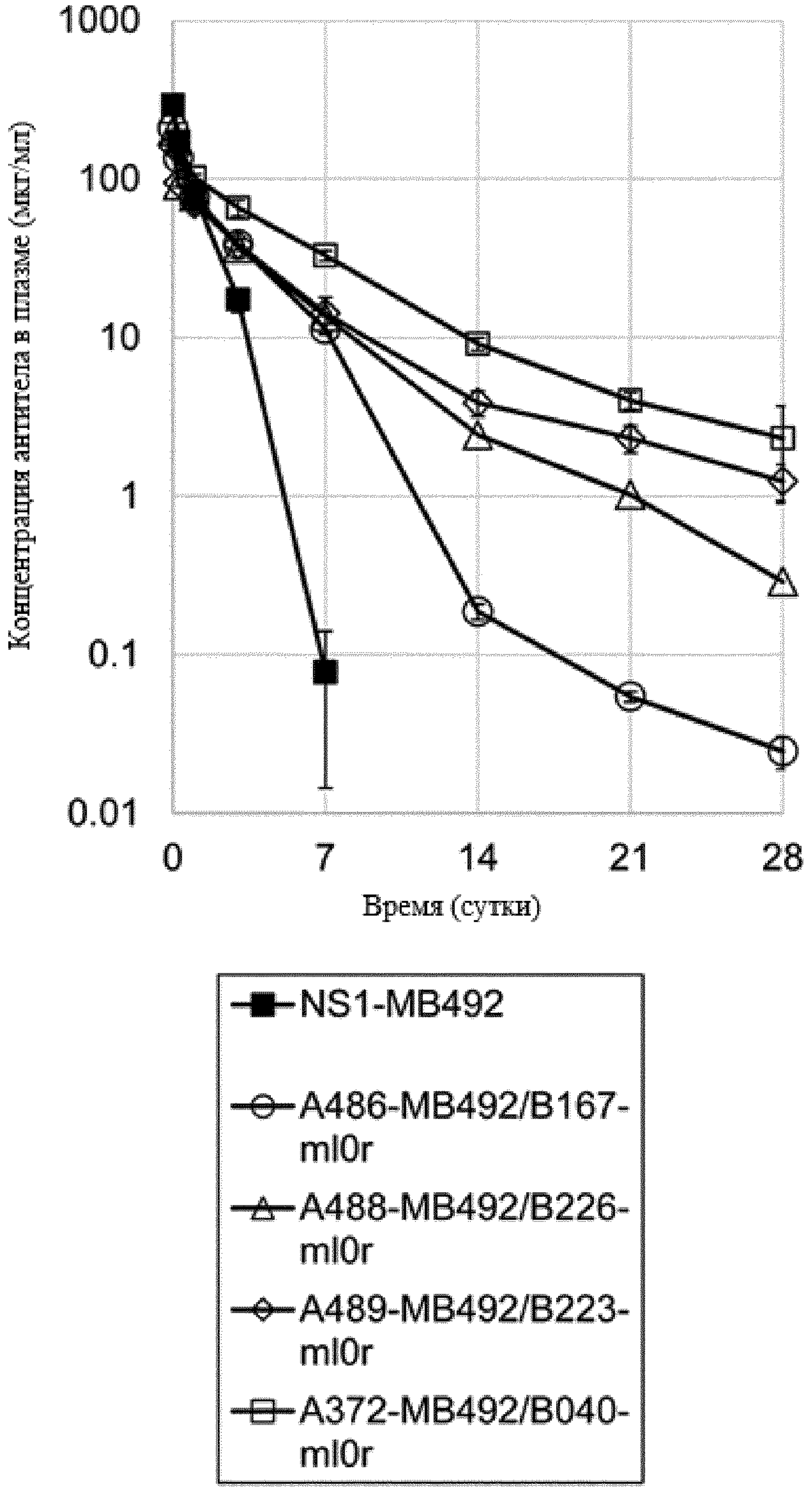
Среднее значение ±SD (по 3 случаям)

Фигура 45.



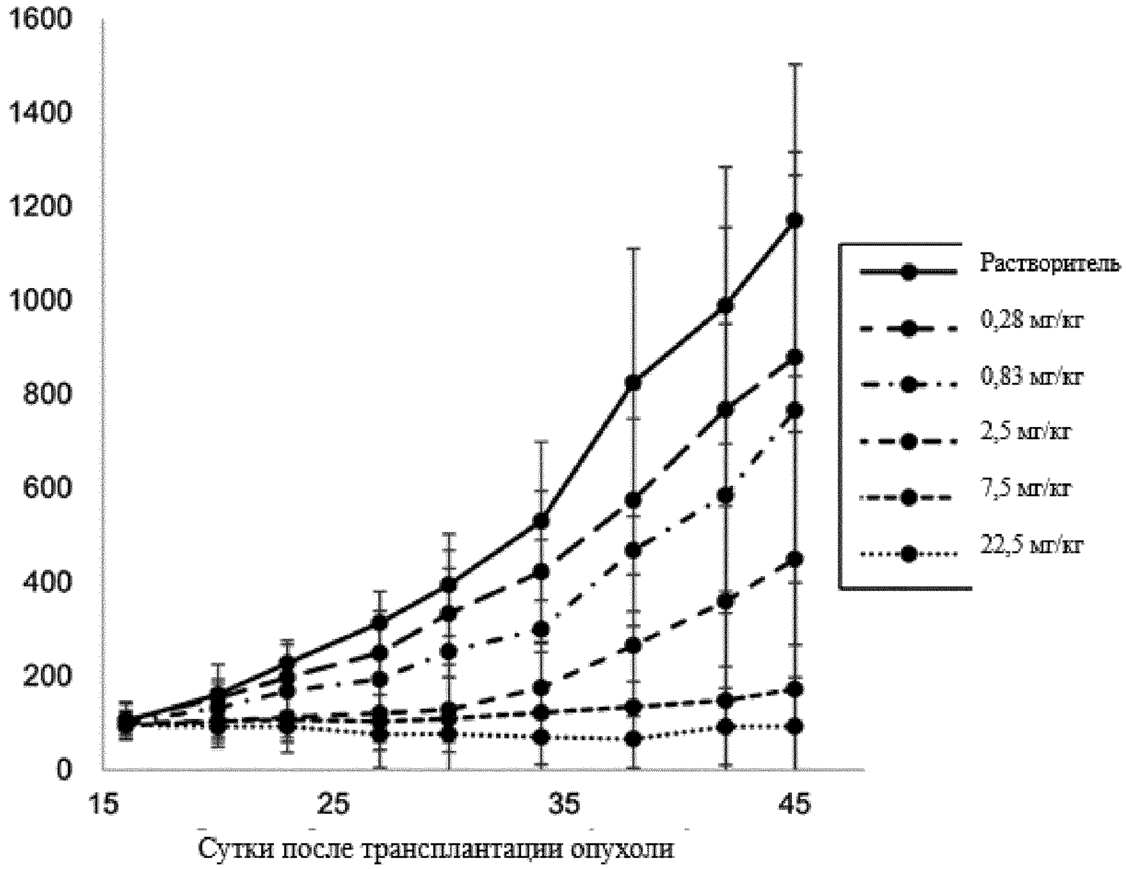
Среднее значение ±SD (по 3 случаям)

Фигура 46.

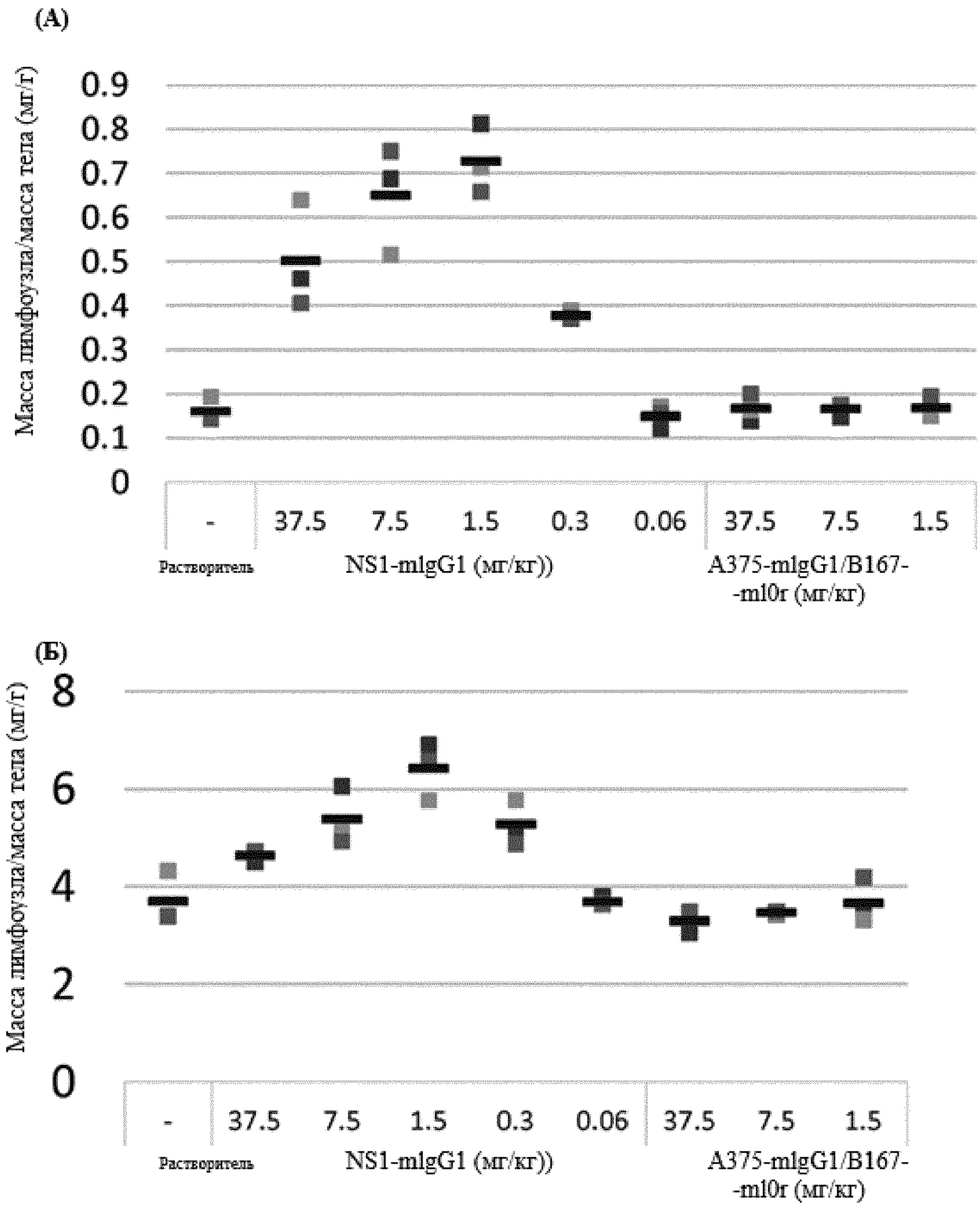


Среднее значение ±SD (по 3 случаям)
Примечание: Среднее значение по 2 случаям для A488-MB492/B226-ml0r

Фигура 47.


1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
15
25
35
45
Сутки после трансплантации опухоли
Растворитель
0,28 мг/кг
0,83 мг/кг
2,5 мг/кг
7,5 мг/кг
22,5 мг/кг

Фигура 48.

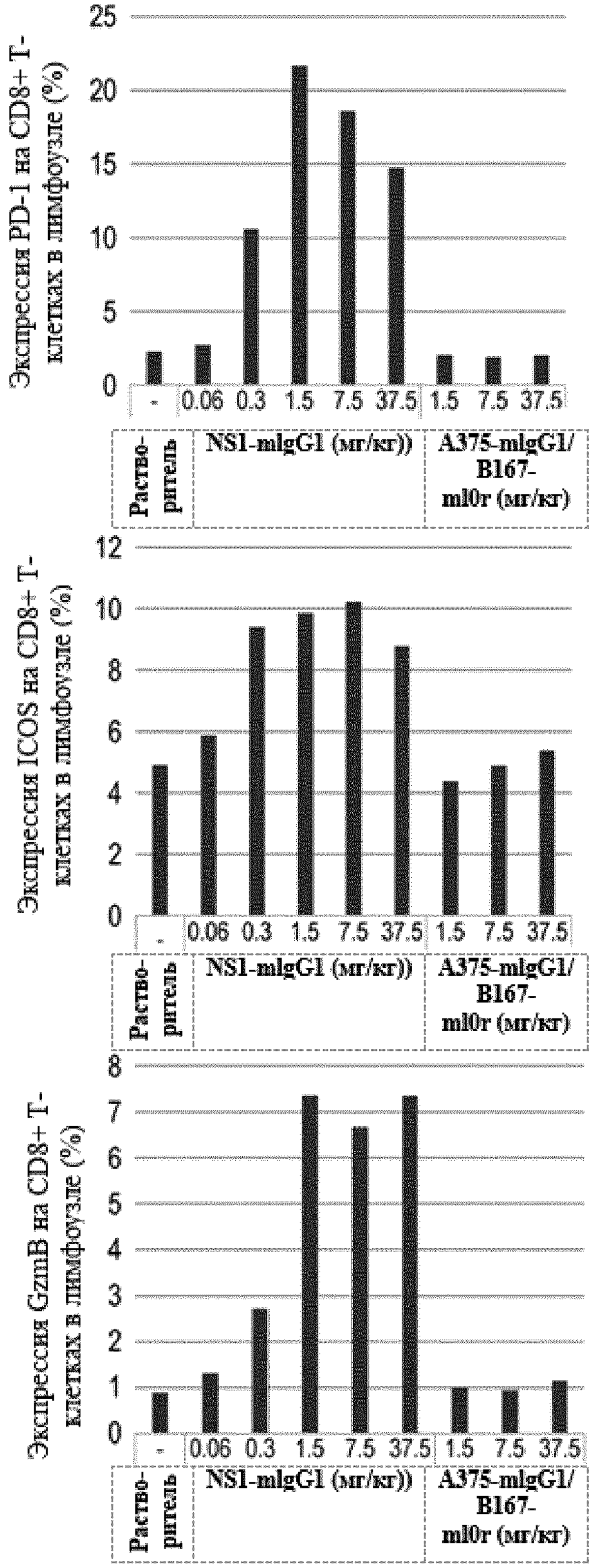

(А)
Масса лимфоузла/масса тела (мг/г)
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-
37.5
7.5
1.5
0.3
0.06
37.5
7.5
1.5
Растворитель
NS1-mIgG1 (мг/кг))
A375-mIgG1/B167--ml0г (мг/кг)
(Б)
Масса лимфоузла/масса тела (мг/г)
8
6
4
2
0
-
37.5
7.5
1.5
0.3
0.06
37.5
7.5
1.5
Растворитель
NS1-mIgG1 (мг/кг))
A375-mIgG1/B167--ml0г (мг/кг)

Фигура 49.

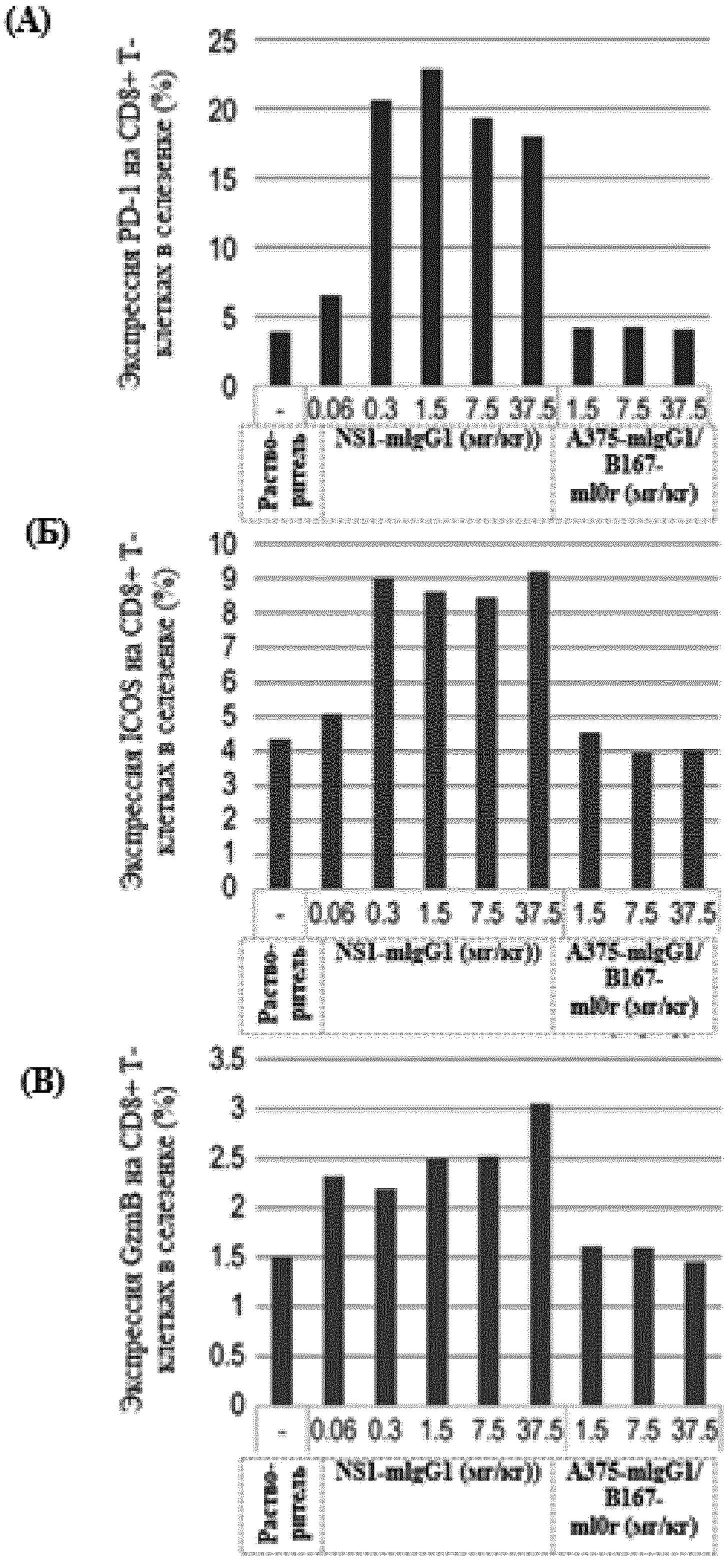
(А)

(Б)

(В)

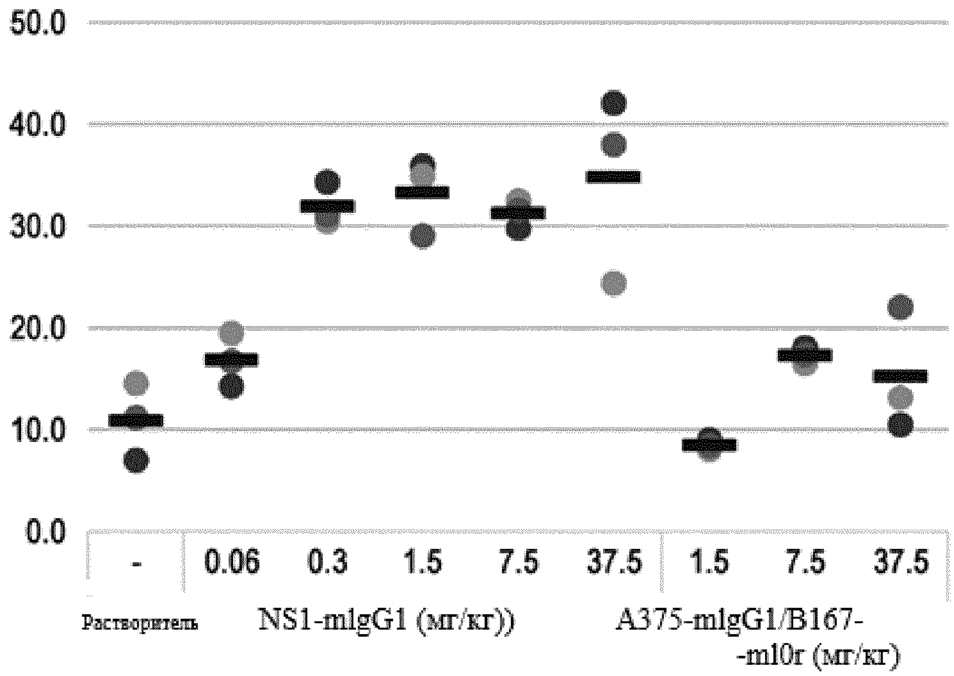


Фигура 50.

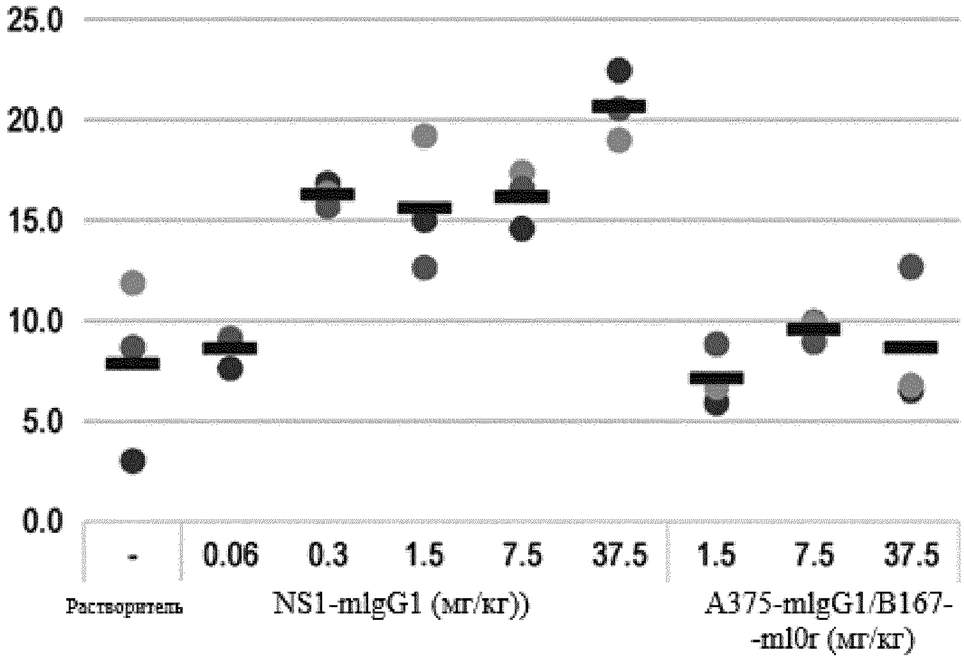

(А)
Экспрессия PD-1 на CD8+ T-клетках в селезенке (%)
25
20
15
10
5
0
-
0.06
0.3
1.5
7.5
37.5
1.5
7.5
37.5
Раство-ритель
NS1-mIgG1 (мг/кг))
A375-mIgG1/B167-mI0r (мг/кг)
(Б)
Экспрессия ICOS на CD8+ T-клетках в селезенке (%)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-
0.06
0.3
1.5
7.5
37.5
1.5
7.5
37.5
Раство-ритель
NS1-mIgG1 (мг/кг))
A375-mIgG1/B167-mI0r (мг/кг)
(В)
Экспрессия GzmB на CD8+ T-клетках в селезенке (%)
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-
0.06
0.3
1.5
7.5
37.5
1.5
7.5
37.5
Раство-ритель
NS1-mIgG1 (мг/кг))
A375-mIgG1/B167-mI0r (мг/кг)

Фигура 51.

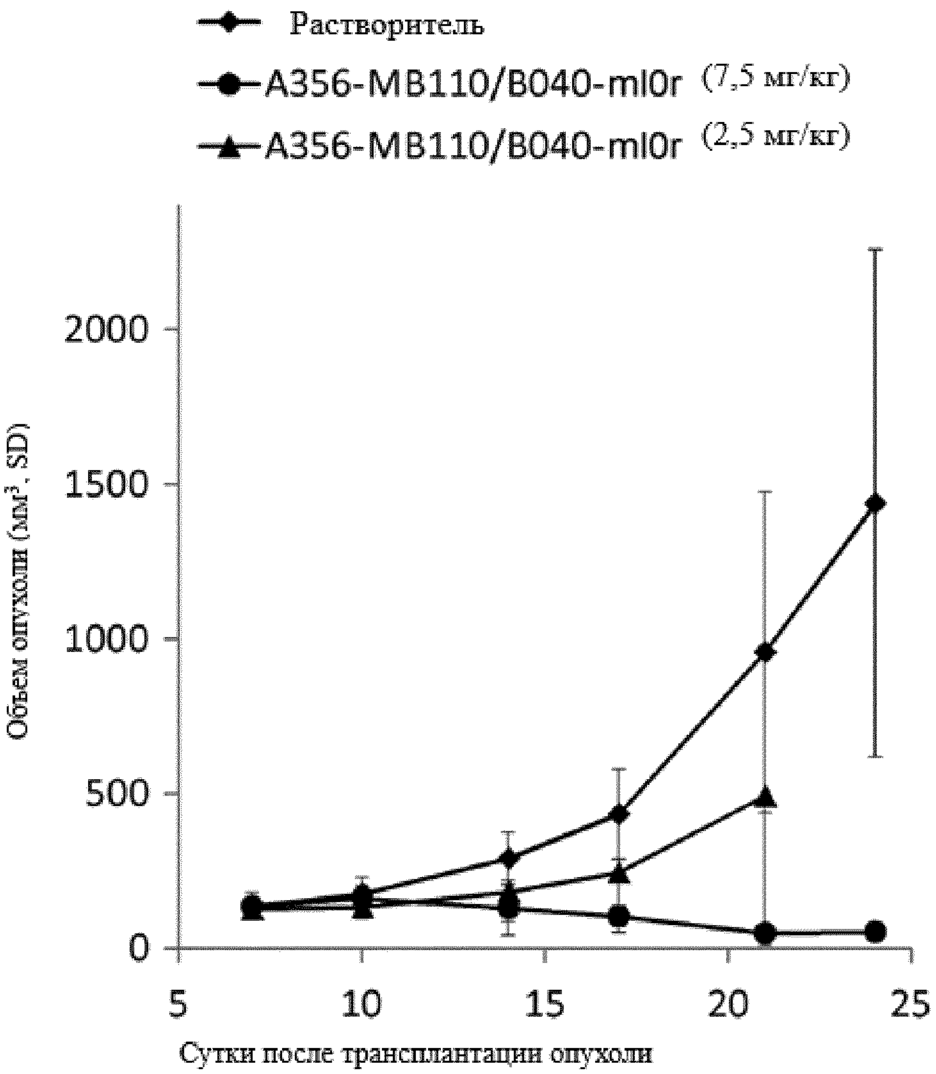
(А)


50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
-
0.06
0.3
1.5
7.5
37.5
1.5
7.5
37.5
Растворитель
NS1-mIgG1 (мг/кг))
A375-mIgG1/B167-
-ml0г (мг/кг)

(Б)

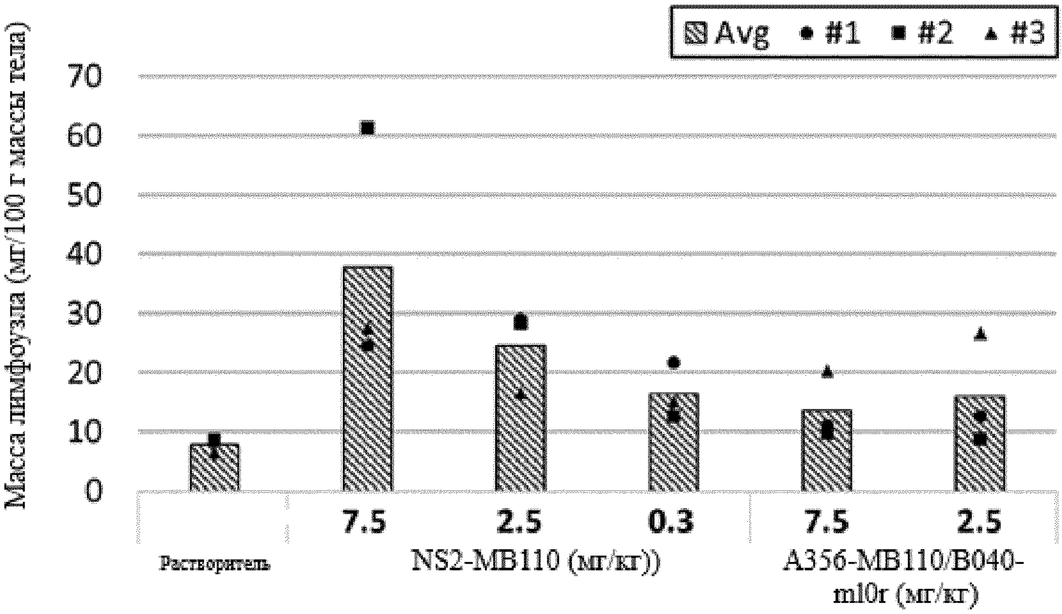

25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
-
0.06
0.3
1.5
7.5
37.5
1.5
7.5
37.5
Растворитель
NS1-mIgG1 (мг/кг))
A375-mIgG1/B167-
-ml0г (мг/кг)

Фигура 52.

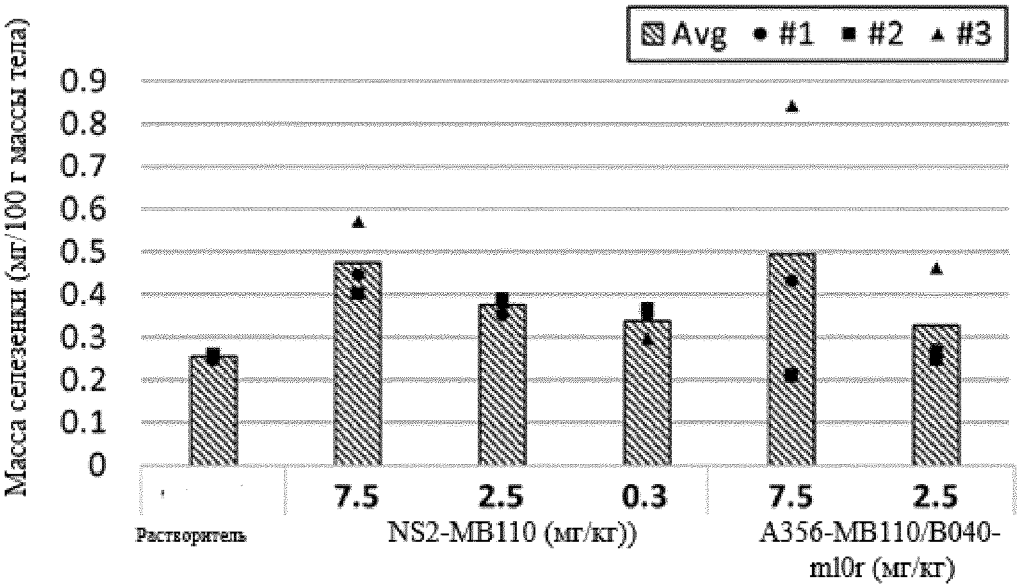

Растворитель
A356-MB110/B040-ml0r (7,5 мг/кг)
A356-MB110/B040-ml0r (2,5 мг/кг)
Объем опухоли (мм^3, SD)
2000
1500
1000
500
0
5
10
15
20
25
Сутки после трансплантации опухоли

Фигура 53.

(А)

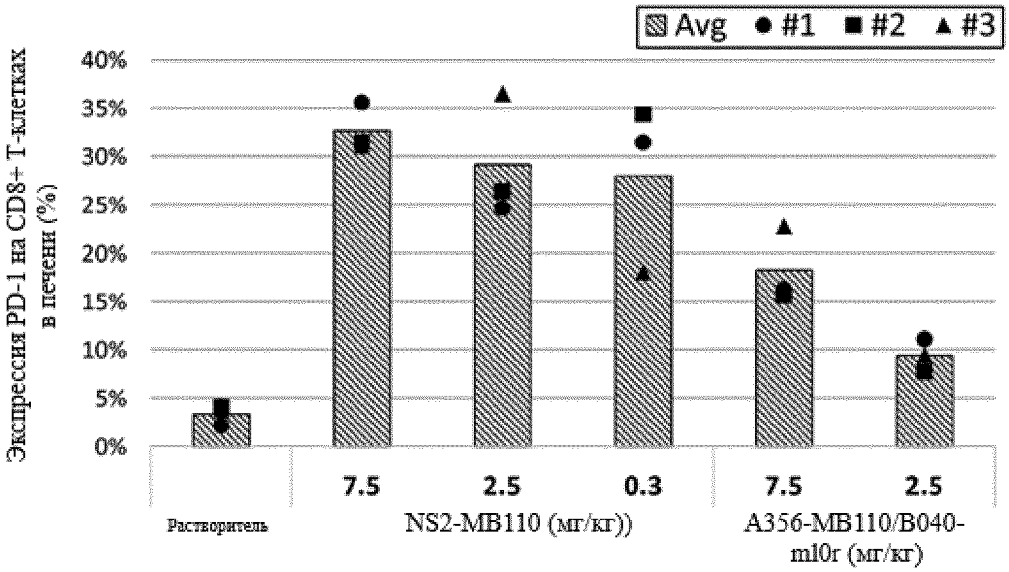

Avg
#1
#2
#3
Масса лимфоузла (мг/100 г массы тела)
70
60
50
40
30
20
10
0
7.5
2.5
0.3
7.5
2.5
Растворитель
NS2-MB110 (мг/кг))
A356-MB110/B040-m10r (мг/кг)

(Б)

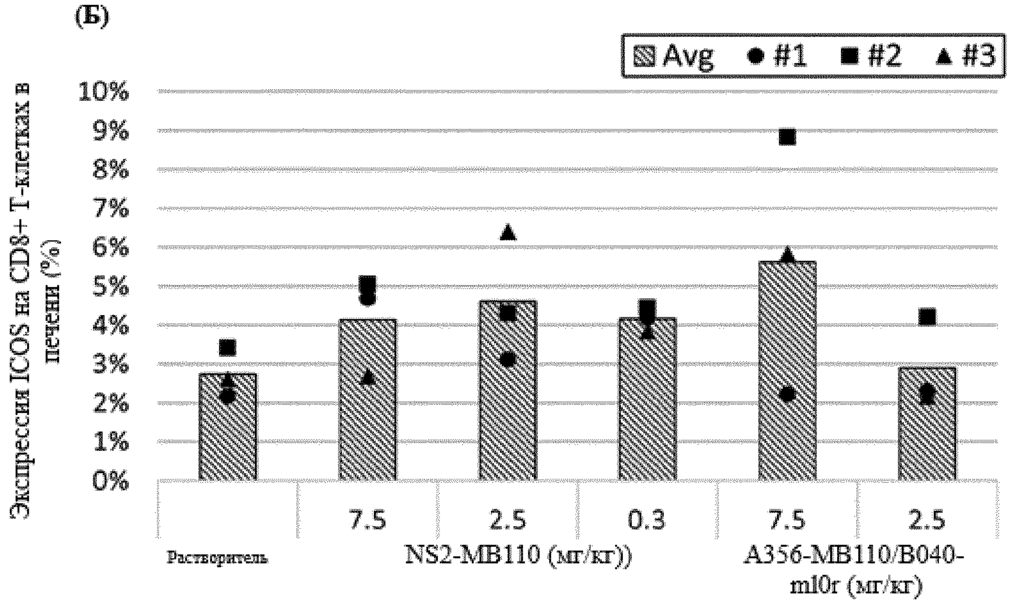

Avg
#1
#2
#3
Масса селезенки (мг/100 г массы тела)
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
7.5
2.5
0.3
7.5
2.5
Растворитель
NS2-MB110 (мг/кг))
A356-MB110/B040-m10r (мг/кг)

Фигура 54.

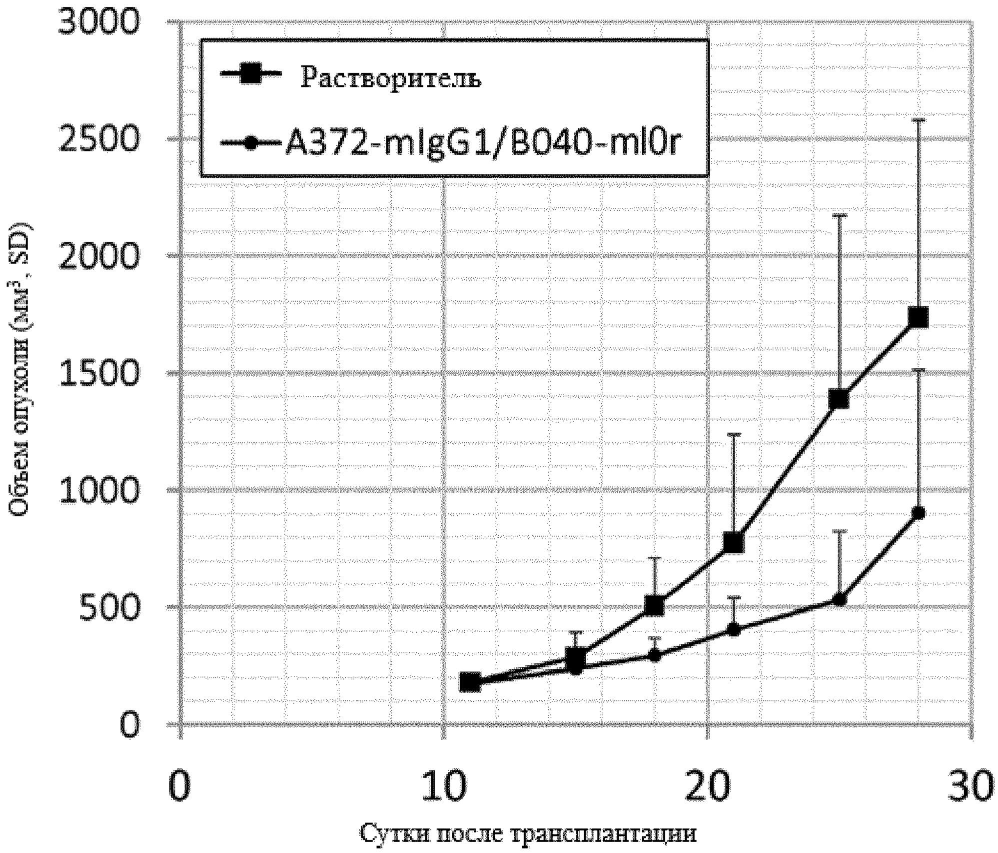
(А)


Avg
#1
#2
#3
Экспрессия PD-1 на CD8+ Т-клетках в печени (%)
40%
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
7.5
2.5
0.3
7.5
2.5
Растворитель
NS2-MB110 (мг/кг))
A356-MB110/B040-ml0r (мг/кг)

(Б)


Avg
#1
#2
#3
Экспрессия ICOS на CD8+ Т-клетках в печени (%)
10%
9%
8%
7%
6%
5%
4%
3%
2%
1%
0%
7.5
2.5
0.3
7.5
2.5
Растворитель
NS2-MB110 (мг/кг))
A356-MB110/B040-ml0r (мг/кг)

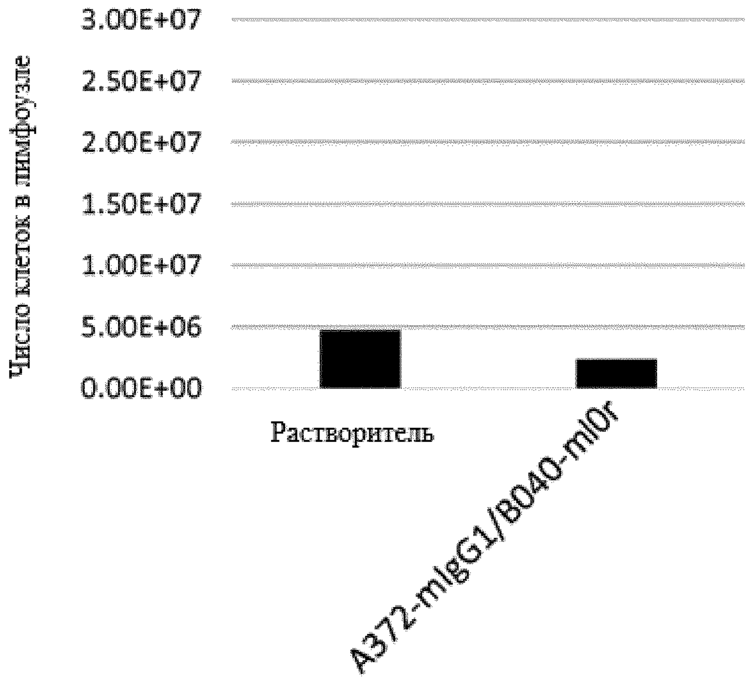
Фигура 55.



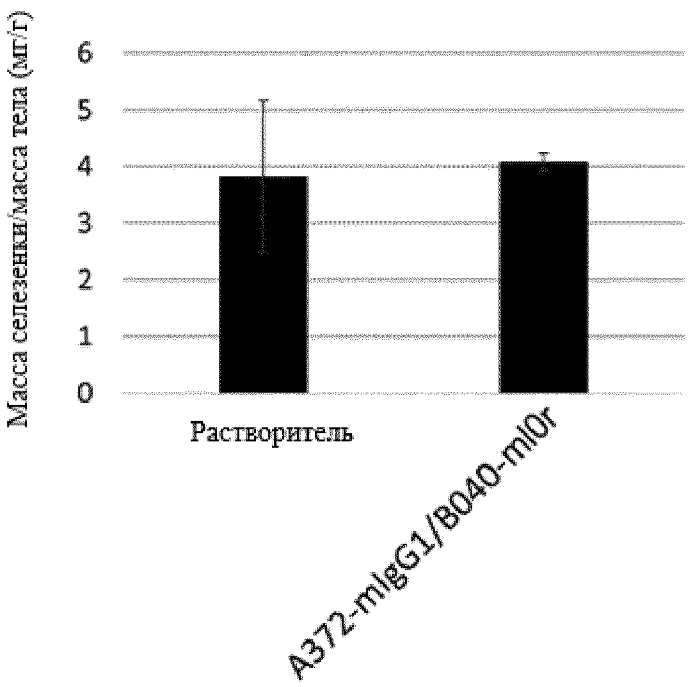
Растворитель
A372-mIgG1/B040-ml0r
Объем опухоли (мм3, SD)
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
0
10
20
30
Сутки после трансплантации

Фигура 56.

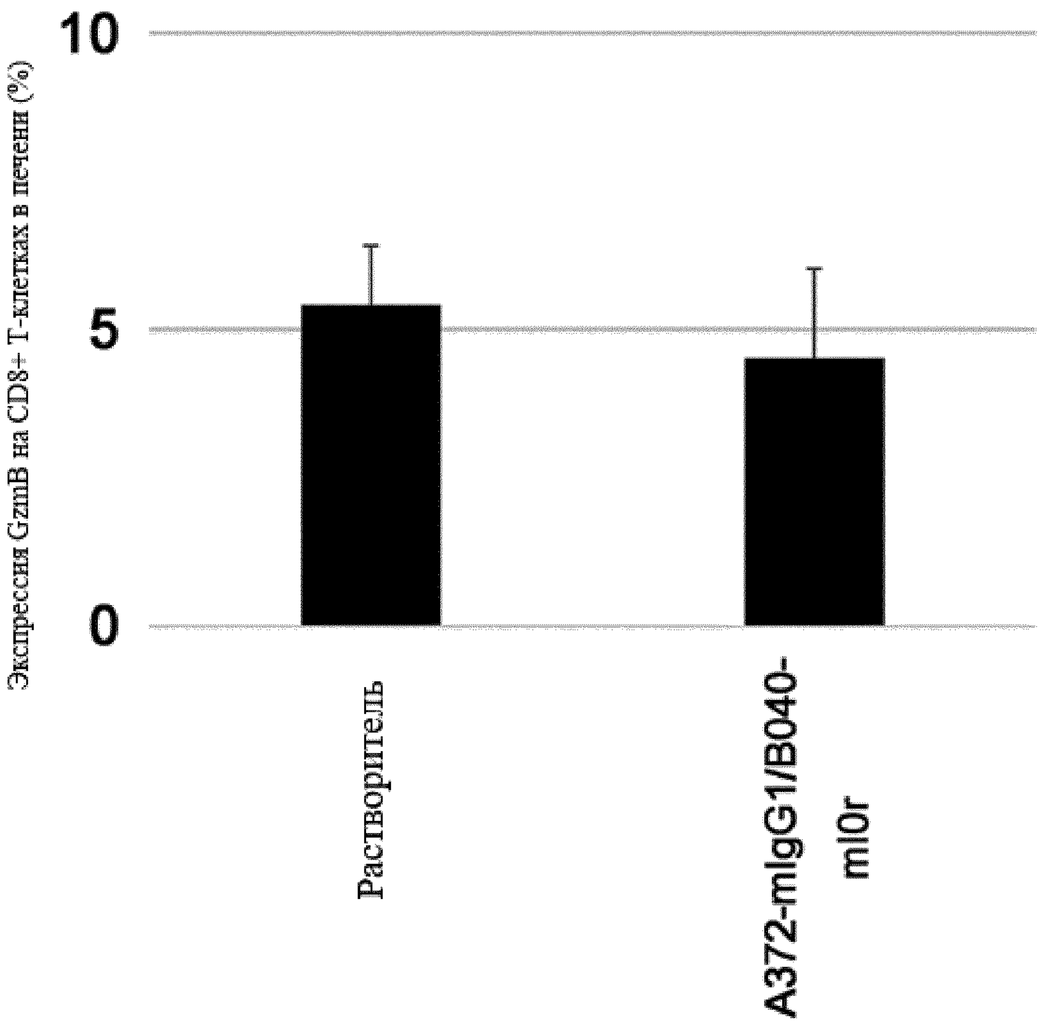
(A)


Число клеток в лимфоузле
3.00E+07
2.50E+07
2.00E+07
1.50E+07
1.00E+07
5.00E+06
0.00E+00
Растворитель
A372-mIgG1/B040-mI0r

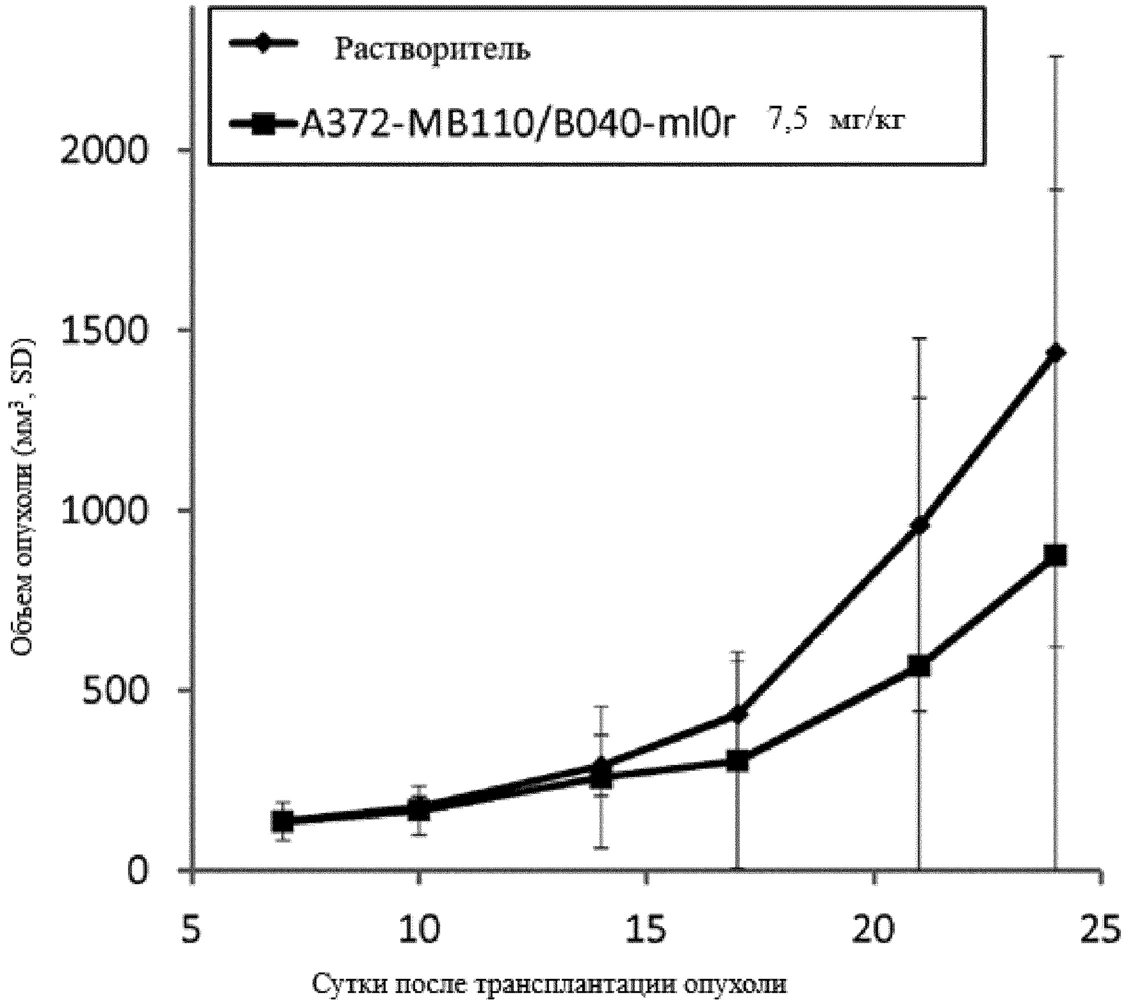
(Б)


Масса селезенки/масса тела (мг/г)
6
5
4
3
2
1
0
Растворитель
A372-mIgG1/B040-mI0r

Фигура 57.

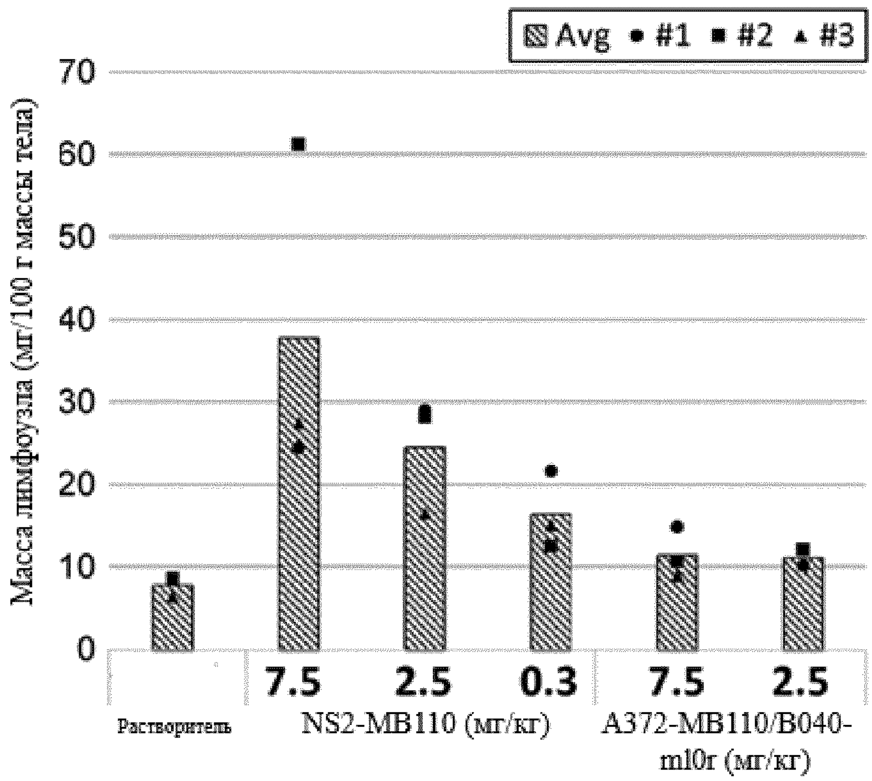

10
5
0
Экспрессия GzmB на CD8+ Т-клетках в печени (%)
Растворитель
A372-mIgG1/B040-mI0r

Фигура 58.

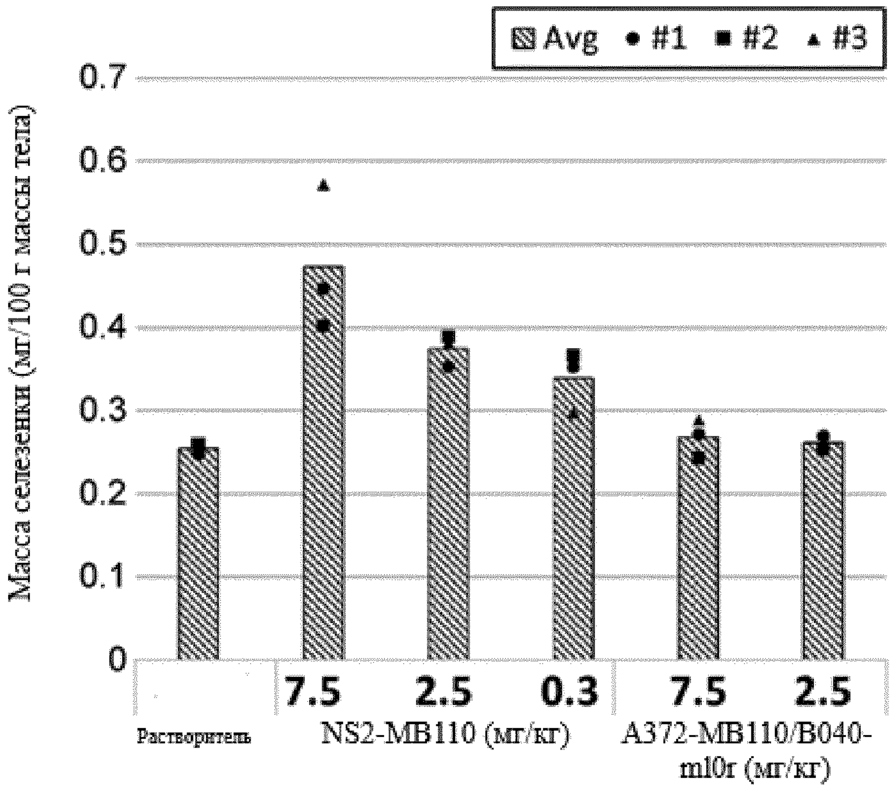

Растворитель
A372-MB110/B040-ml0r 7,5 мг/кг
2000
1500
1000
500
0
Объем опухоли (мм3, SD)
5
10
15
20
25
Сутки после трансплантации опухоли

Фигура 59.

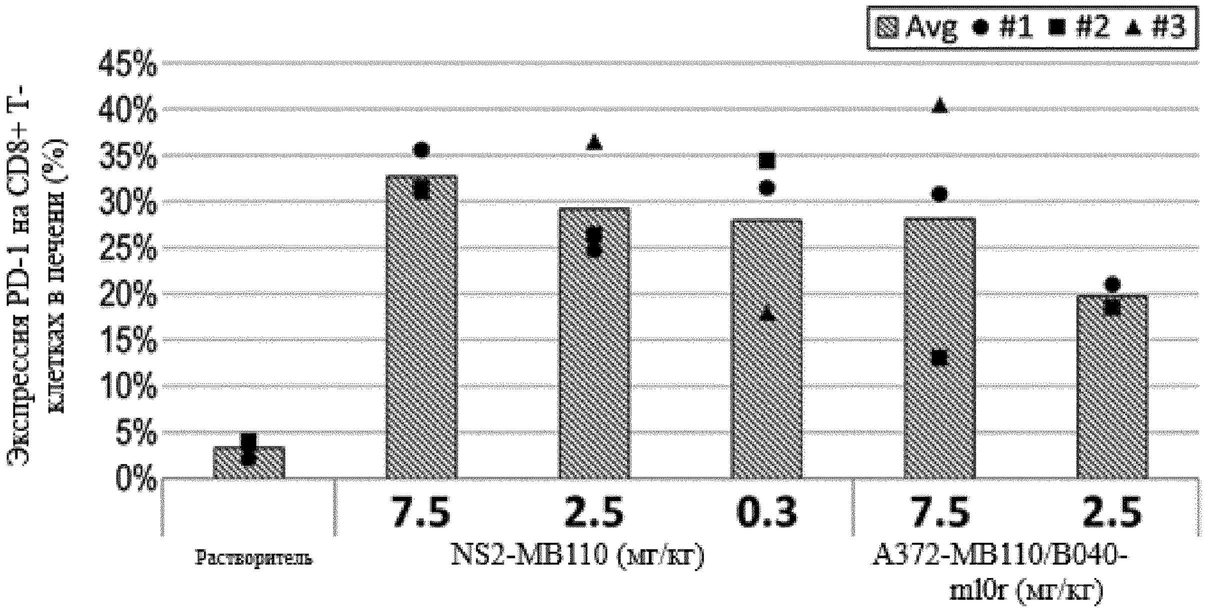
(A)


Avg
#1
#2
#3
70
60
50
40
30
20
10
0
Масса лимфоузла (мг/100 г массы тела)
7.5
2.5
0.3
7.5
2.5
Растворитель
NS2-MB110 (мг/кг)
A372-MB110/B040-ml0г (мг/кг)

(Б)

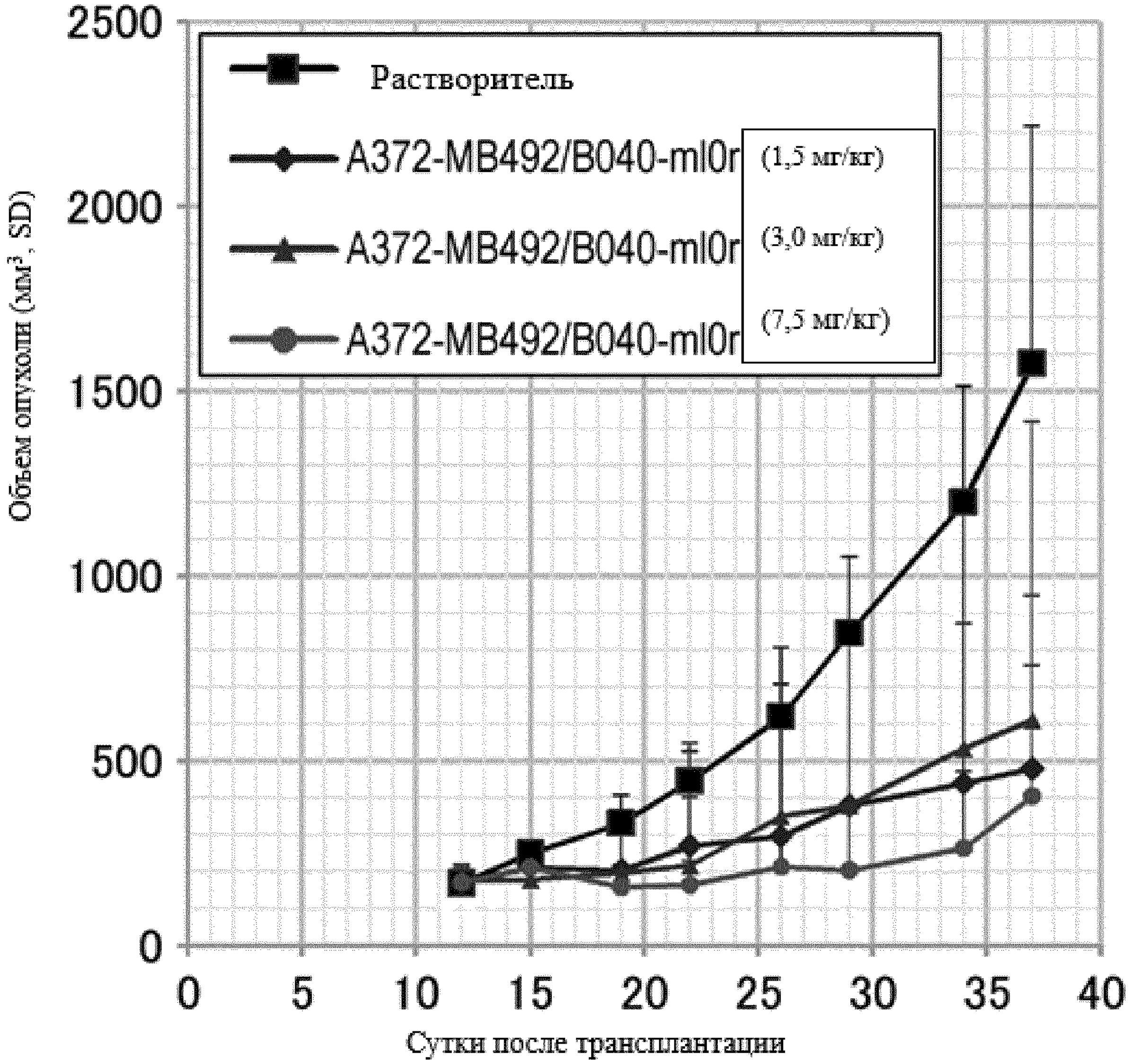

Avg
#1
#2
#3
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Масса селезенки (мг/100 г массы тела)
7.5
2.5
0.3
7.5
2.5
Растворитель
NS2-MB110 (мг/кг)
A372-MB110/B040-ml0г (мг/кг)

Фигура 60.



Avg
#1
#2
#3
45%
40%
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
Экспрессия PD-1 на CD8+ Т-клетках в печени (%)
7.5
2.5
0.3
7.5
2.5
Растворитель
NS2-MB110 (мг/кг)
A372-MB110/B040-m10r (мг/кг)

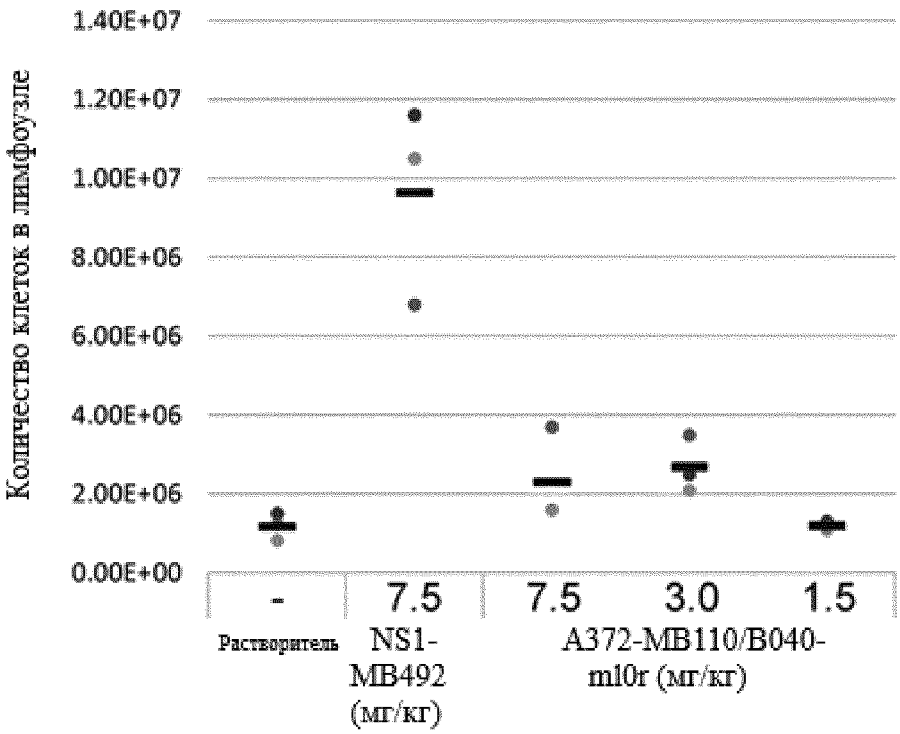
Фигура 61.



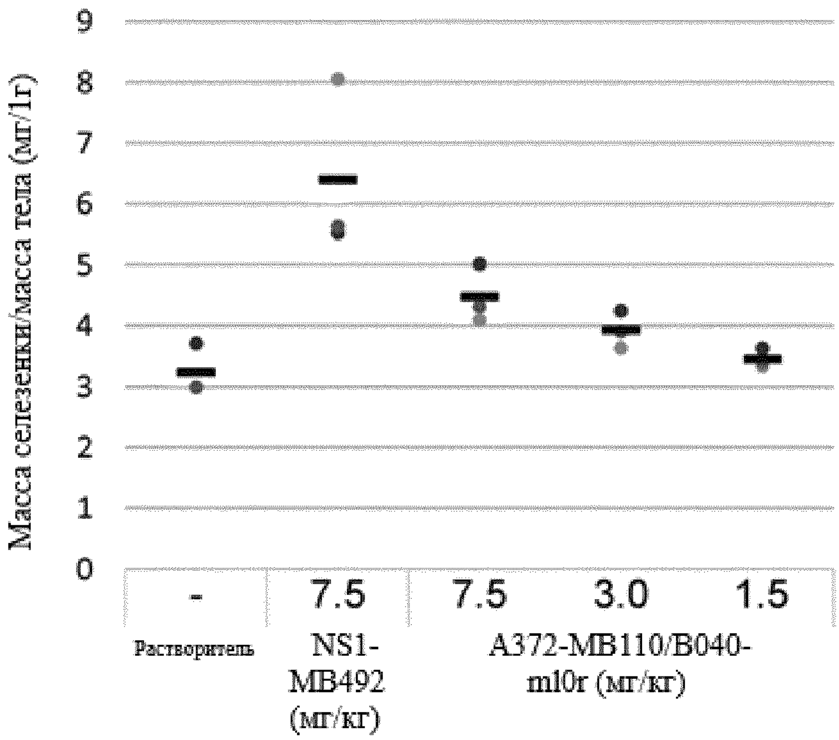
Растворитель
A372-MB492/B040-ml0r (1,5 мг/кг)
A372-MB492/B040-ml0r (3,0 мг/кг)
A372-MB492/B040-ml0r (7,5 мг/кг)
Объем опухоли (мм³, SD)
Сутки после трансплантации
0
500
1000
1500
2000
2500
0
5
10
15
20
25
30
35
40

Фигура 62.

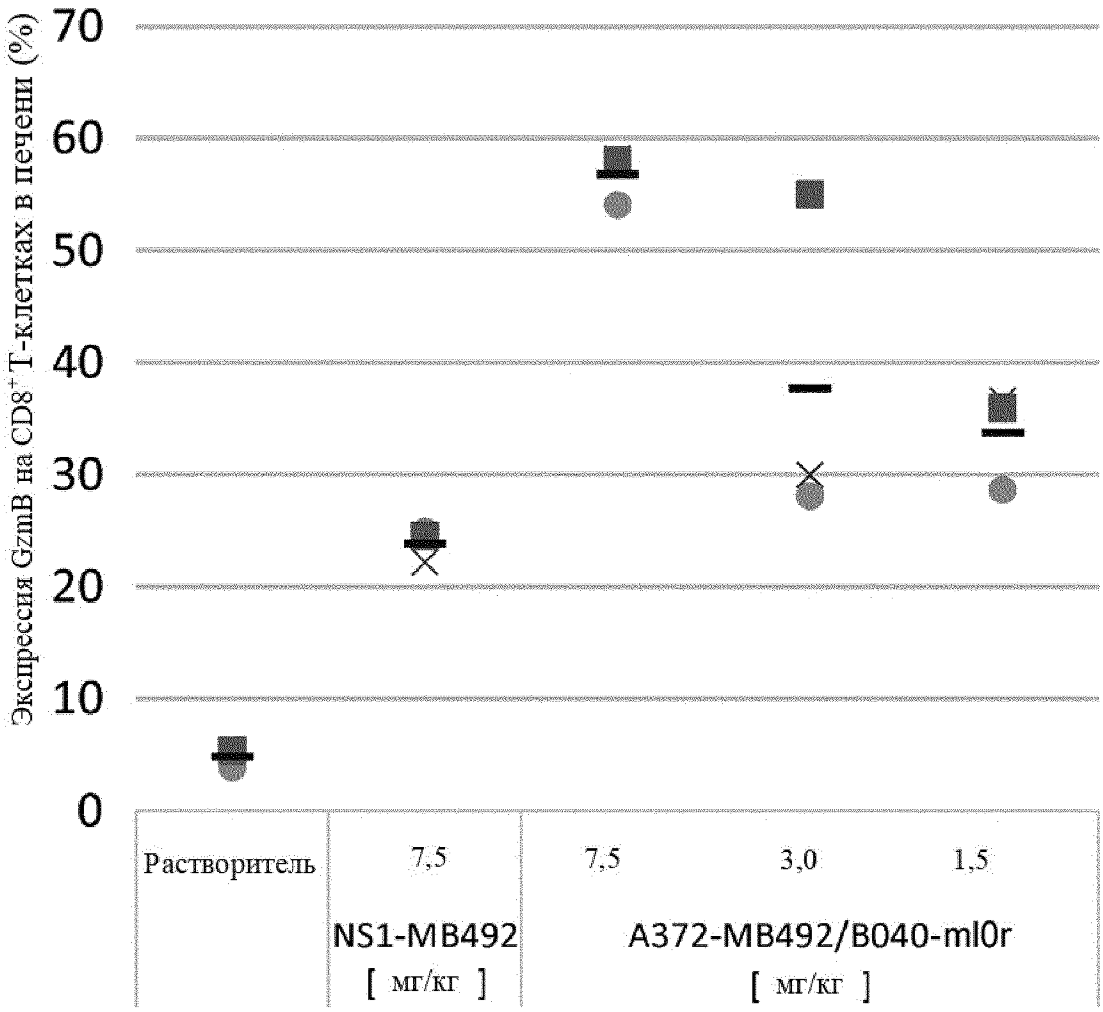
(A)


1.40E+07
1.20E+07
1.00E+07
8.00E+06
6.00E+06
4.00E+06
2.00E+06
0.00E+00
Количество клеток в лимфоузле
-
7.5
7.5
3.0
1.5
Растворитель
NS1-MB492 (мг/кг)
A372-MB110/B040-m10r (мг/кг)

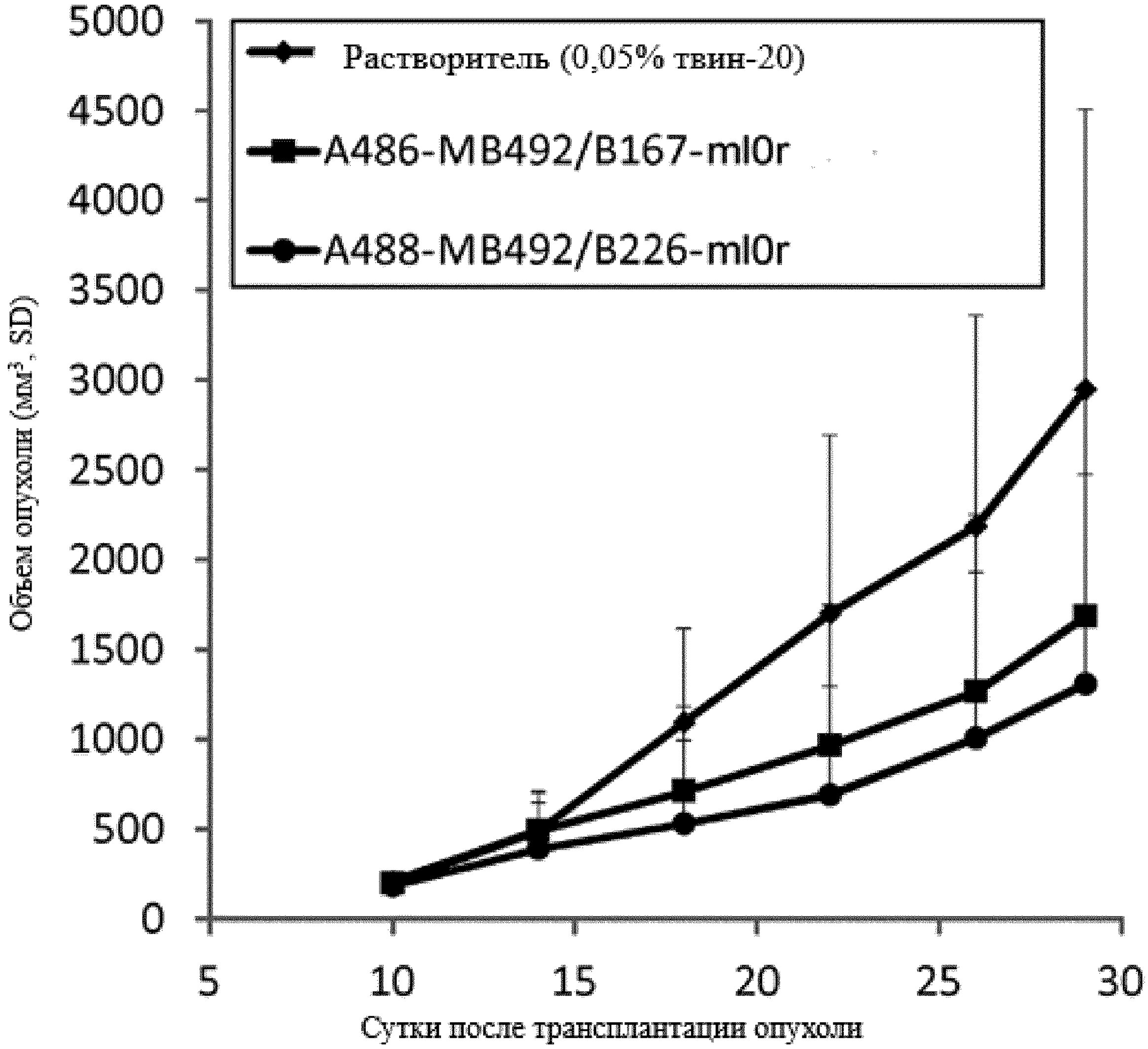
(Б)


9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Масса селезенки/масса тела (мг/1г)
-
7.5
7.5
3.0
1.5
Растворитель
NS1-MB492 (мг/кг)
A372-MB110/B040-m10r (мг/кг)

Фигура 63.

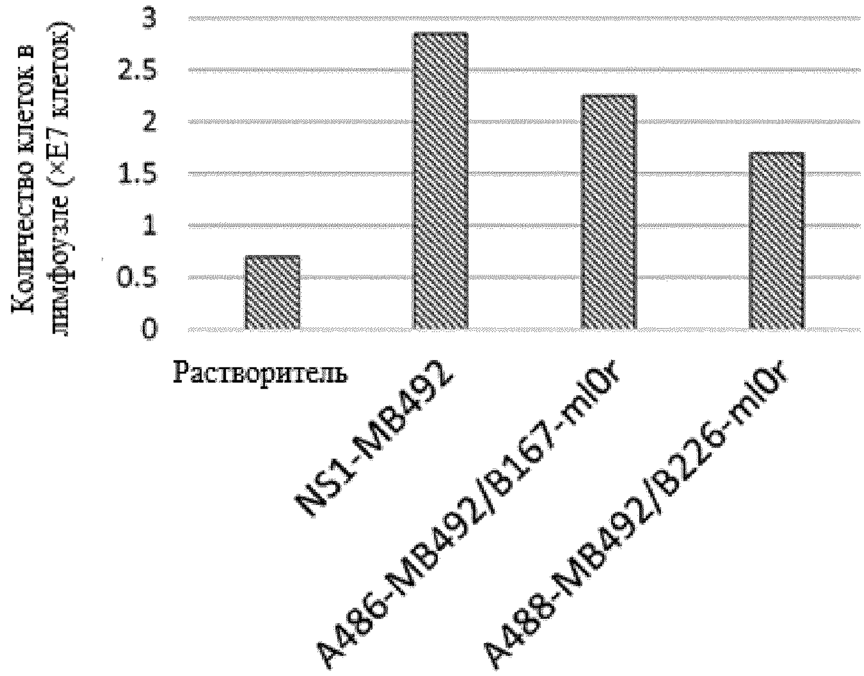

Экспрессия GzmB на CD8^{+} T-клетках в печени (%)
70
60
50
40
30
20
10
0
Растворитель
7,5
7,5
3,0
1,5
NS1-MB492
[мг/кг]
A372-MB492/B040-ml0r
[мг/кг]

Фигура 64.

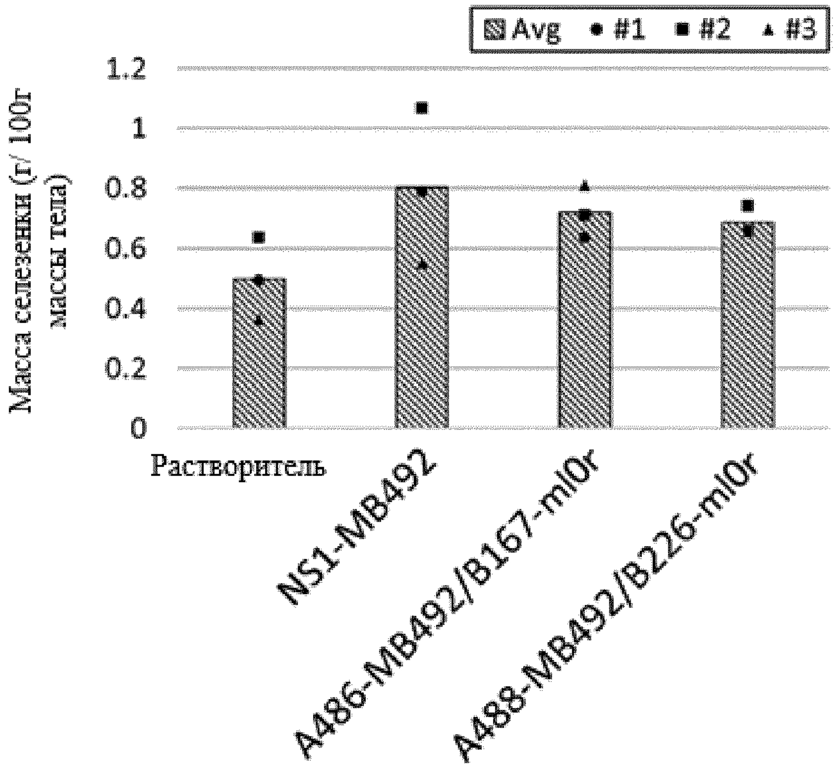

5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Растворитель (0,05% твин-20)
A486-MB492/B167-ml0r
A488-MB492/B226-ml0r
Объем опухоли (мм³, SD)
5
10
15
20
25
30
Сутки после трансплантации опухоли

Фигура 65.

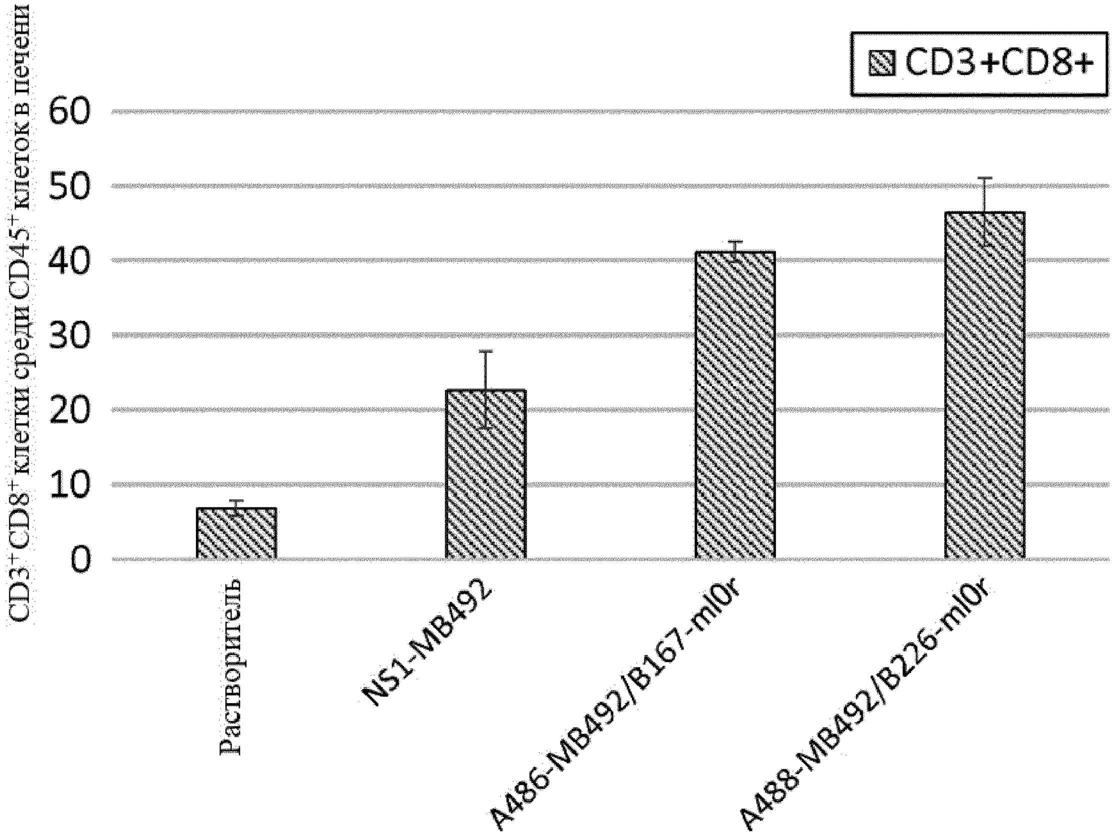
(А)


Количество клеток в лимфоузле (×E7 клеток)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Растворитель
NS1-MB492
A486-MB492/B167-ml0r
A488-MB492/B226-ml0r

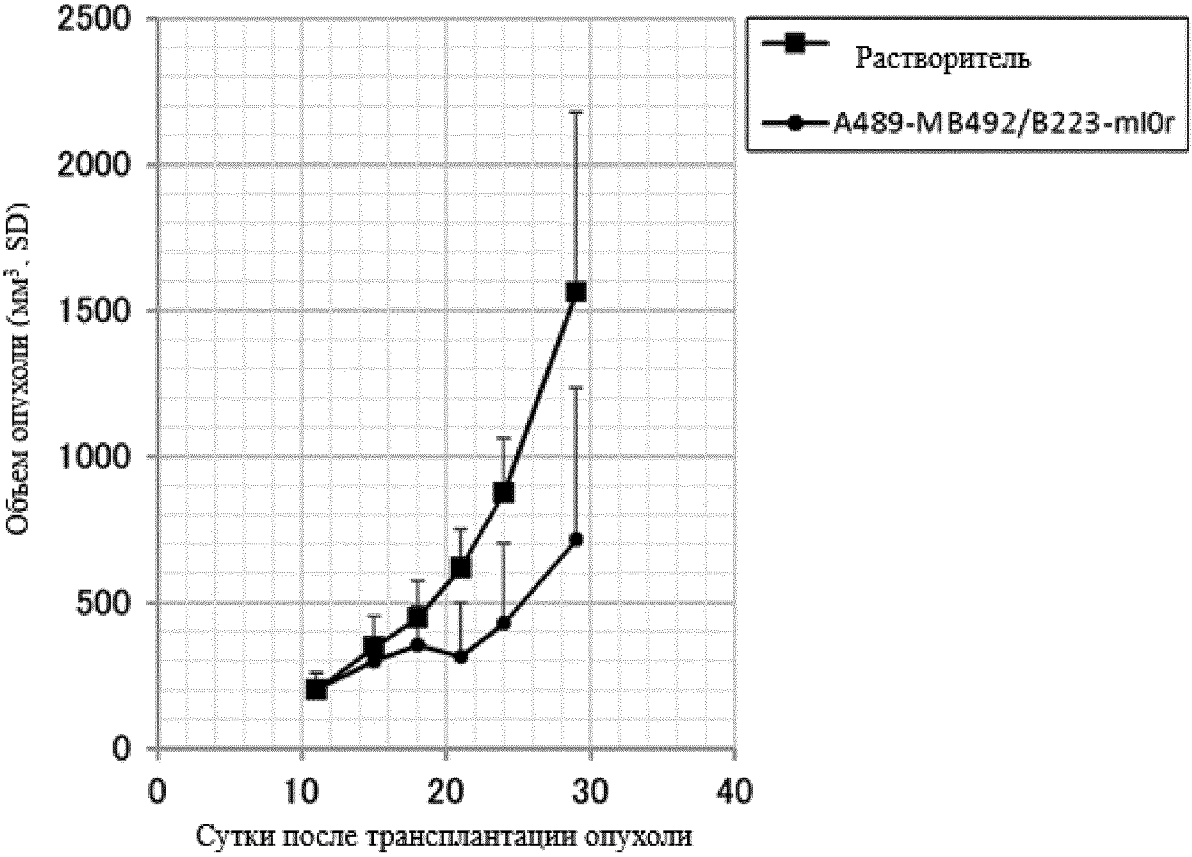
(Б)


Avg
#1
#2
#3
Масса селезенки (г/ 100г массы тела)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Растворитель
NS1-MB492
A486-MB492/B167-ml0r
A488-MB492/B226-ml0r

Фигура 66.

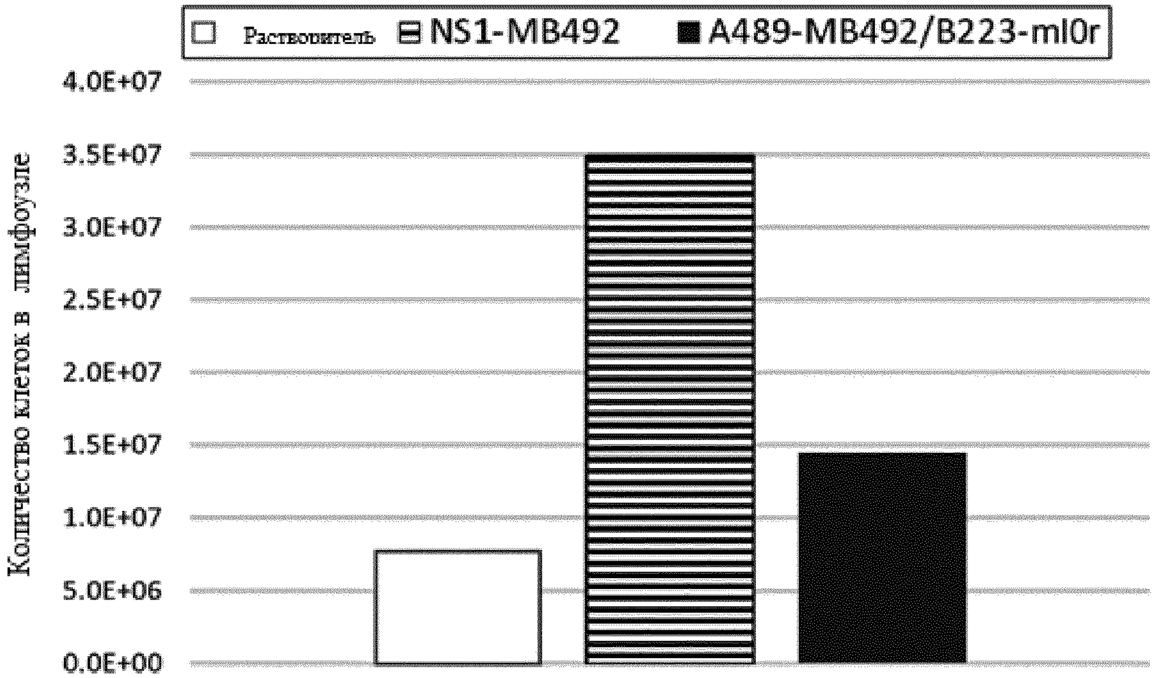

CD3+CD8+
CD3⁺CD8⁺ клетки среди CD45⁺ клеток в печени
60
50
40
30
20
10
0
Растворитель
NS1-MB492
A486-MB492/B167-ml0r
A488-MB492/B226-ml0r

Фигура 67.

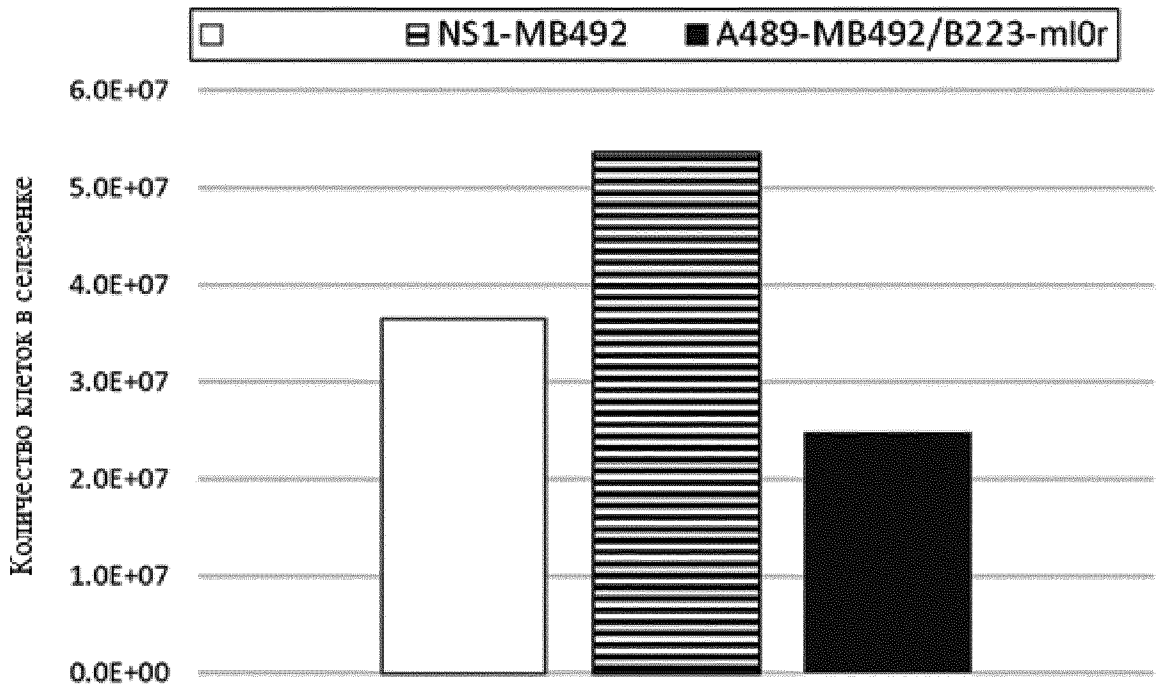

2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
Объем опухоли (мм³, SD)
Сутки после трансплантации опухоли
Растворитель
A489-MB492/B223-ml0r

Фигура 68.

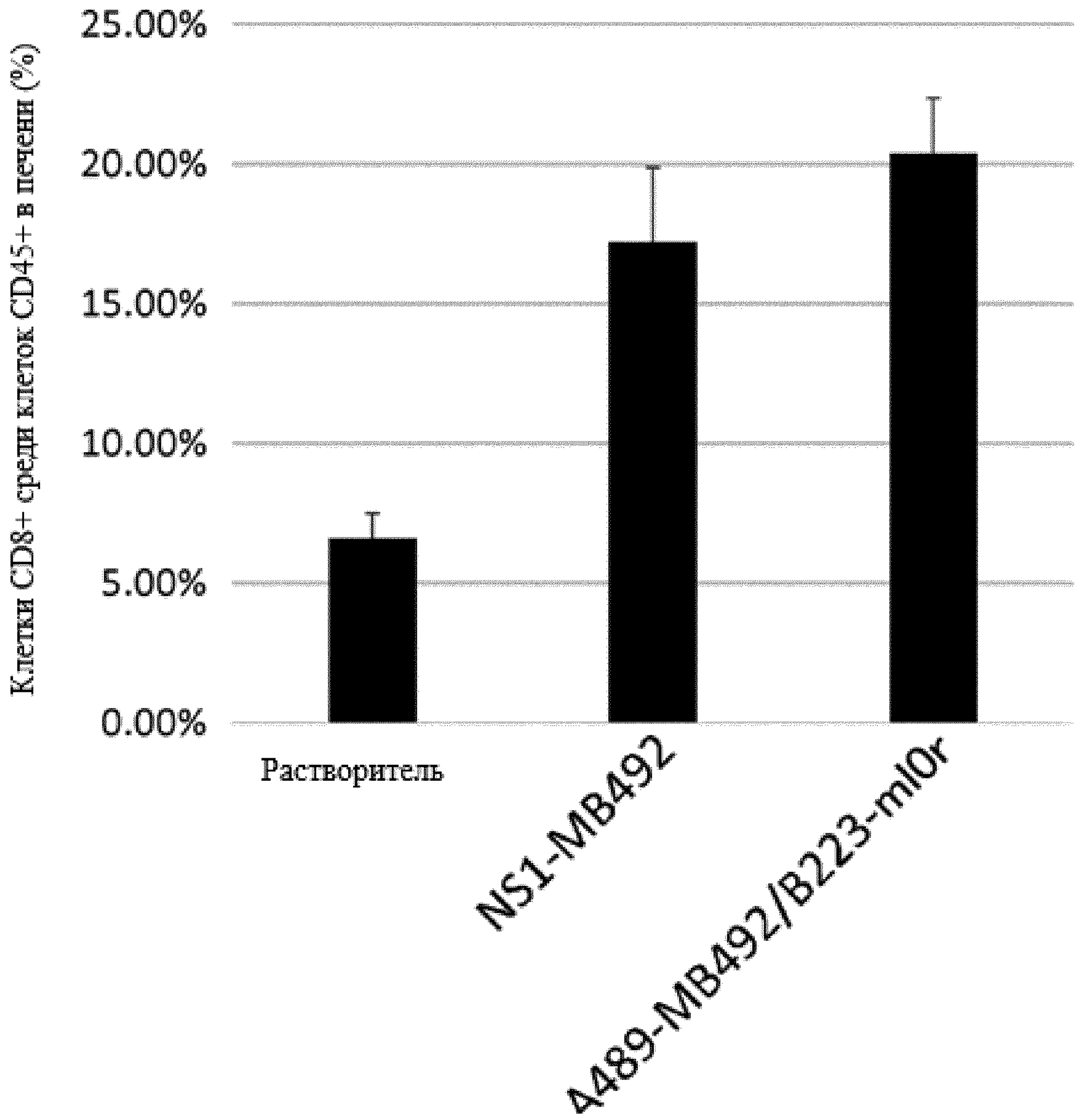
(А)


Растворитель
NS1-MB492
A489-MB492/B223-ml0r
4.0E+07
3.5E+07
3.0E+07
2.5E+07
2.0E+07
1.5E+07
1.0E+07
5.0E+06
0.0E+00
Количество клеток в лимфоузле

(Б)

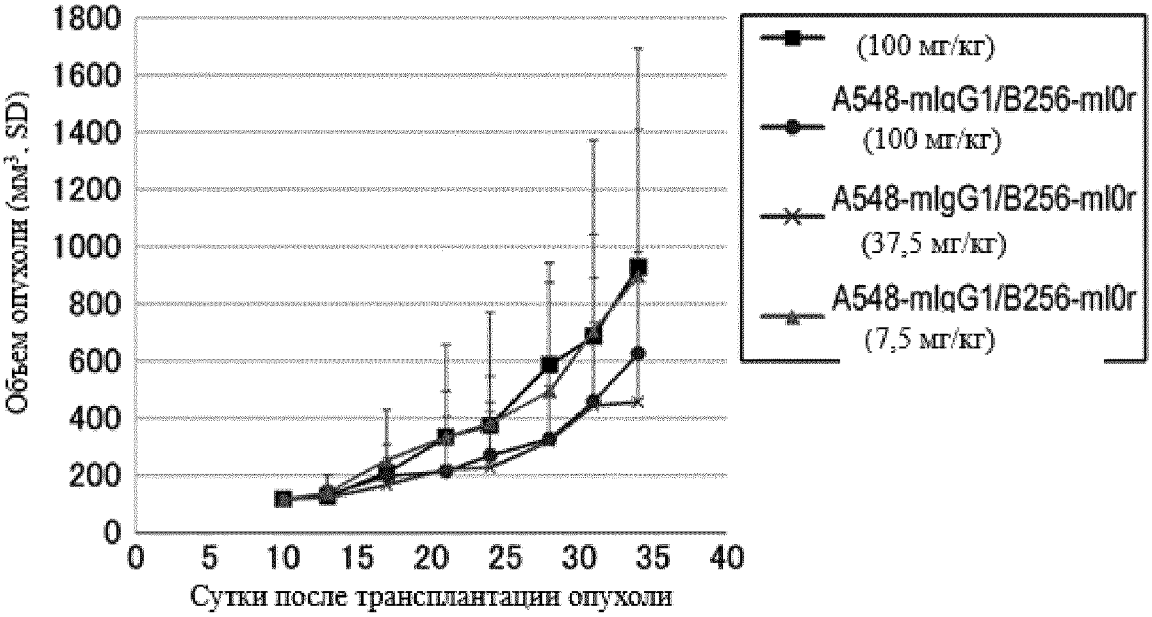

NS1-MB492
A489-MB492/B223-ml0r
6.0E+07
5.0E+07
4.0E+07
3.0E+07
2.0E+07
1.0E+07
0.0E+00
Количество клеток в селезенке

Фигура 69.

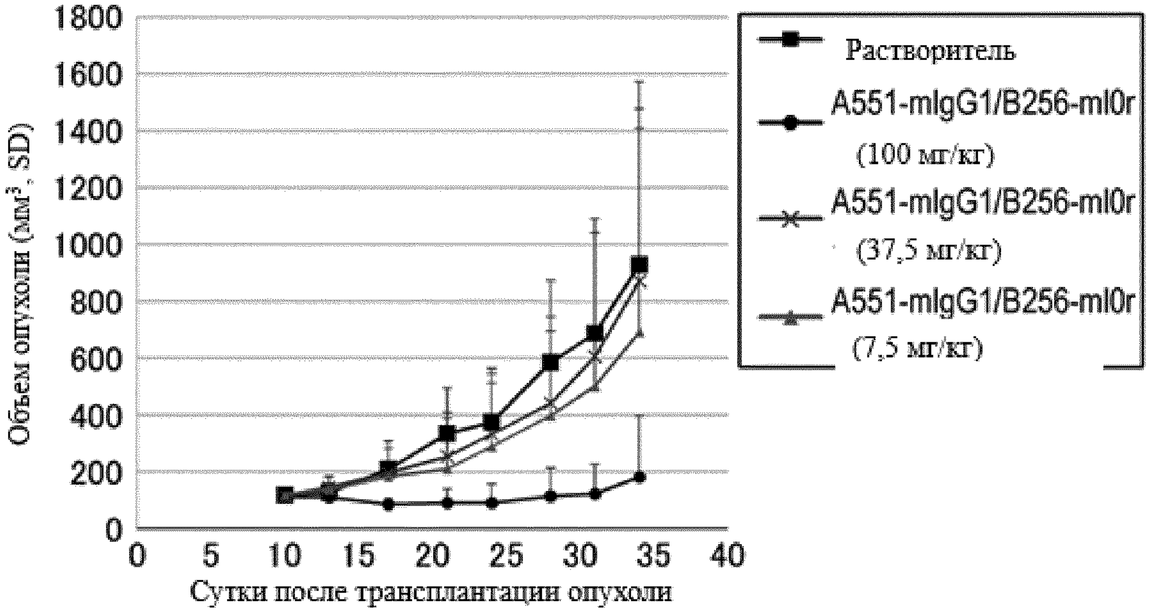

25.00%
20.00%
15.00%
10.00%
5.00%
0.00%
Клетки CD8+ среди клеток CD45+ в печени (%)
Растворитель
NS1-MB492
4489-MB492/B223-ml0r

Фигура 70.

(А)

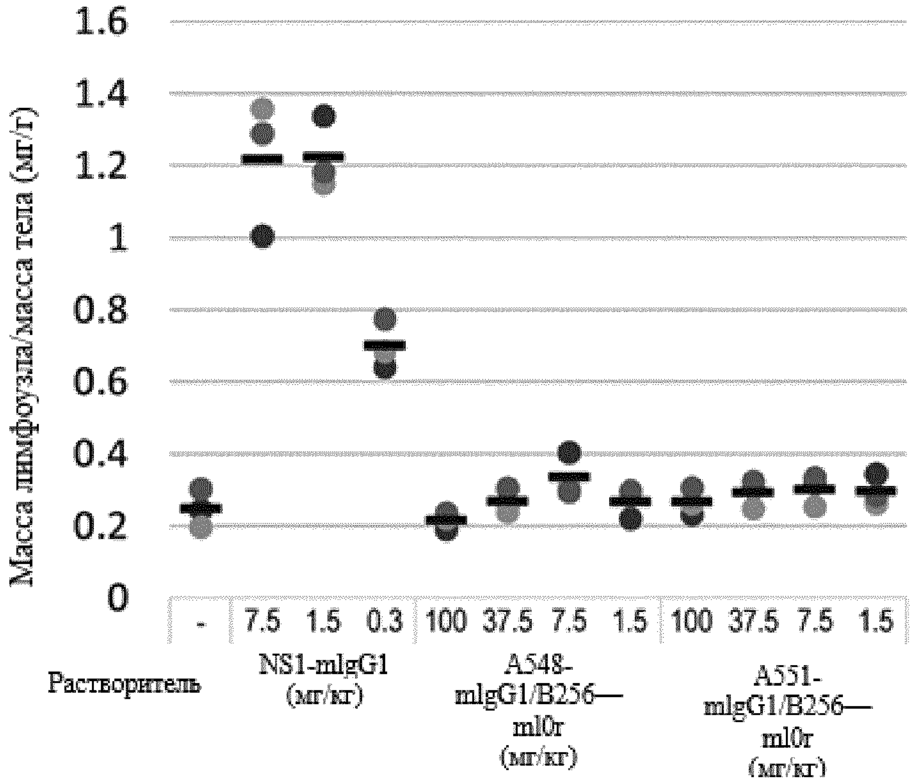

1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Объем опухоли (мм³, SD)
0 5 10 15 20 25 30 35 40
Сутки после трансплантации опухоли
(100 мг/кг)
A548-mIgG1/B256-mI0r
(100 мг/кг)
A548-mIgG1/B256-mI0r
(37,5 мг/кг)
A548-mIgG1/B256-mI0r
(7,5 мг/кг)

(Б)

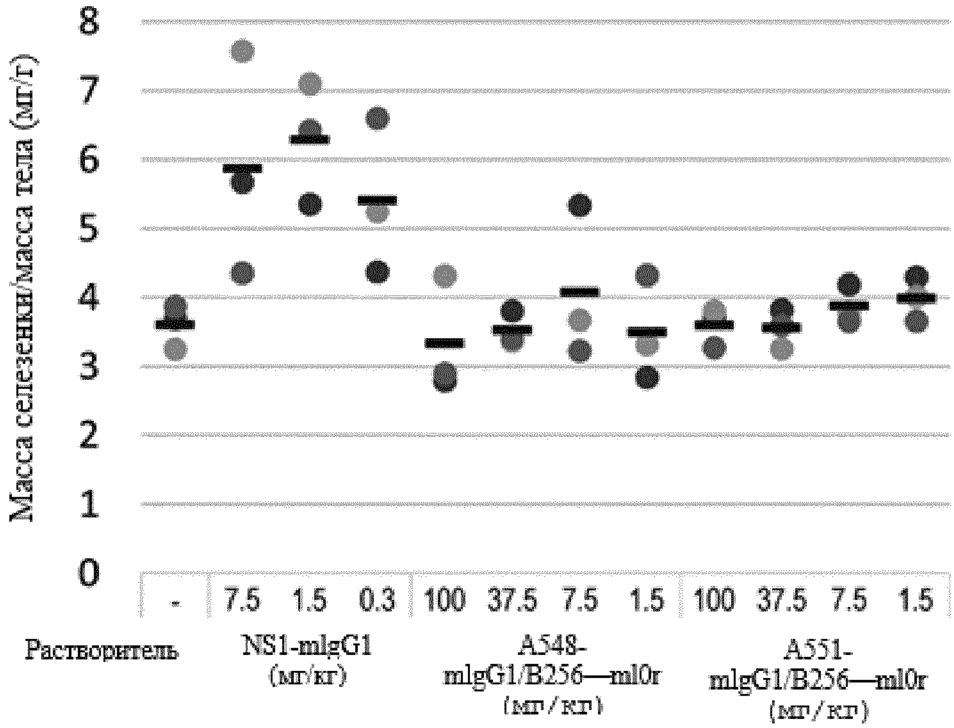

1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Объем опухоли (мм³, SD)
0 5 10 15 20 25 30 35 40
Сутки после трансплантации опухоли
Растворитель
A551-mIgG1/B256-mI0r
(100 мг/кг)
A551-mIgG1/B256-mI0r
(37,5 мг/кг)
A551-mIgG1/B256-mI0r
(7,5 мг/кг)

Фигура 71.

(A)

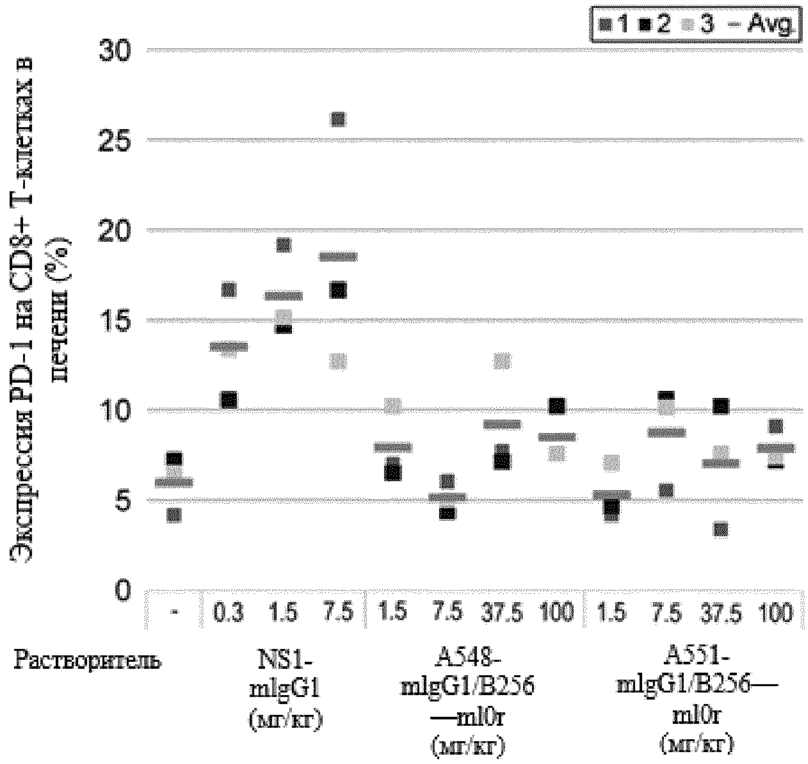

1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Масса лимфоузла/масса тела (мг/г)
-
7.5
1.5
0.3
100
37.5
7.5
1.5
100
37.5
7.5
1.5
Растворитель
NS1-mIgG1 (мг/кг)
A548-mIgG1/B256—mI0r (мг/кг)
A551-mIgG1/B256—mI0r (мг/кг)

(Б)

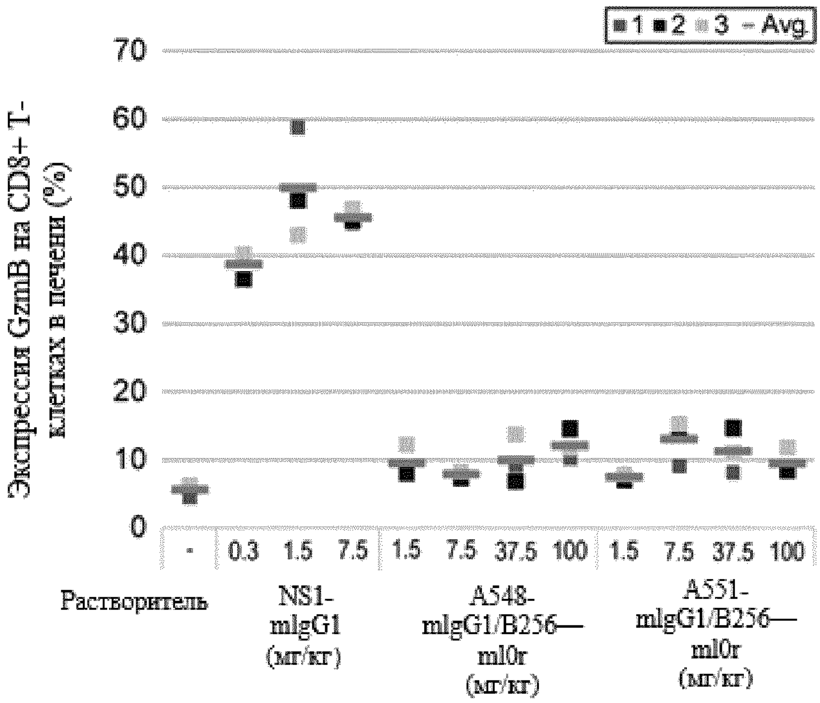

8
7
6
5
4
3
2
1
0
Масса селезенки/масса тела (мг/г)
-
7.5
1.5
0.3
100
37.5
7.5
1.5
100
37.5
7.5
1.5
Растворитель
NS1-mIgG1 (мг/кг)
A548-mIgG1/B256—mI0r (мг/кг)
A551-mIgG1/B256—mI0r (мг/кг)

Фигура 72.

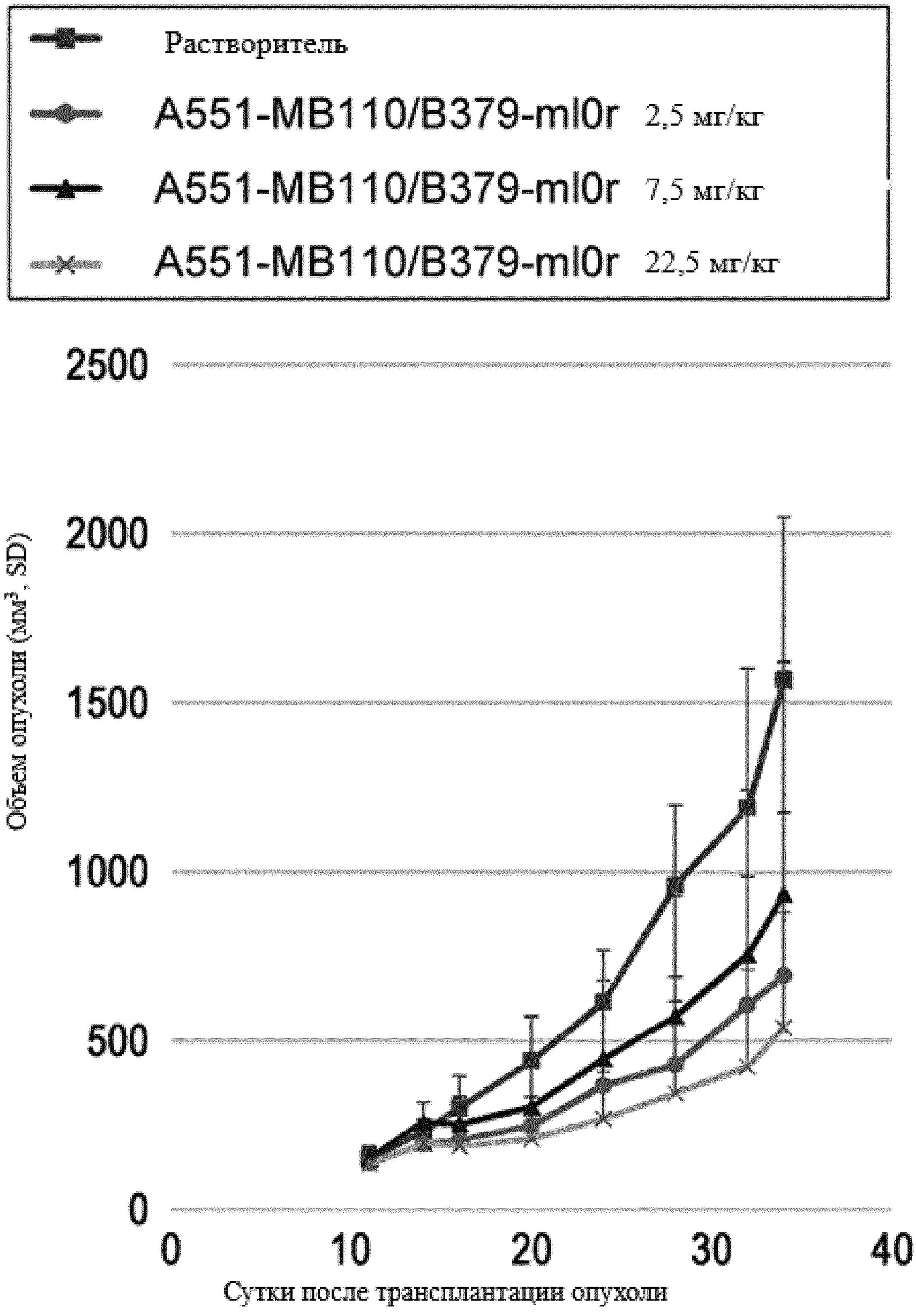
(А)


■1 ■2 ■3 – Avg.
30
25
20
15
10
5
0
Экспрессия PD-1 на CD8+ Т-клетках в печени (%)
-
0.3
1.5
7.5
1.5
7.5
37.5
100
1.5
7.5
37.5
100
Растворитель
NS1-mIgG1 (мг/кг)
A548-mIgG1/B256—mI0r (мг/кг)
A551-mIgG1/B256—mI0r (мг/кг)

(Б)

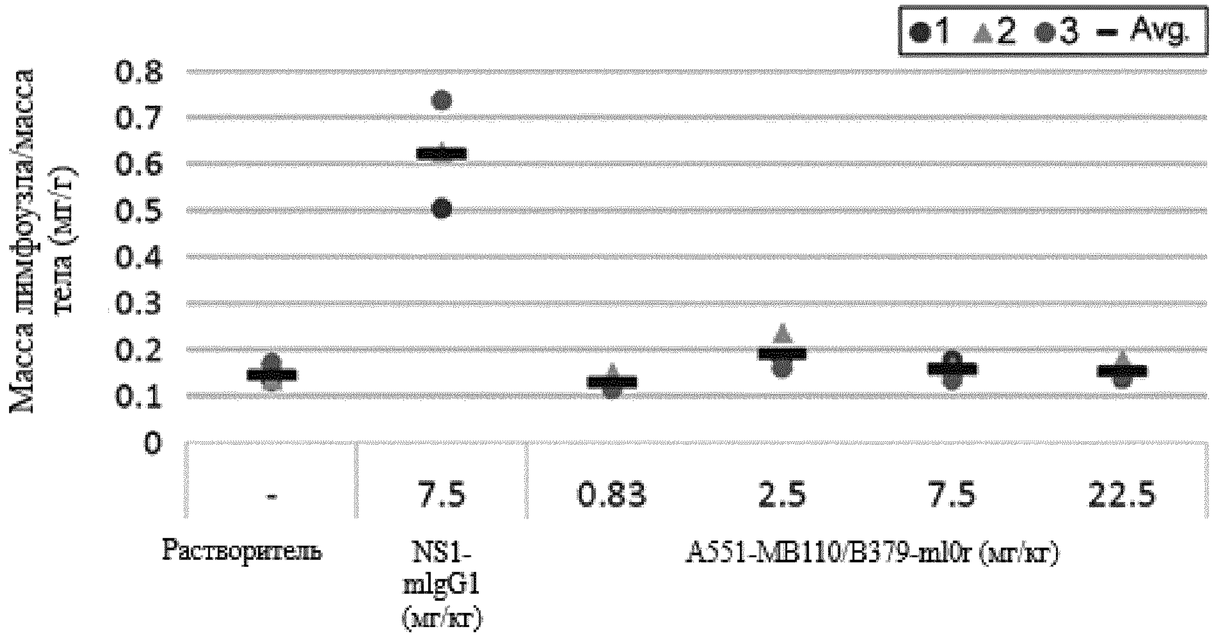

■1 ■2 ■3 – Avg.
70
60
50
40
30
20
10
0
Экспрессия GzmB на CD8+ Т-клетках в печени (%)
-
0.3
1.5
7.5
1.5
7.5
37.5
100
1.5
7.5
37.5
100
Растворитель
NS1-mIgG1 (мг/кг)
A548-mIgG1/B256—mI0r (мг/кг)
A551-mIgG1/B256—mI0r (мг/кг)

Фигура 73.

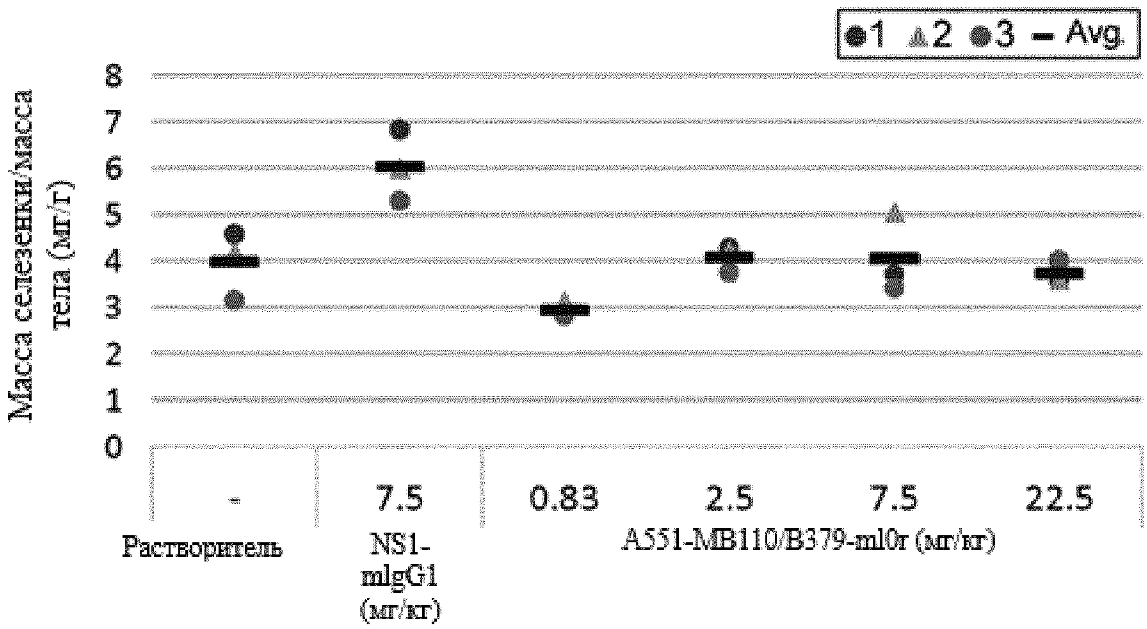

Растворитель
A551-MB110/B379-ml0r 2,5 мг/кг
A551-MB110/B379-ml0r 7,5 мг/кг
A551-MB110/B379-ml0r 22,5 мг/кг
Объем опухоли (мм^3, SD)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
Сутки после трансплантации опухоли

Фигура 74.

(A)

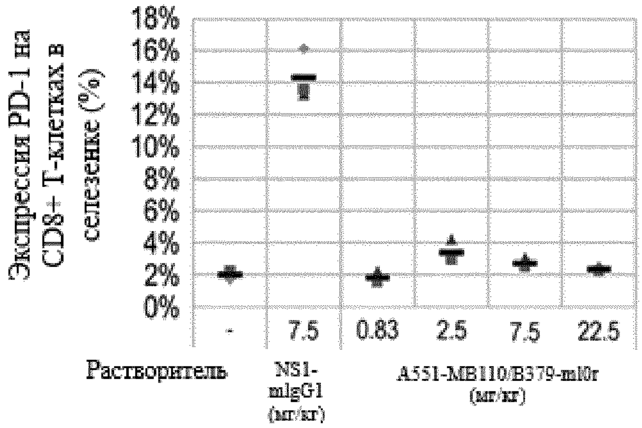

●1 ▲2 ●3 – Avg.
Масса лимфоузла/масса тела (мг/г)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-
7.5
0.83
2.5
7.5
22.5
Растворитель
NS1-mlgG1 (мг/кг)
A551-MB110/B379-ml0r (мг/кг)

(Б)

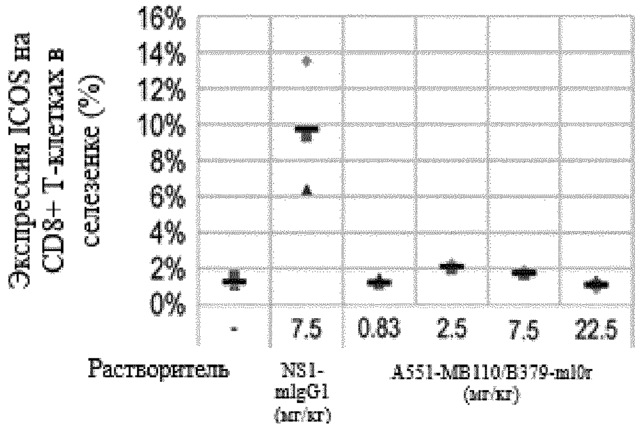

●1 ▲2 ●3 – Avg.
Масса селезенки/масса тела (мг/г)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-
7.5
0.83
2.5
7.5
22.5
Растворитель
NS1-mlgG1 (мг/кг)
A551-MB110/B379-ml0r (мг/кг)

Фигура 75.

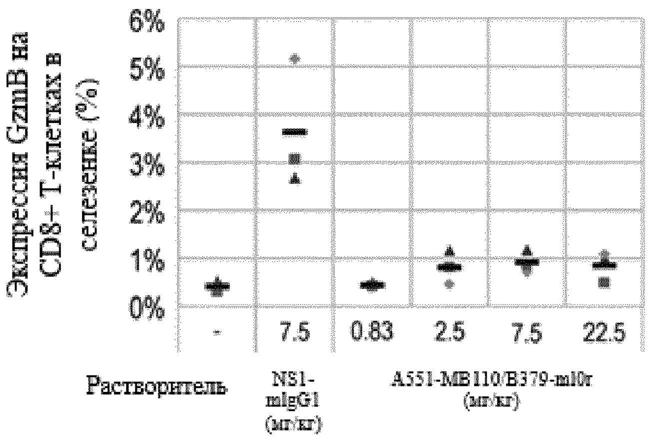
(А)



(Б)

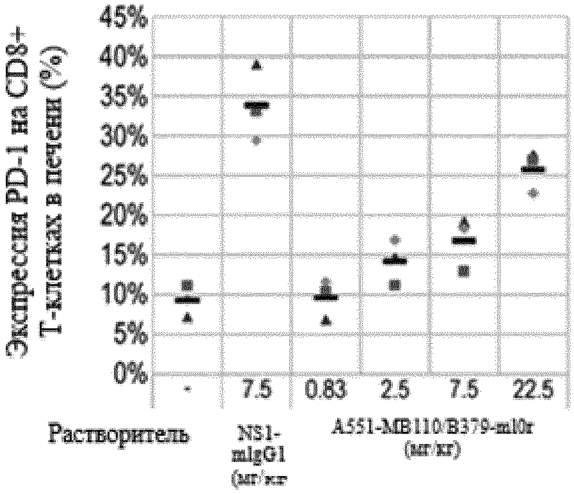


(В)

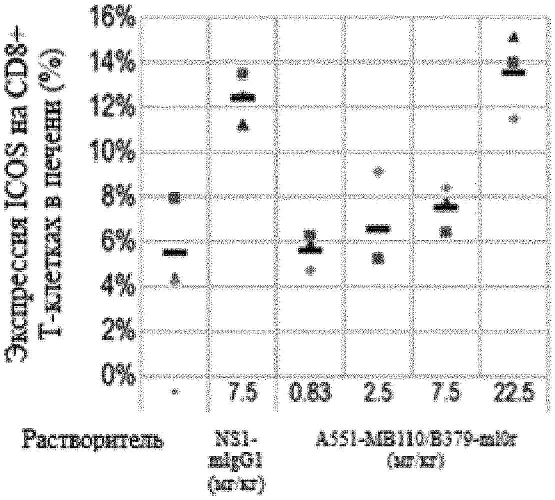


Фигура 76.

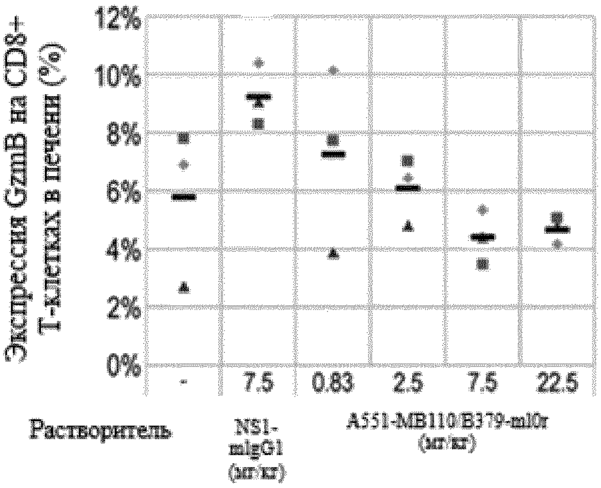
(A)



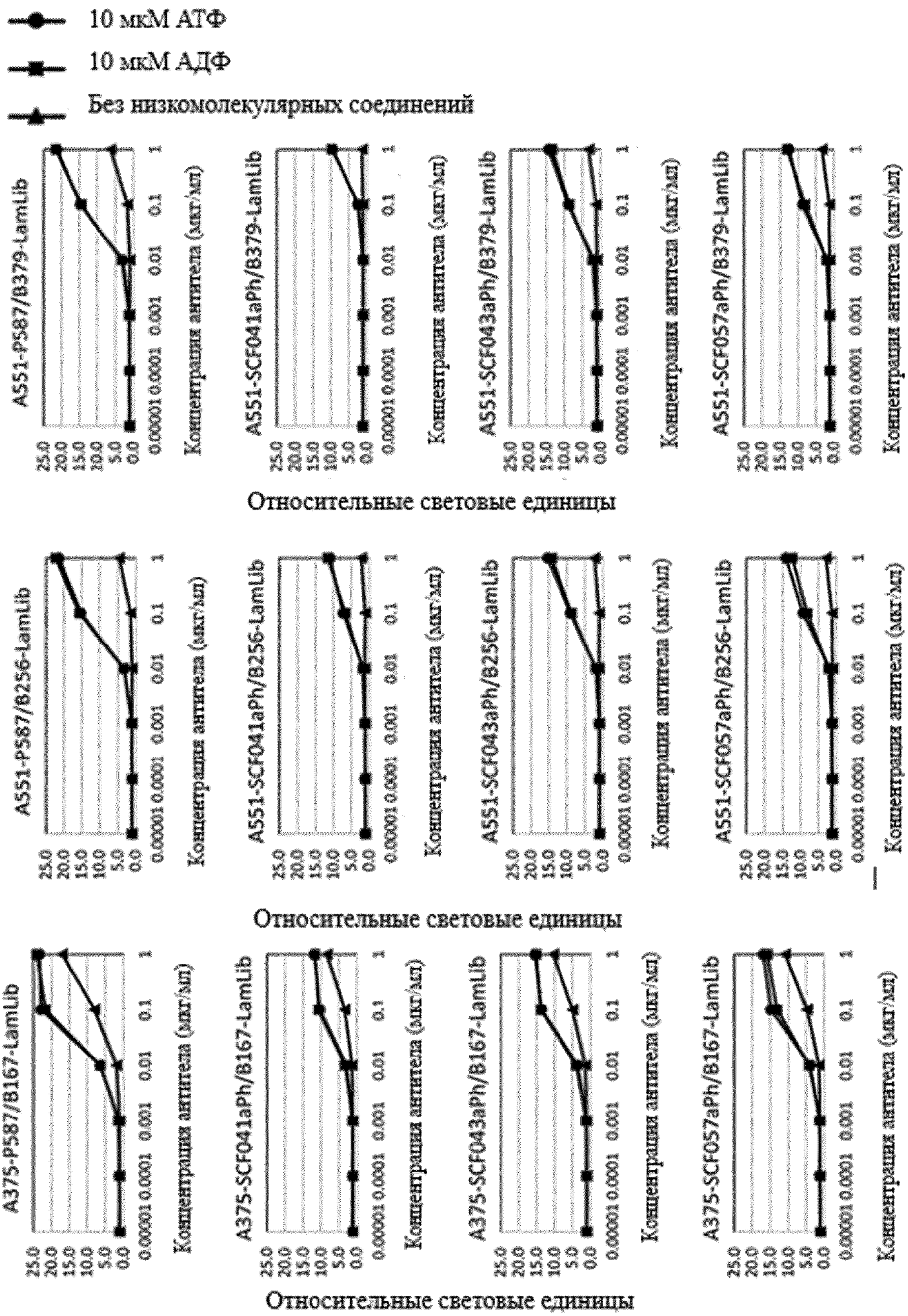
(B)



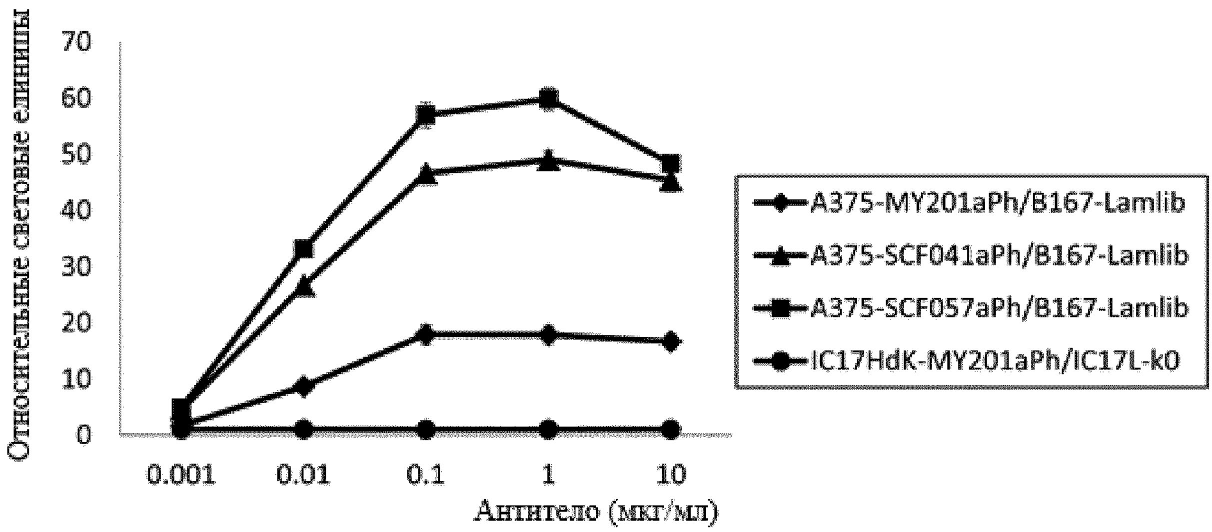
(Б)



Фигура 77.

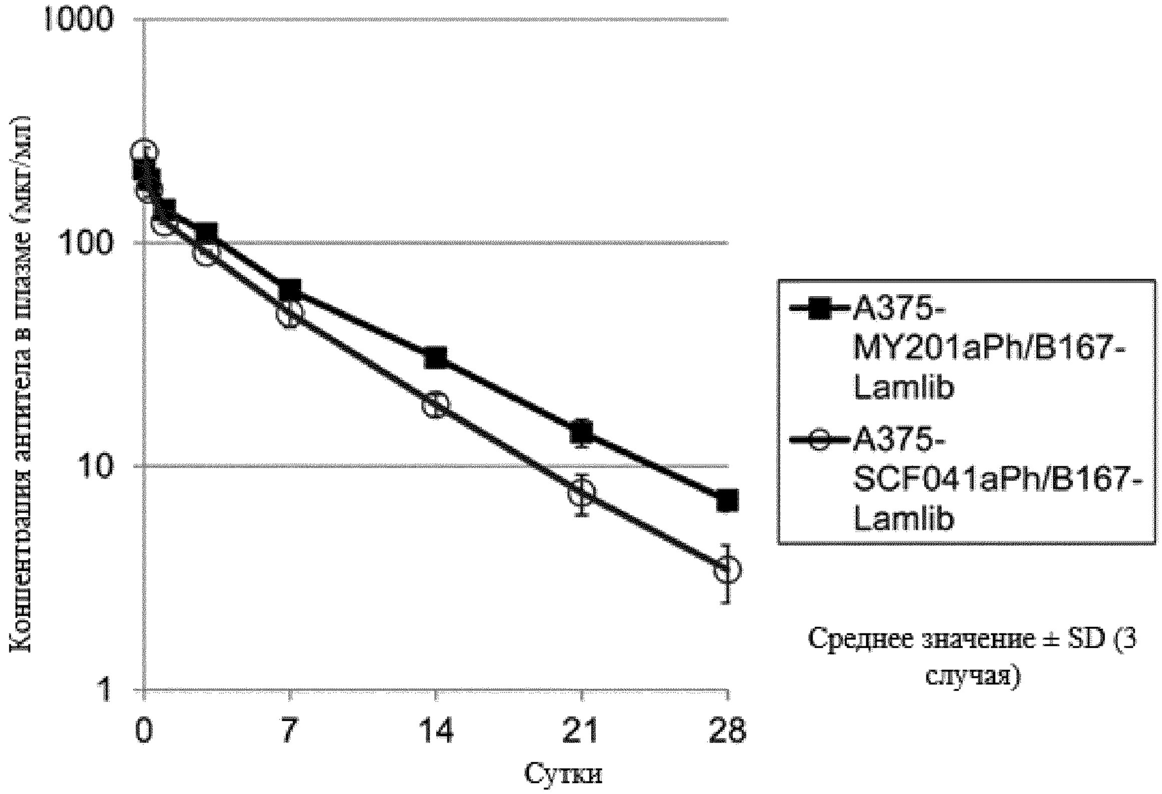

10 мкМ АТФ
10 мкМ АДФ
Без низкомолекулярных соединений
A551-P587/B379-LamLib
A551-SCF041aPh/B379-LamLib
A551-SCF043aPh/B379-LamLib
A551-SCF057aPh/B379-LamLib
A551-P587/B256-LamLib
A551-SCF041aPh/B256-LamLib
A551-SCF043aPh/B256-LamLib
A551-SCF057aPh/B256-LamLib
A375-P587/B167-LamLib
A375-SCF041aPh/B167-LamLib
A375-SCF043aPh/B167-LamLib
A375-SCF057aPh/B167-LamLib
Концентрация антитела (мкг/мл)
Относительные световые единицы
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1

Фигура 78.

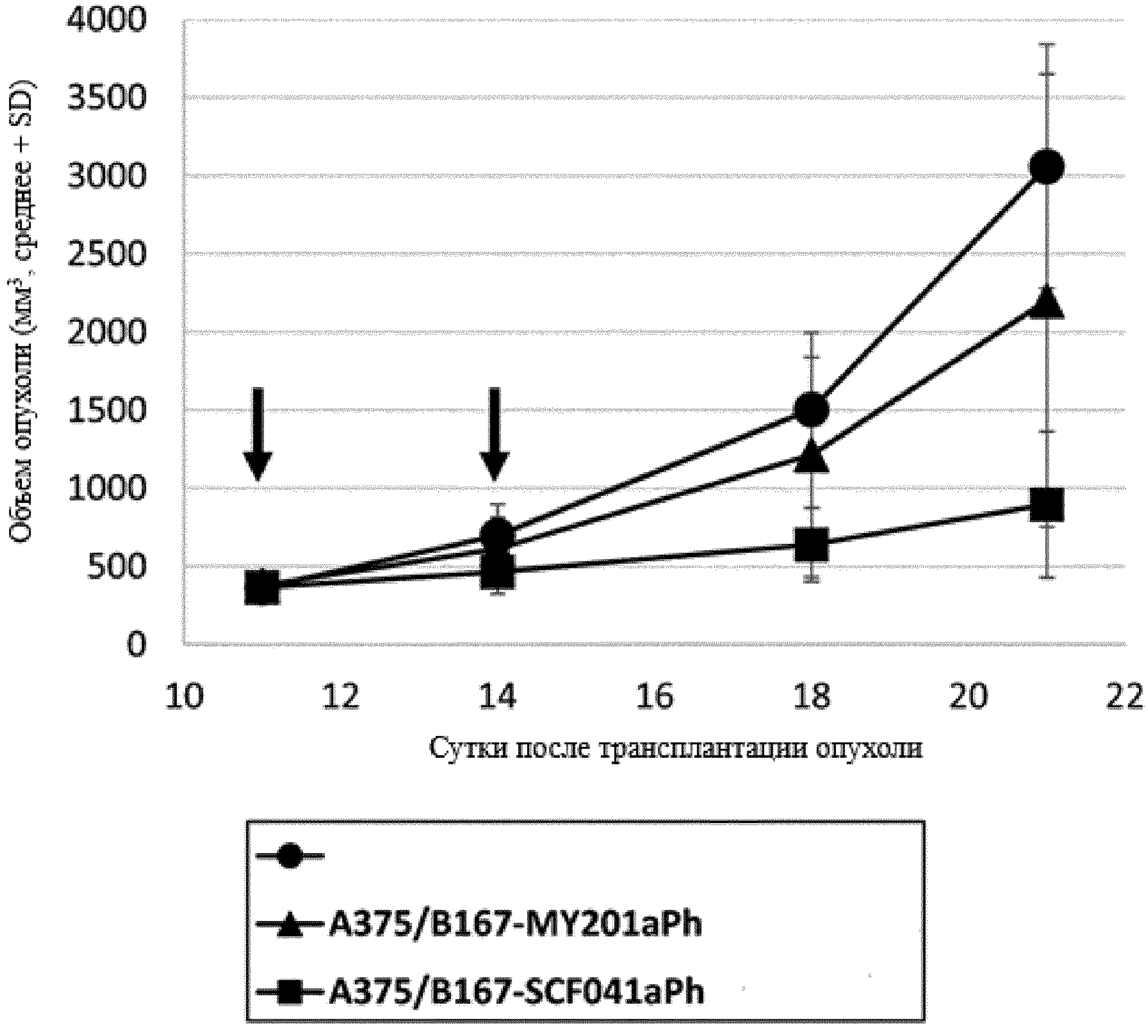


Относительные световые единицы
70
60
50
40
30
20
10
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Антитело (мкг/мл)
A375-MY201aPh/B167-Lamlib
A375-SCF041aPh/B167-Lamlib
A375-SCF057aPh/B167-Lamlib
IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0

Фигура 79.

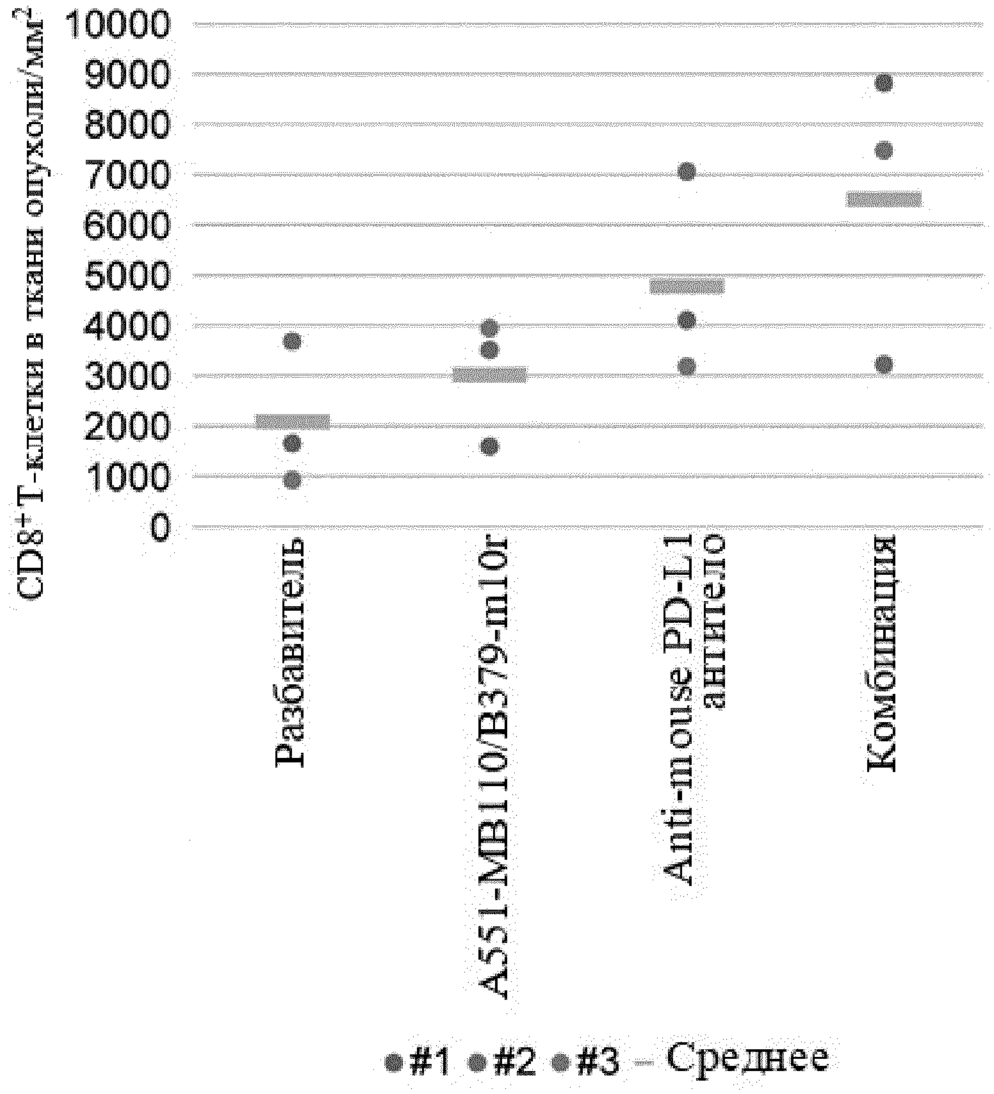

1000
100
10
1
Концентрация антитела в плазме (мкг/мл)
0
7
14
21
28
Сутки
A375-MY201aPh/B167-Lamlib
A375-SCF041aPh/B167-Lamlib
Среднее значение ± SD (3 случая)

Фигура 80.

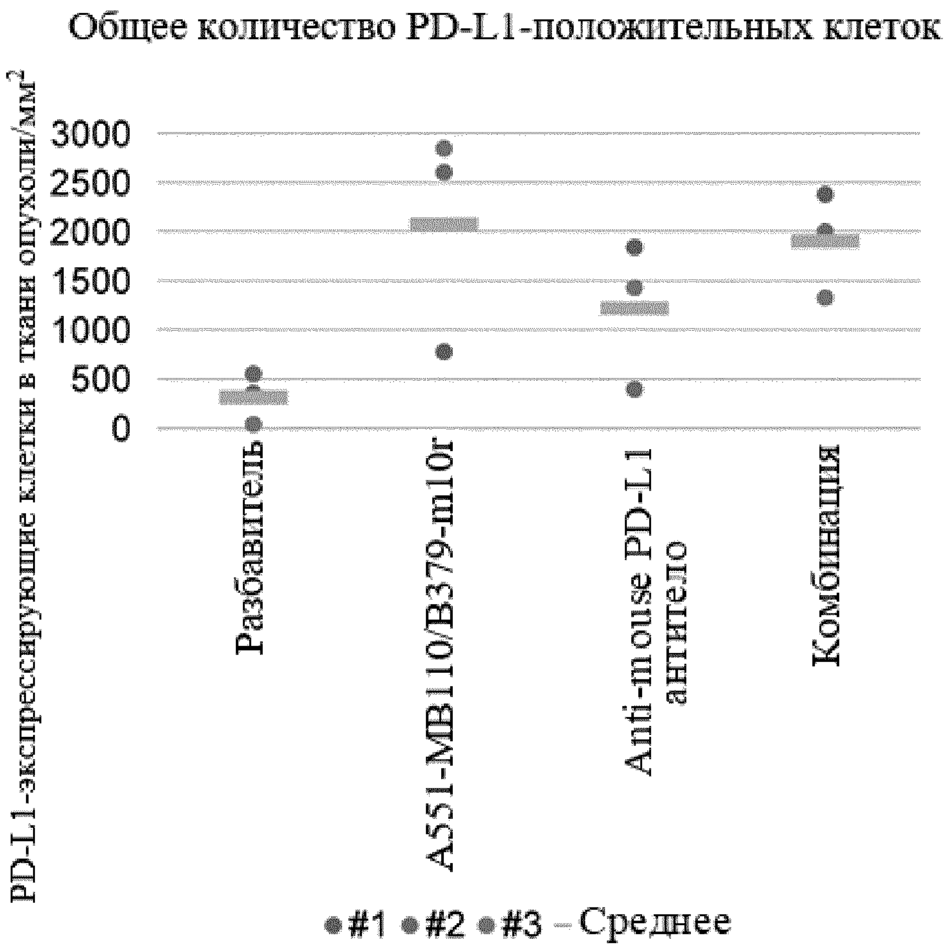


4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Объем опухоли (мм³, среднее + SD)
10
12
14
16
18
20
22
Сутки после трансплантации опухоли
A375/B167-MY201aPh
A375/B167-SCF041aPh

Фигура 81.

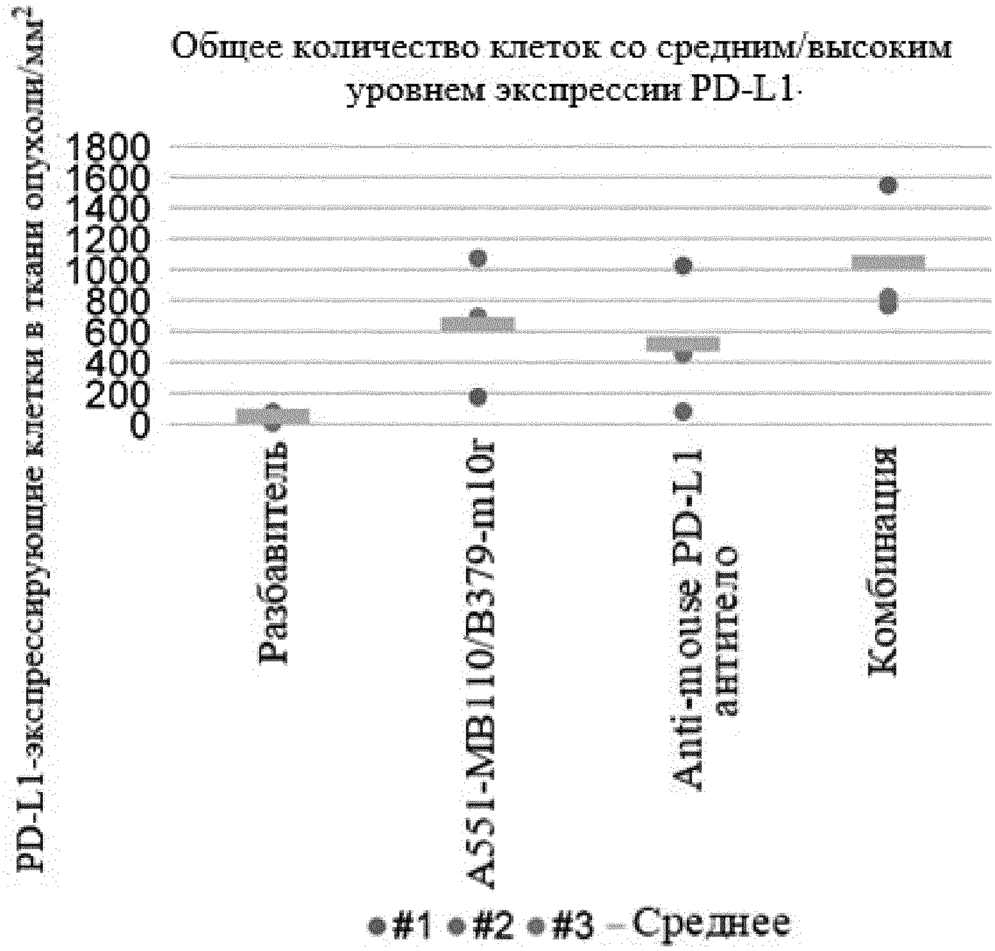

CD8+ T-клетки в ткани опухоли/мм2
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Разбавитель
A551-MB110/B379-m10r
Anti-mouse PD-L1 антитело
Комбинация
#1 #2 #3 Среднее

Фигура 82.

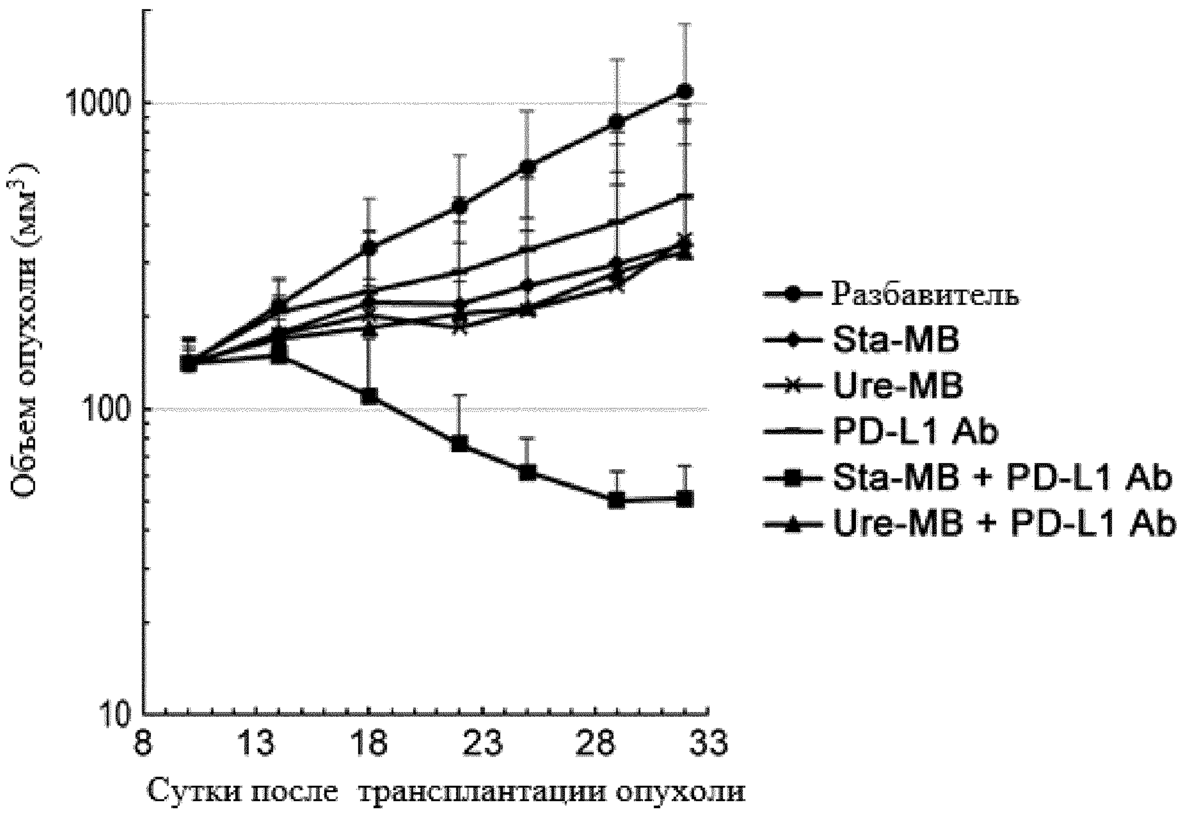


Общее количество PD-L1-положительных клеток
PD-L1-экспрессирующие клетки в ткани опухоли/мм^2
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Разбавитель
A551-MB110/B379-m10r
Anti-mouse PD-L1 антитело
Комбинация
#1 #2 #3 Среднее

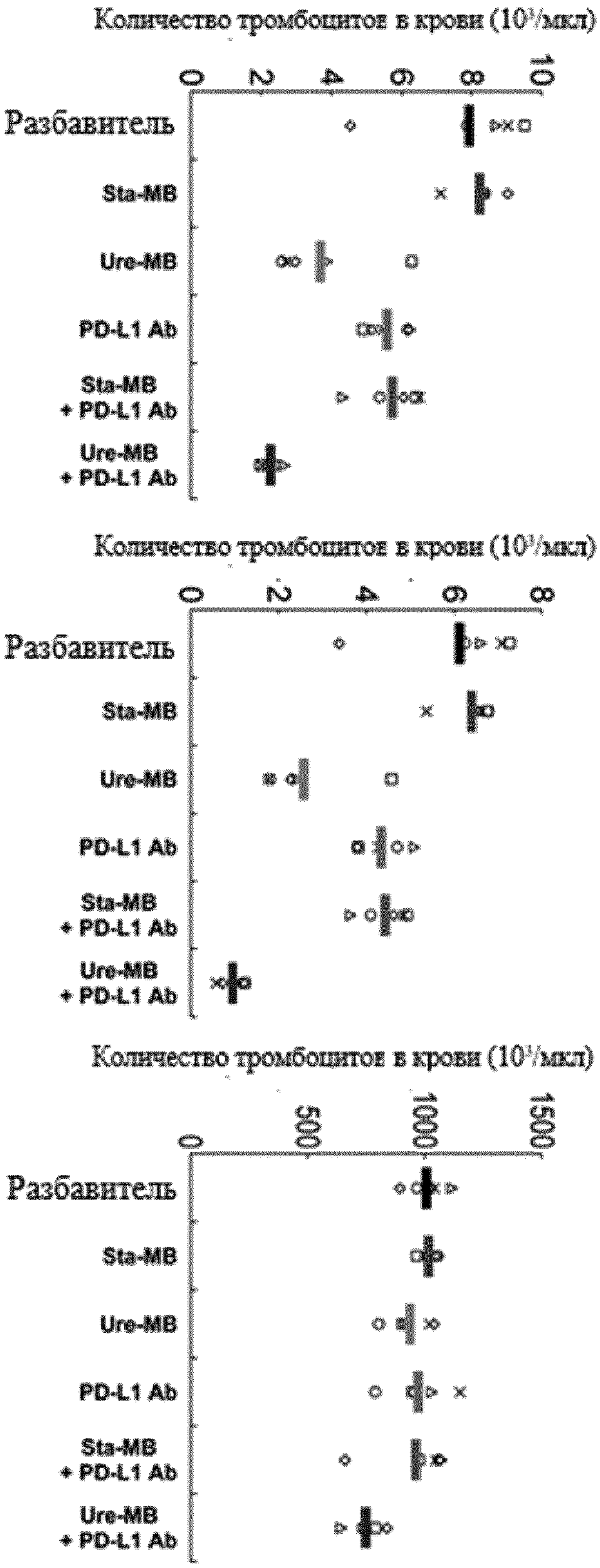
Фигура 83.


Общее количество клеток со средним/высоким уровнем экспрессии PD-L1
PD-L1-экспрессирующие клетки в ткани опухоли/мм^2
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Разбавитель
A551-MB110/B379-m10r
Anti-mouse PD-L1 антитело
Комбинация
#1 #2 #3 Среднее

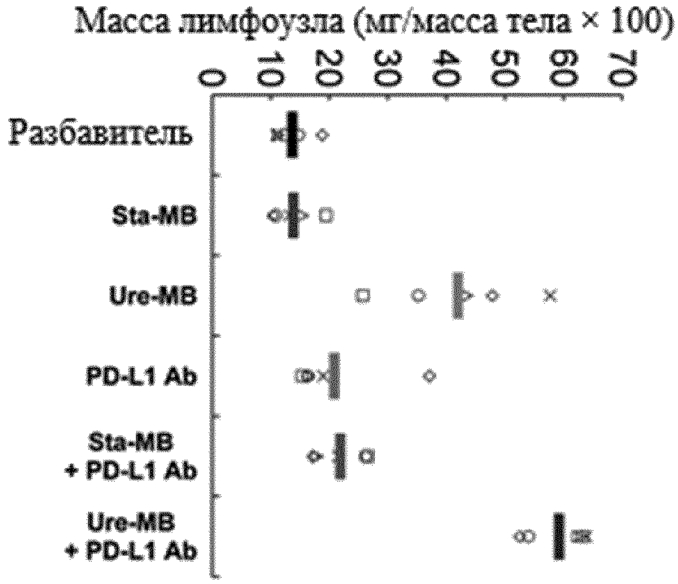
Фигура 84.

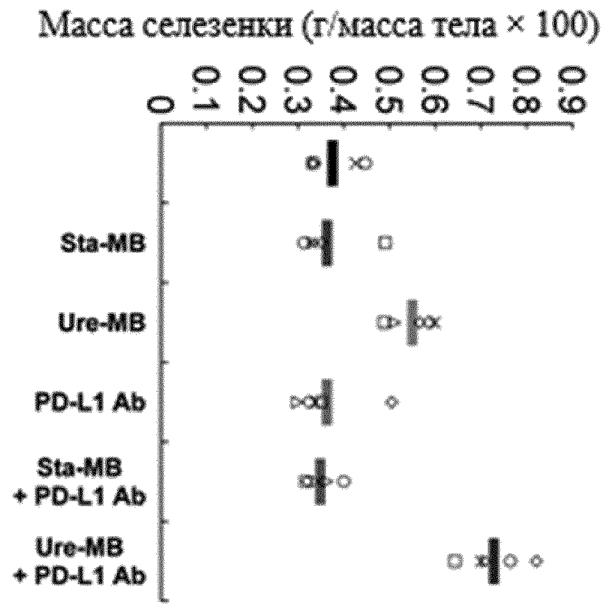

Объем опухоли (мм^3)
1000
100
10
8
13
18
23
28
33
Сутки после трансплантации опухоли
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab

Фигура 85.

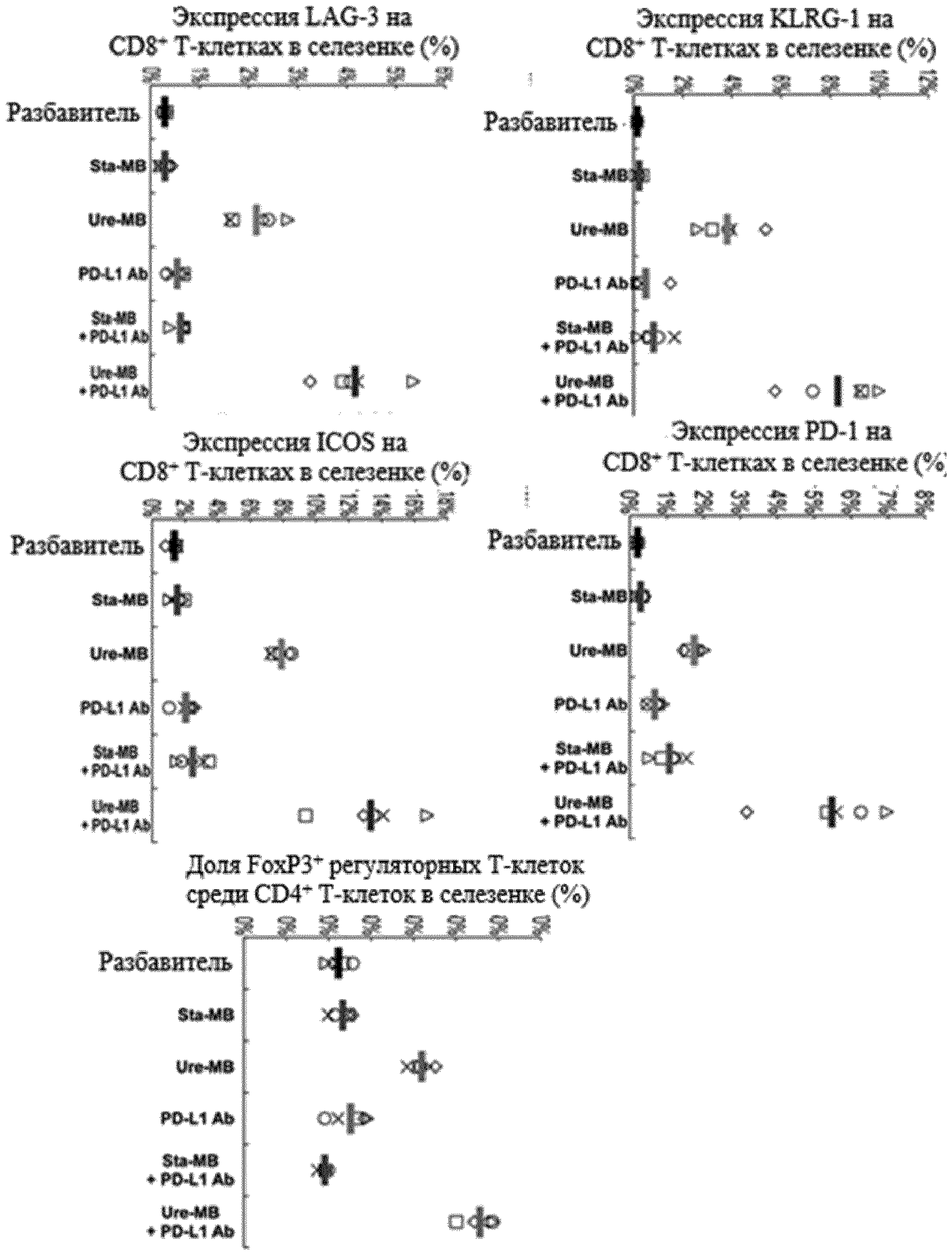

Количество тромбоцитов в крови (10^3/мкл)
0
2
4
6
8
10
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab
Количество тромбоцитов в крови (10^3/мкл)
0
2
4
6
8
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab
Количество тромбоцитов в крови (10^3/мкл)
0
500
1000
1500
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab

Фигура 86.


Масса лимфоузла (мг/масса тела × 100)
0
10
20
30
40
50
60
70
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB
+ PD-L1 Ab
Ure-MB
+ PD-L1 Ab

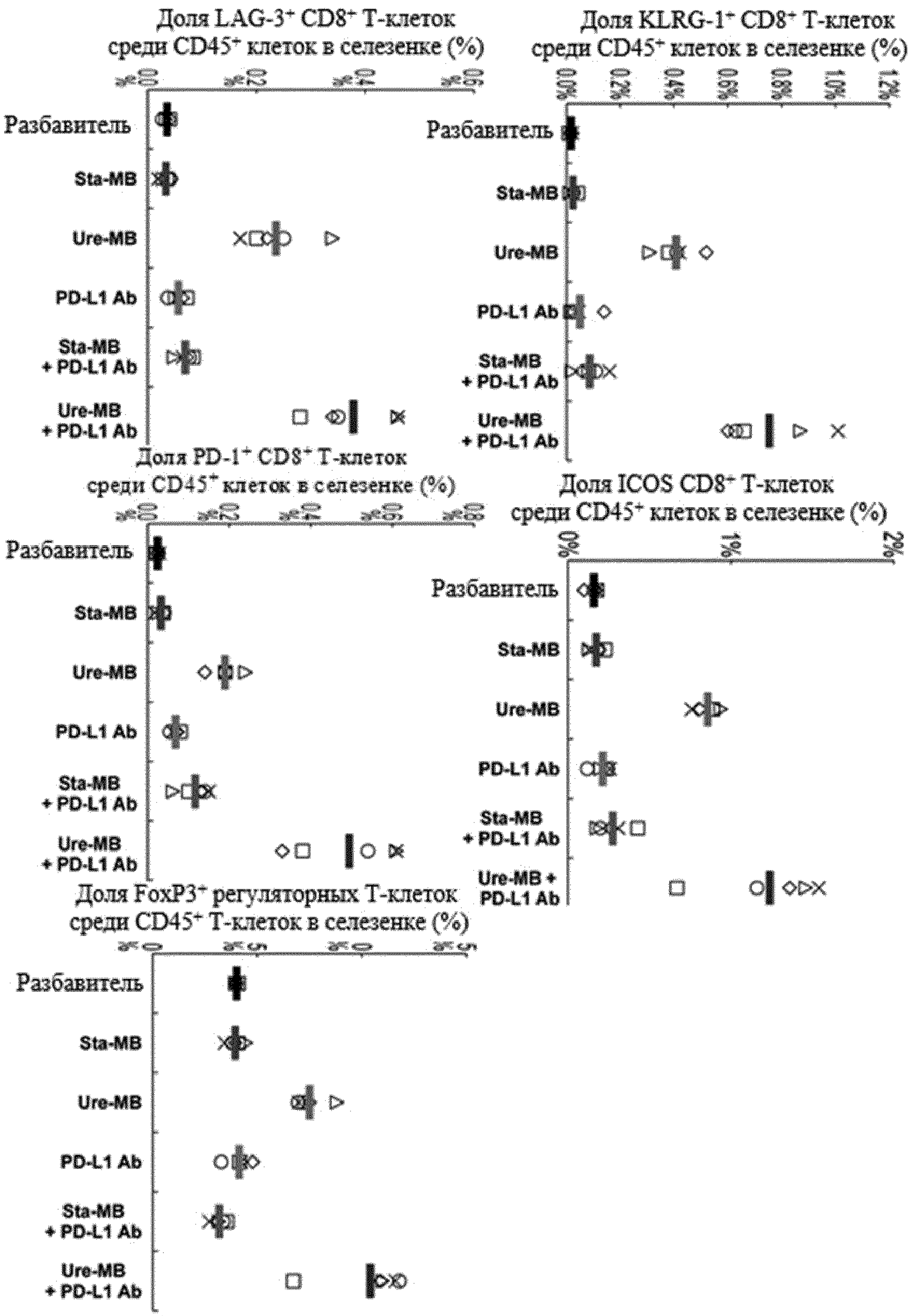

Масса селезенки (г/масса тела × 100)
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB
+ PD-L1 Ab
Ure-MB
+ PD-L1 Ab

Фигура 87.



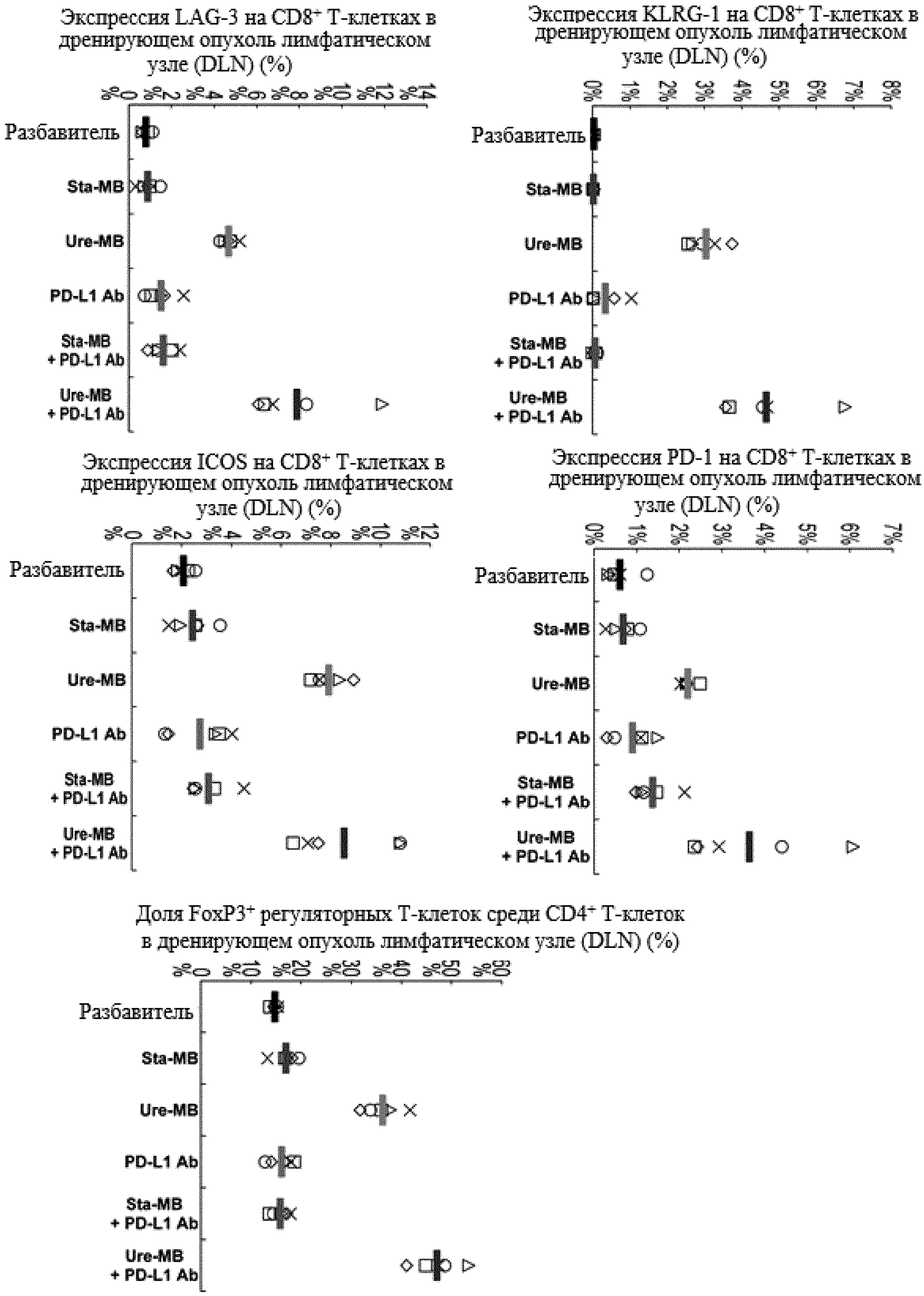
Экспрессия LAG-3 на CD8⁺ Т-клетках в селезенке (%)
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab
Экспрессия KLRG-1 на CD8⁺ Т-клетках в селезенке (%)
Экспрессия ICOS на CD8⁺ Т-клетках в селезенке (%)
Экспрессия PD-1 на CD8⁺ Т-клетках в селезенке (%)
Доля FoxP3⁺ регуляторных Т-клеток среди CD4⁺ Т-клеток в селезенке (%)

Фигура 88.

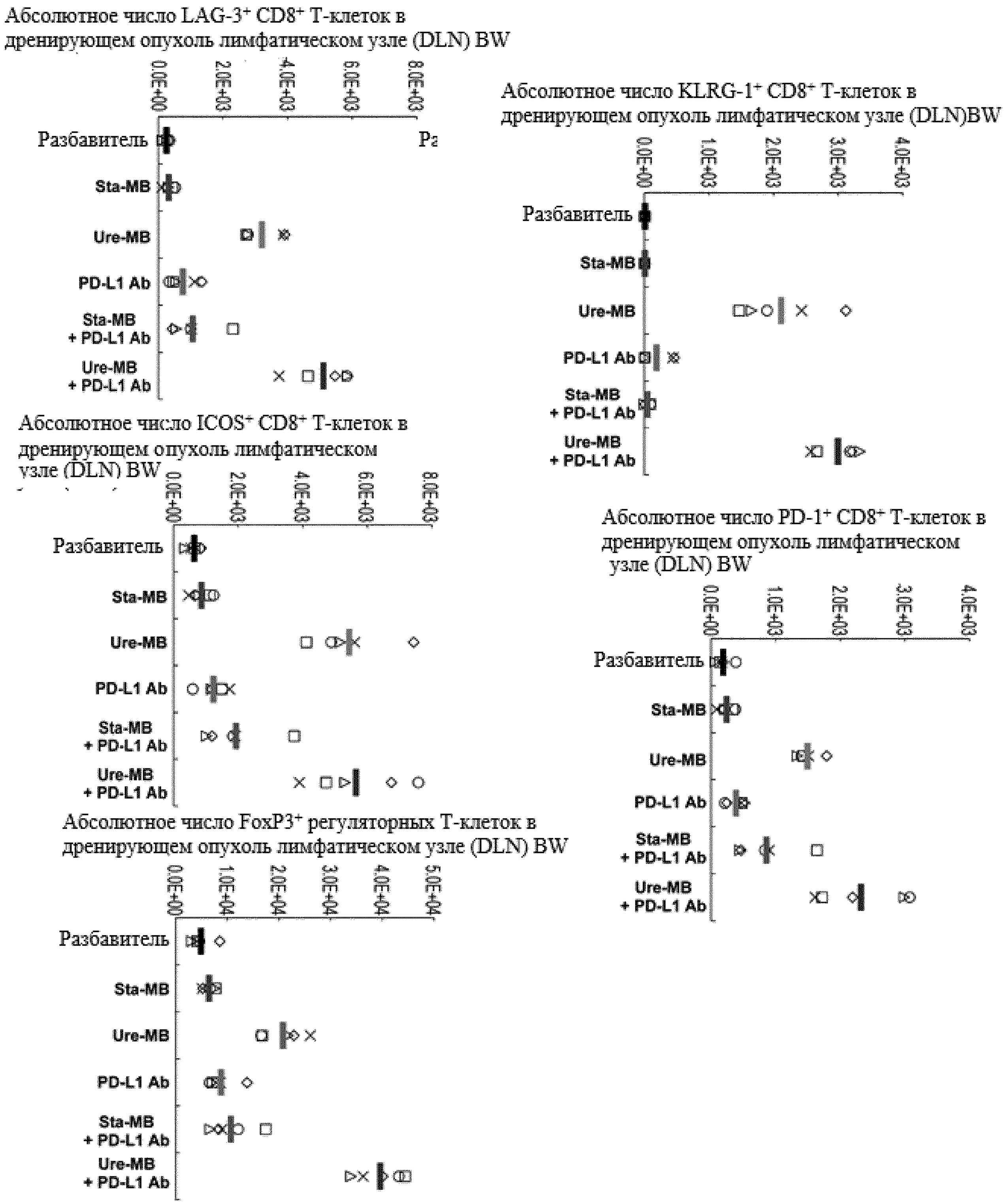


Доля LAG-3⁺ CD8⁺ Т-клеток среди CD45⁺ клеток в селезенке (%)
0.0%
0.2%
0.4%
0.6%
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab
Доля KLRG-1⁺ CD8⁺ Т-клеток среди CD45⁺ клеток в селезенке (%)
0.0%
0.2%
0.4%
0.6%
0.8%
1.0%
1.2%
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab
Доля PD-1⁺ CD8⁺ Т-клеток среди CD45⁺ клеток в селезенке (%)
0.0%
0.2%
0.4%
0.6%
0.8%
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab
Доля ICOS CD8⁺ Т-клеток среди CD45⁺ клеток в селезенке (%)
0%
1%
2%
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab
Доля FoxP3⁺ регуляторных Т-клеток среди CD45⁺ Т-клеток в селезенке (%)
0%
5%
10%
15%
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab

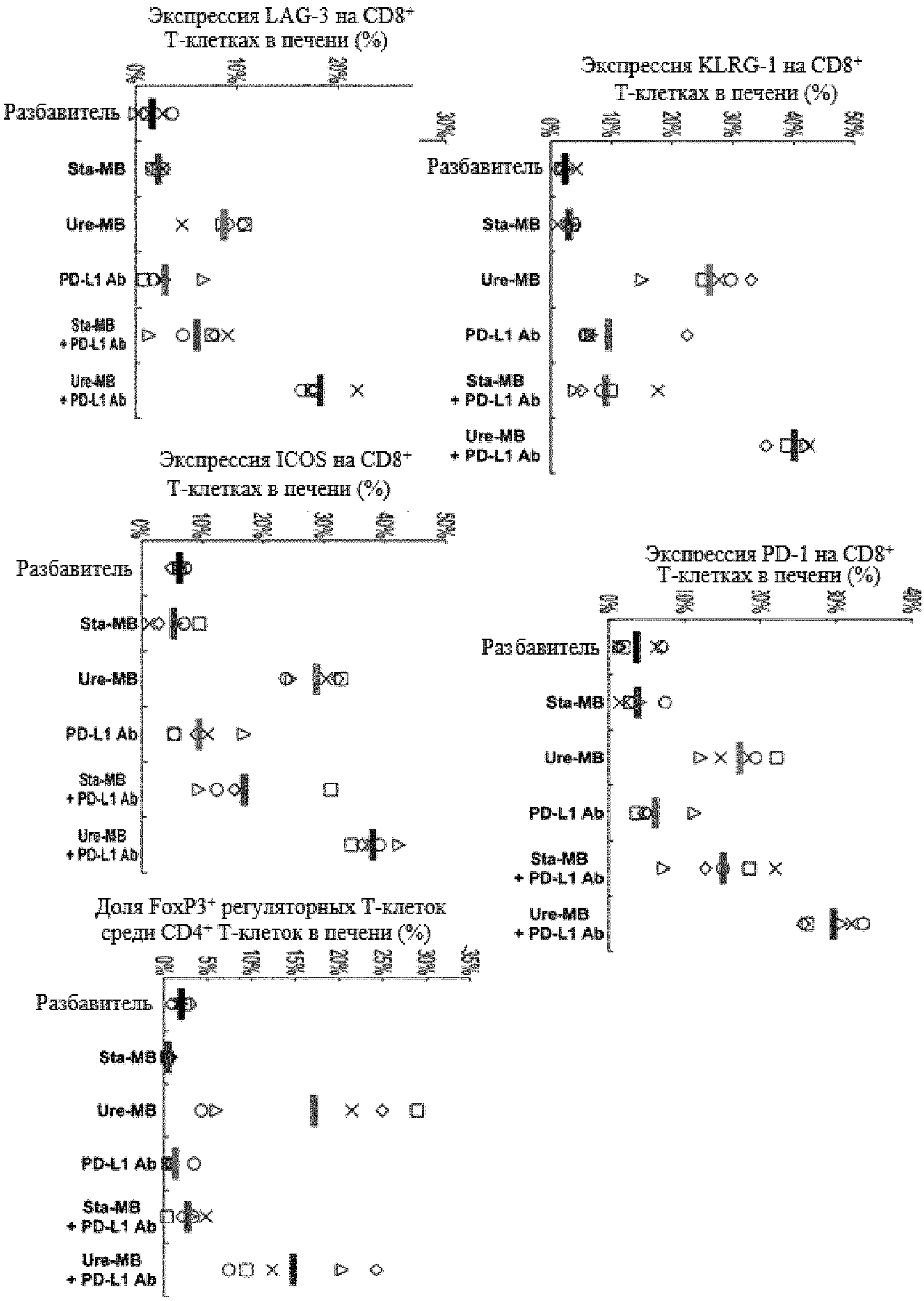
Фигура 89.


Экспрессия LAG-3 на CD8+ T-клетках в дренирующем опухоль лимфатическом узле (DLN) (%)
0% 2% 4% 6% 8% 10% 12% 14%
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab
Экспрессия KLRG-1 на CD8+ T-клетках в дренирующем опухоль лимфатическом узле (DLN) (%)
0% 1% 2% 3% 4% 5% 6% 7% 8%
Экспрессия ICOS на CD8+ T-клетках в дренирующем опухоль лимфатическом узле (DLN) (%)
0% 2% 4% 6% 8% 10% 12%
Экспрессия PD-1 на CD8+ T-клетках в дренирующем опухоль лимфатическом узле (DLN) (%)
0% 1% 2% 3% 4% 5% 6% 7%
Доля FoxP3+ регуляторных T-клеток среди CD4+ T-клеток в дренирующем опухоль лимфатическом узле (DLN) (%)
0% 10% 20% 30% 40% 50% 60%

Фигура 90.

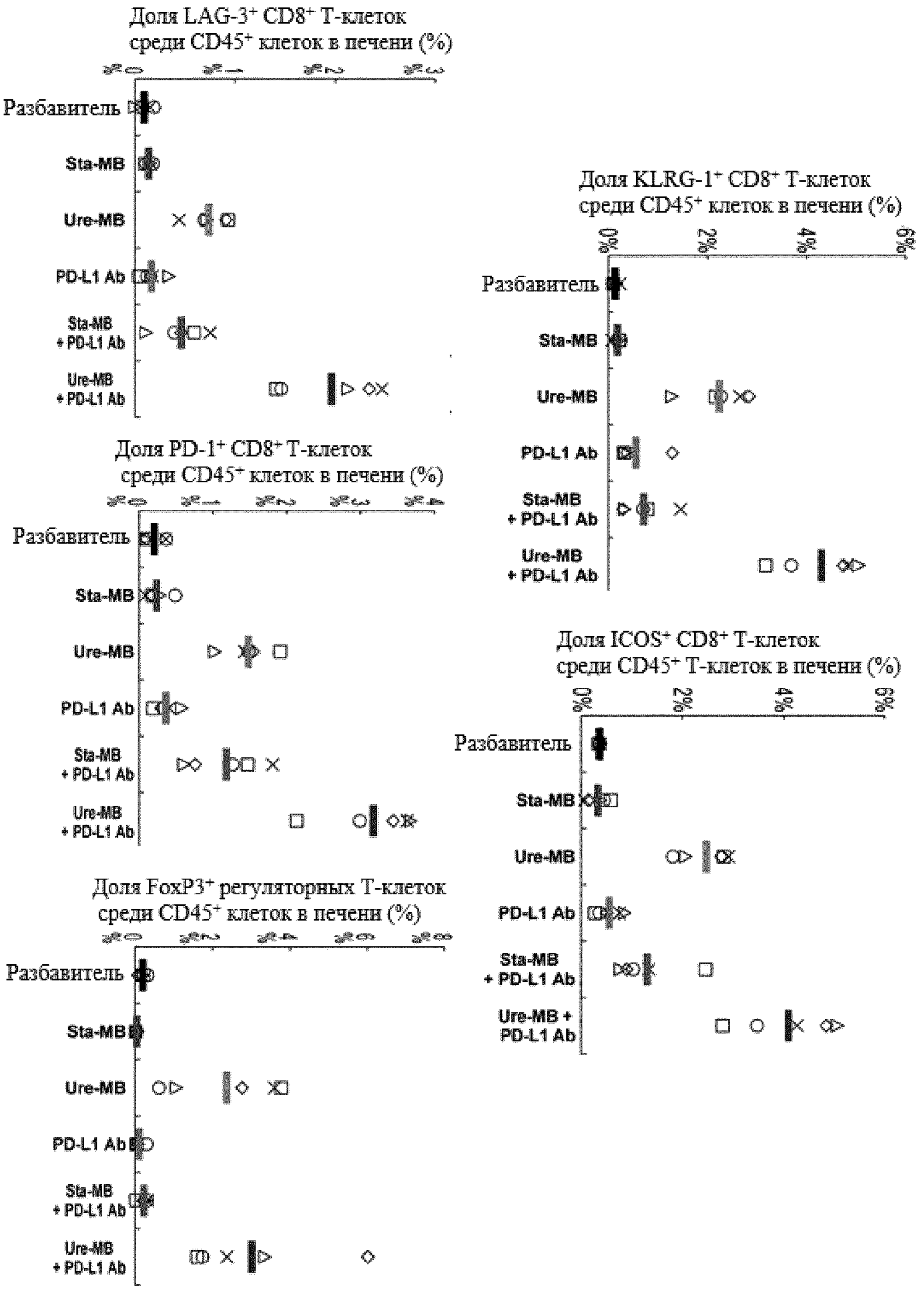

Абсолютное число LAG-3+ CD8+ Т-клеток в дренирующем опухоль лимфатическом узле (DLN) BW
0.0E+00
2.0E+03
4.0E+03
6.0E+03
8.0E+03
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab
Абсолютное число KLRG-1+ CD8+ Т-клеток в дренирующем опухоль лимфатическом узле (DLN)BW
0.0E+00
1.0E+03
2.0E+03
3.0E+03
4.0E+03
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab
Абсолютное число ICOS+ CD8+ Т-клеток в дренирующем опухоль лимфатическом узле (DLN) BW
0.0E+00
2.0E+03
4.0E+03
6.0E+03
8.0E+03
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab
Абсолютное число PD-1+ CD8+ Т-клеток в дренирующем опухоль лимфатическом узле (DLN) BW
0.0E+00
1.0E+03
2.0E+03
3.0E+03
4.0E+03
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab
Абсолютное число FoxP3+ регуляторных Т-клеток в дренирующем опухоль лимфатическом узле (DLN) BW
0.0E+00
1.0E+04
2.0E+04
3.0E+04
4.0E+04
5.0E+04
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab

Фигура 91.

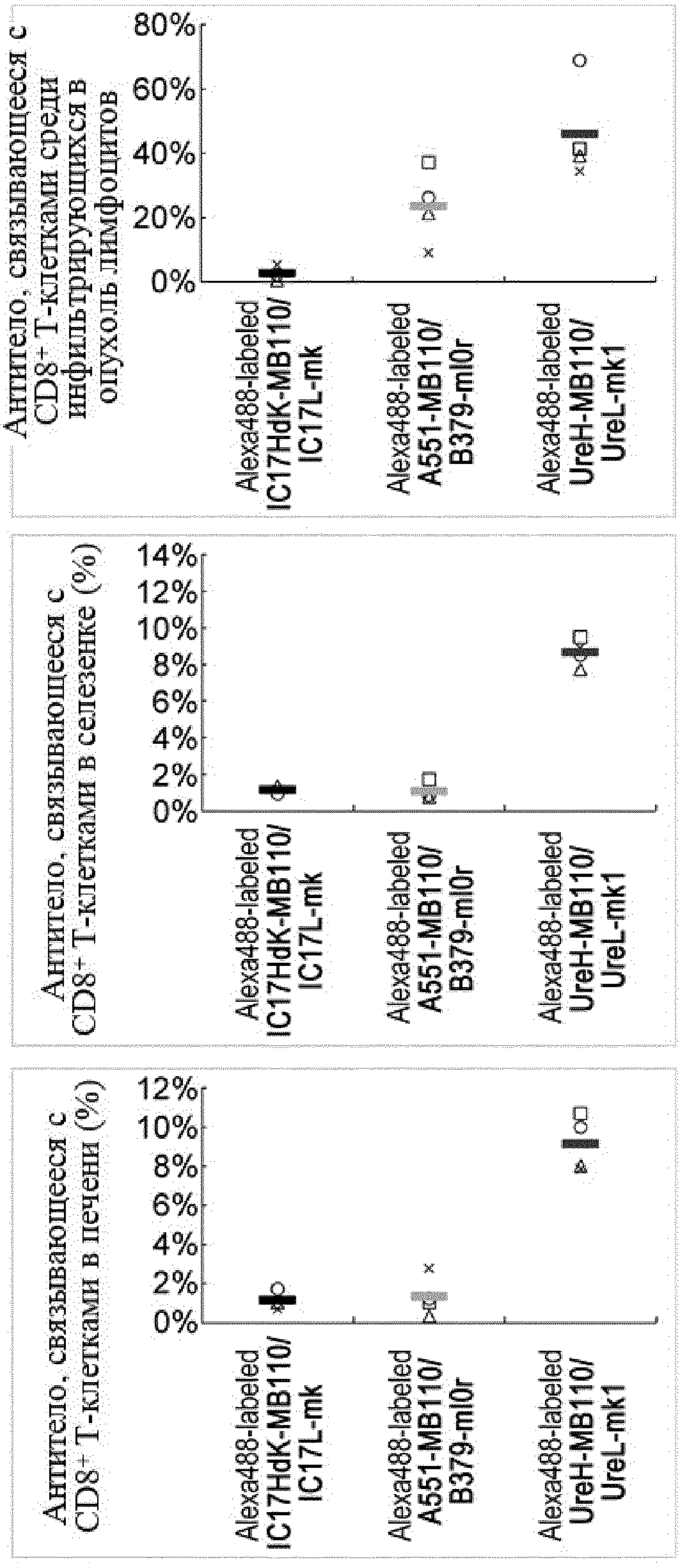


Экспрессия LAG-3 на CD8+ Т-клетках в печени (%)
0%
10%
20%
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab
Экспрессия KLRG-1 на CD8+ Т-клетках в печени (%)
0%
10%
20%
30%
40%
50%
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab
Экспрессия ICOS на CD8+ Т-клетках в печени (%)
0%
10%
20%
30%
40%
50%
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab
Экспрессия PD-1 на CD8+ Т-клетках в печени (%)
0%
10%
20%
30%
40%
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab
Доля FoxP3+ регуляторных Т-клеток среди CD4+ Т-клеток в печени (%)
0%
5%
10%
15%
20%
25%
30%
35%
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab

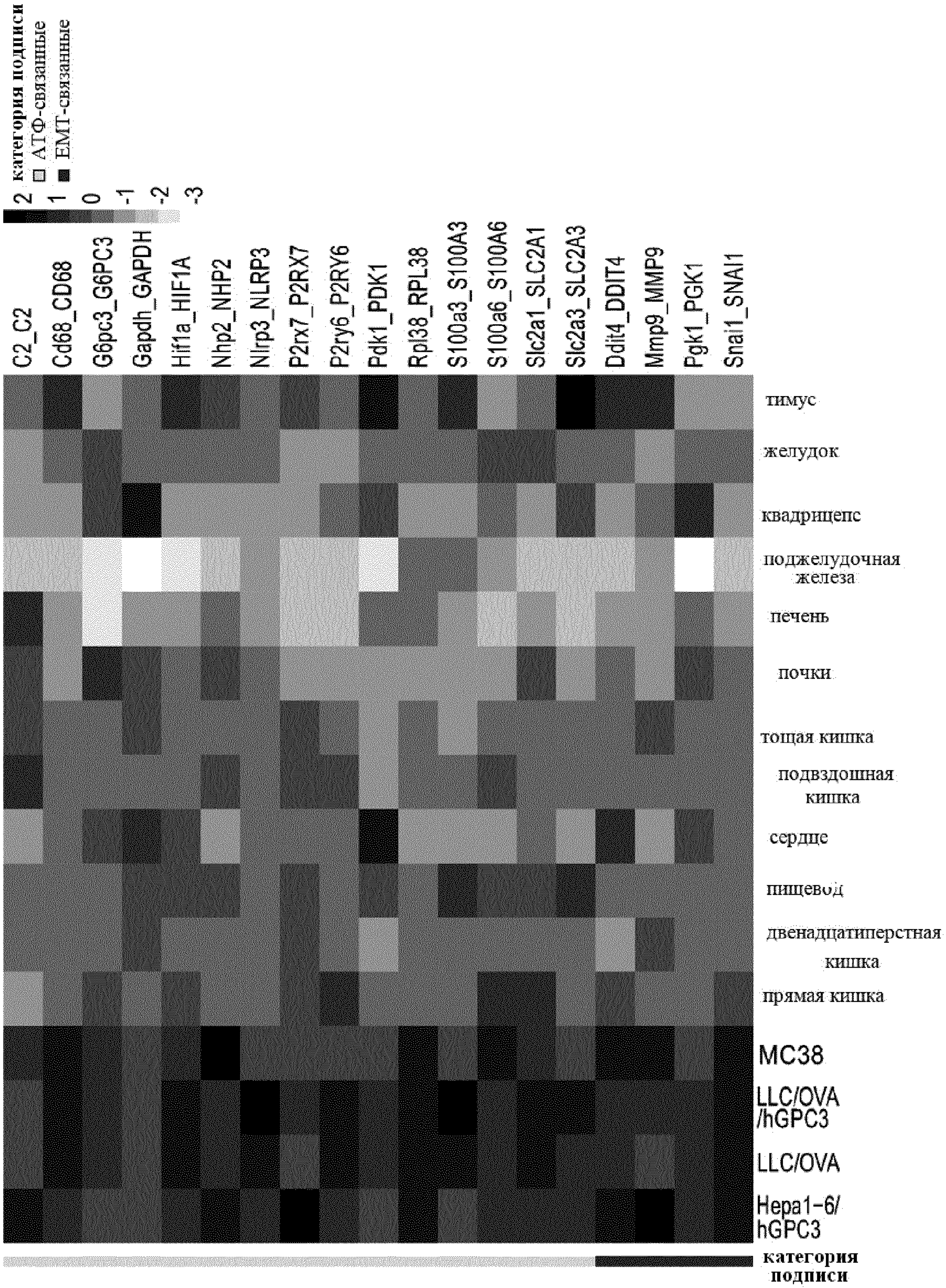
Фигура 92.


Доля LAG-3+ CD8+ Т-клеток среди CD45+ клеток в печени (%)
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab
Доля KLRG-1+ CD8+ Т-клеток среди CD45+ клеток в печени (%)
0%
2%
4%
6%
Доля PD-1+ CD8+ Т-клеток среди CD45+ клеток в печени (%)
Доля ICOS+ CD8+ Т-клеток среди CD45+ Т-клеток в печени (%)
Доля FoxP3+ регуляторных Т-клеток среди CD45+ клеток в печени (%)

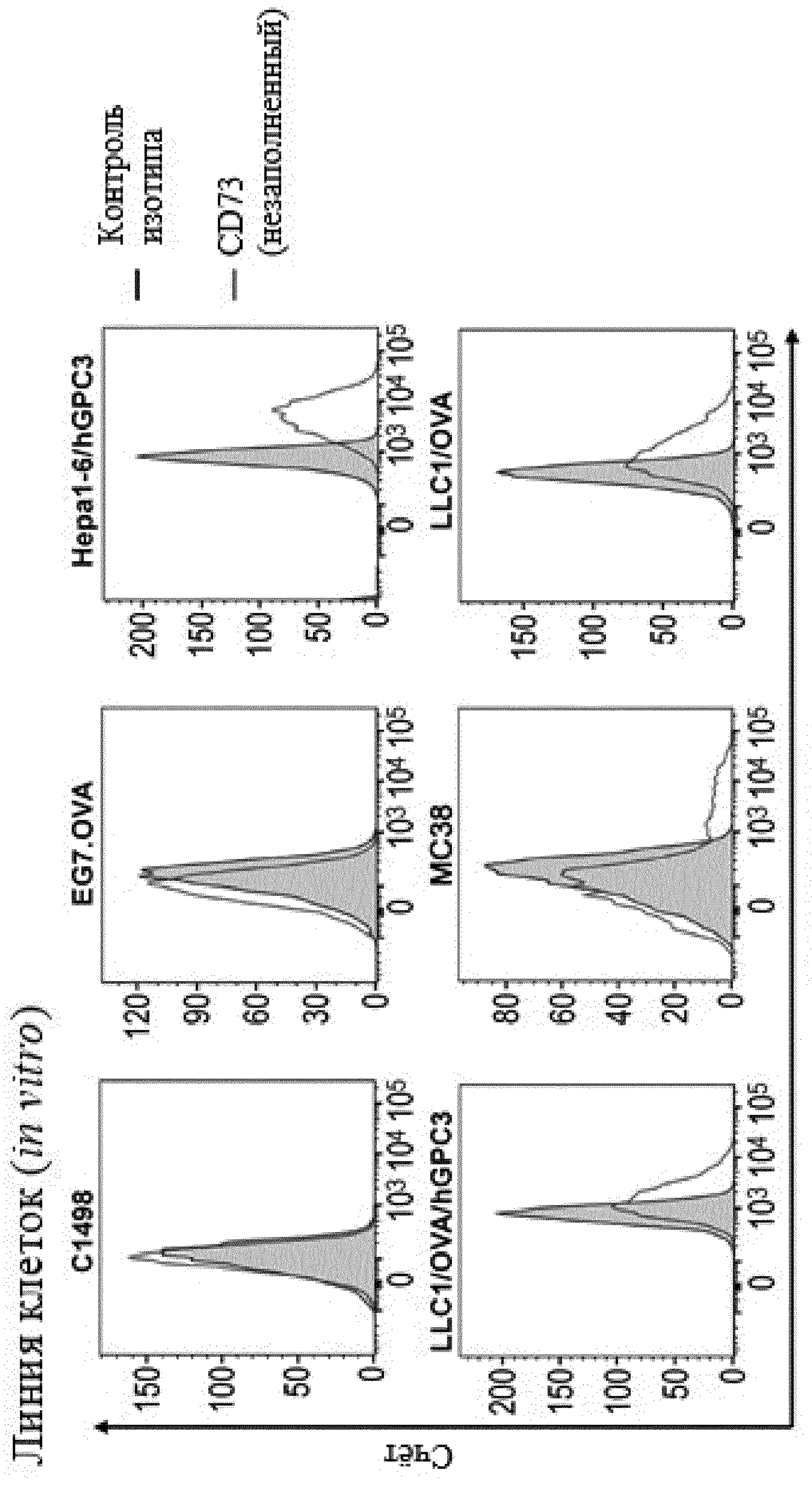
Фигура 93.


Антитело, связывающееся с CD8+ Т-клетками среди инфильтрирующихся в опухоль лимфоцитов
0%
20%
40%
60%
80%
Alexa488-labeled IC17HdK-MB110/ IC17L-mk
Alexa488-labeled A551-MB110/ B379-ml0r
Alexa488-labeled UreH-MB110/ UreL-mk1
Антитело, связывающееся с CD8+ Т-клетками в селезенке (%)
0%
2%
4%
6%
8%
10%
12%
14%
Alexa488-labeled IC17HdK-MB110/ IC17L-mk
Alexa488-labeled A551-MB110/ B379-ml0r
Alexa488-labeled UreH-MB110/ UreL-mk1
Антитело, связывающееся с CD8+ Т-клетками в печени (%)
0%
2%
4%
6%
8%
10%
12%
Alexa488-labeled IC17HdK-MB110/ IC17L-mk
Alexa488-labeled A551-MB110/ B379-ml0r
Alexa488-labeled UreH-MB110/ UreL-mk1

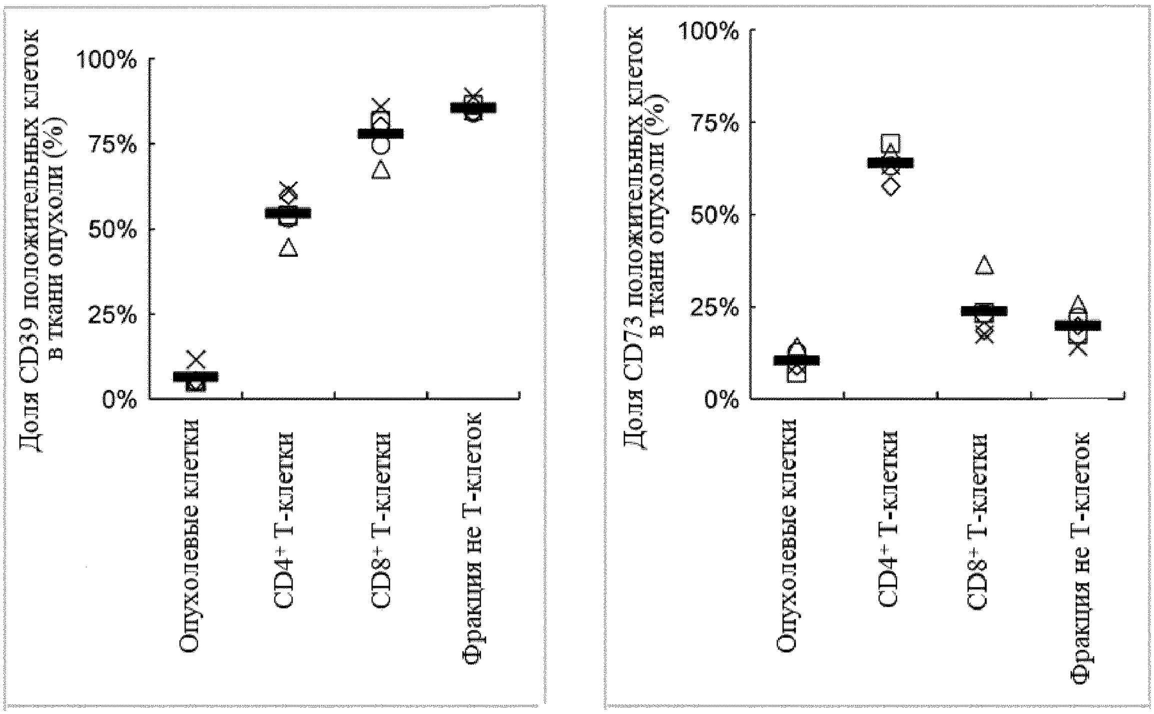
Фигура 94.


категория подписи
АТФ-связанные
ЕМТ-связанные
2
1
0
-1
-2
-3
C2_C2
Cd68_CD68
G6pc3_G6PC3
Gapdh_GAPDH
Hif1a_HIF1A
Nhp2_NHP2
Nlrp3_NLRP3
P2rx7_P2RX7
P2ry6_P2RY6
Pdk1_PDK1
Rpl38_RPL38
S100a3_S100A3
S100a6_S100A6
Slc2a1_SLC2A1
Slc2a3_SLC2A3
Ddit4_DDIT4
Mmp9_MMP9
Pgk1_PGK1
Snai1_SNAI1
тимус
желудок
квадрицепс
поджелудочная железа
печень
почки
тощая кишка
подвздошная кишка
сердце
пищевод
двенадцатиперстная кишка
прямая кишка
MC38
LLC/OVA /hGPC3
LLC/OVA
Hepa1-6/ hGPC3
категория подписи

Фигура 95.

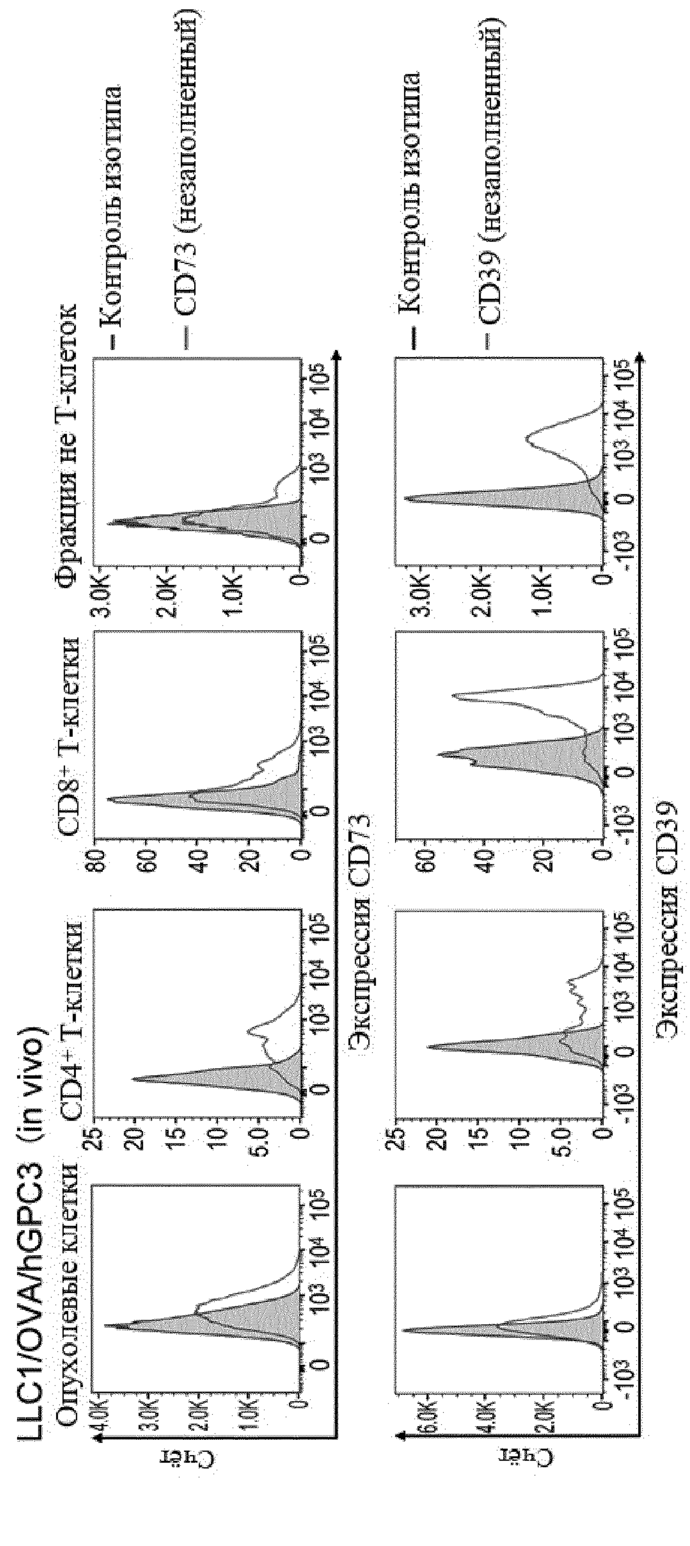

Линия клеток (in vitro)
C1498
EG7.OVA
Hepa1-6/hGPC3
LLC1/OVA/hGPC3
MC38
LLC1/OVA
Контроль изотипа
CD73 (незаполненный)
Счёт
Экспрессия CD73

Фигура 96.



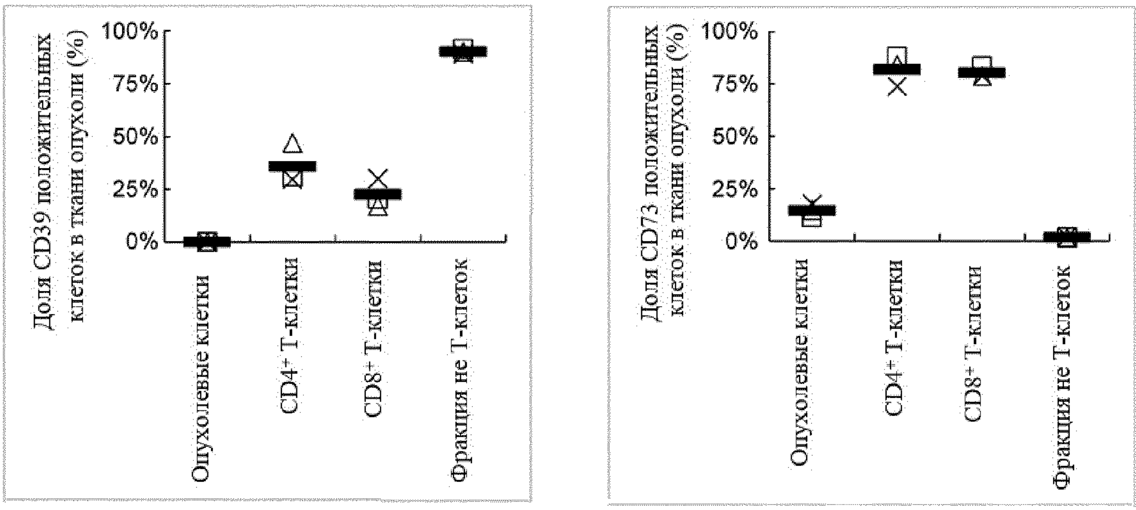
Доля CD39 положительных клеток в ткани опухоли (%)
100%
75%
50%
25%
0%
Опухолевые клетки
CD4+ T-клетки
CD8+ T-клетки
Фракция не T-клеток
Доля CD73 положительных клеток в ткани опухоли (%)
100%
75%
50%
25%
0%
Опухолевые клетки
CD4+ T-клетки
CD8+ T-клетки
Фракция не T-клеток

Фигура 97.

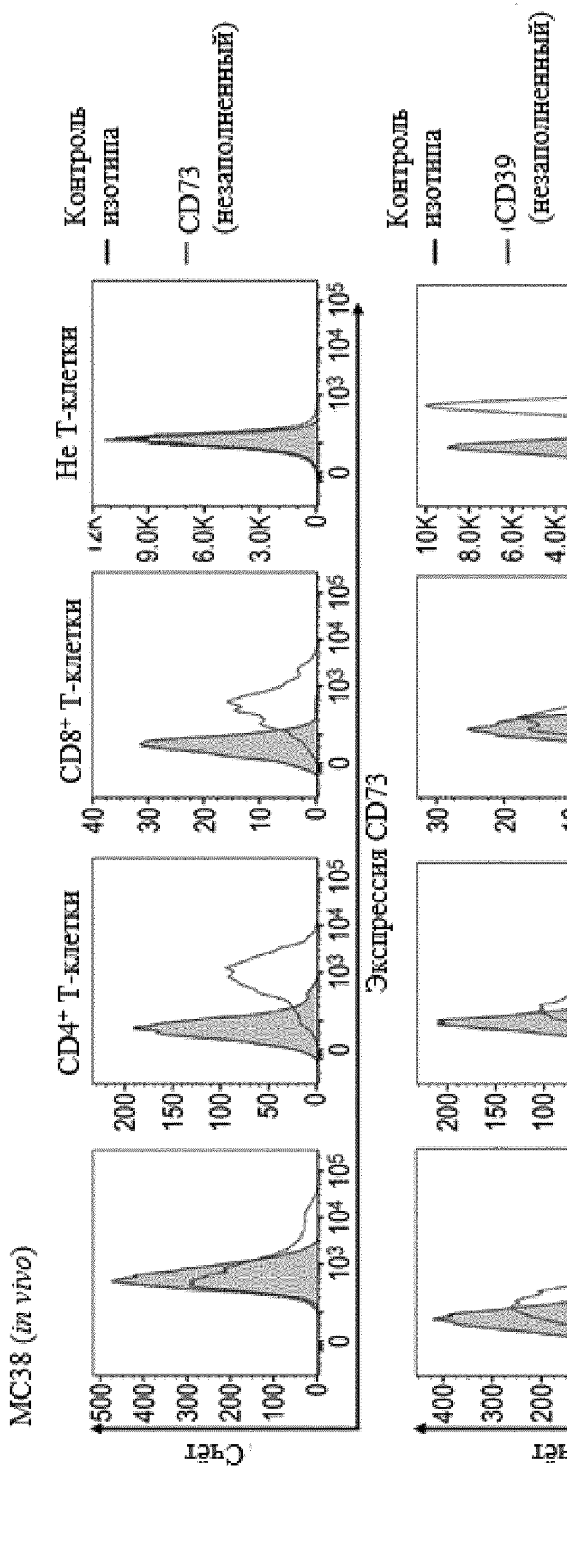


LLC1/OVA/hGPC3 (in vivo)
Опухолевые клетки
CD4+ T-клетки
CD8+ T-клетки
Фракция не T-клеток
Контроль изотипа
CD73 (незаполненный)
CD39 (незаполненный)
Экспрессия CD73
Экспрессия CD39
Счёт

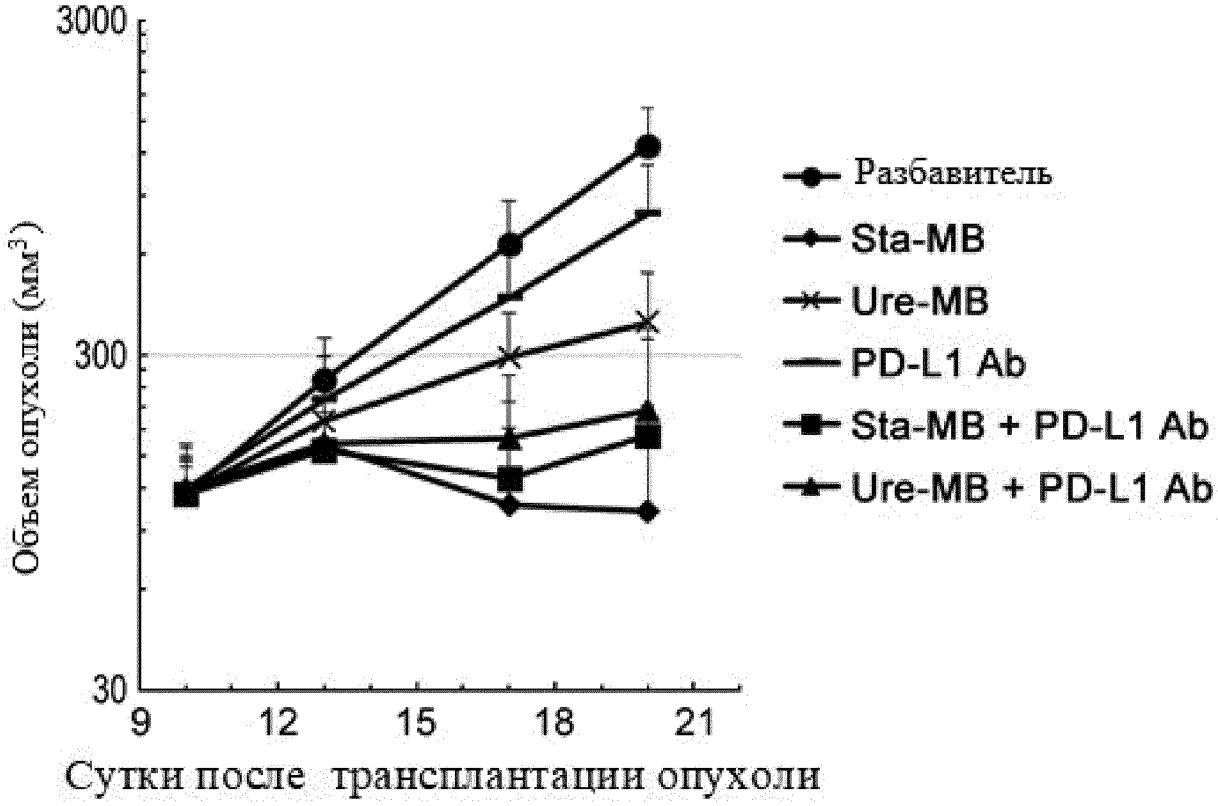
Фигура 98.


Доля CD39 положительных клеток в ткани опухоли (%)
100%
75%
50%
25%
0%
Опухолевые клетки
CD4+ Т-клетки
CD8+ Т-клетки
Фракция не Т-клеток
Доля CD73 положительных клеток в ткани опухоли (%)
100%
75%
50%
25%
0%
Опухолевые клетки
CD4+ Т-клетки
CD8+ Т-клетки
Фракция не Т-клеток

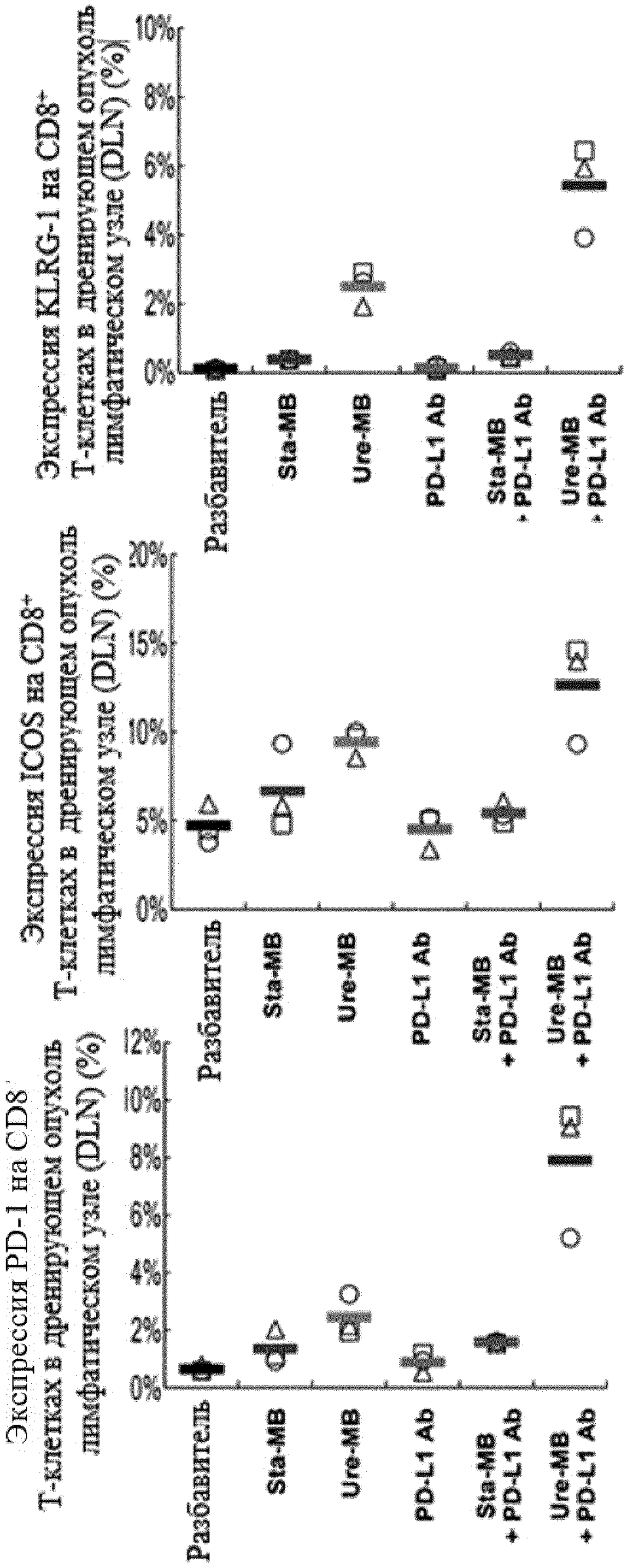
Фигура 99.


MC38 (in vivo)
CD4+ T-клетки
CD8+ T-клетки
Не T-клетки
Контроль изотипа
CD73 (незаполненный)
CD39 (незаполненный)
Счёт
Экспрессия CD73
Экспрессия CD39

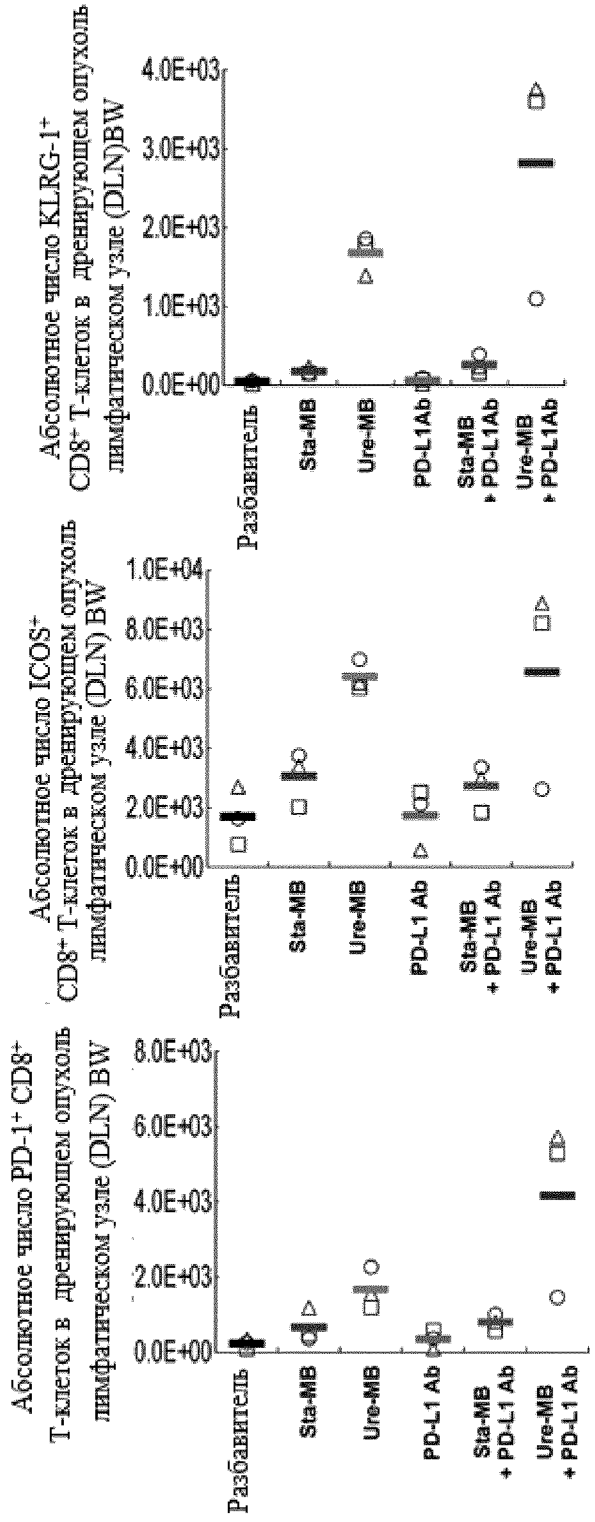
Фигура 100.


3000
300
30
9
12
15
18
21
Объем опухоли (мм^3)
Сутки после трансплантации опухоли
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab

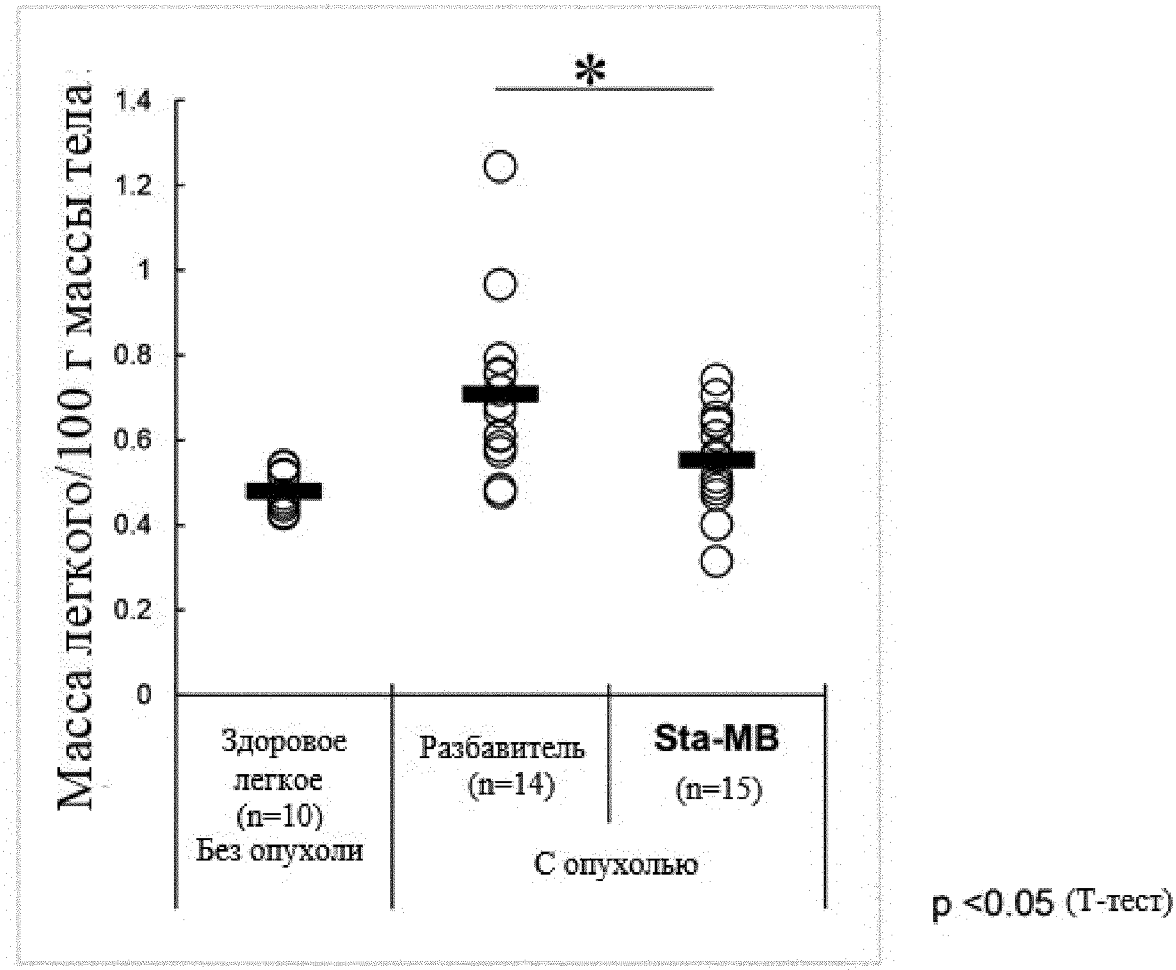
Фигура 101.


Экспрессия KLRG-1 на CD8+
Т-клетках в дренирующем опухоль
лимфатическом узле (DLN) (%)
0%
2%
4%
6%
8%
10%
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab
Экспрессия ICOS на CD8+
Т-клетках в дренирующем опухоль
лимфатическом узле (DLN) (%)
0%
5%
10%
15%
20%
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab
Экспрессия PD-1 на CD8+
Т-клетках в дренирующем опухоль
лимфатическом узле (DLN) (%)
0%
2%
4%
6%
8%
10%
12%
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab

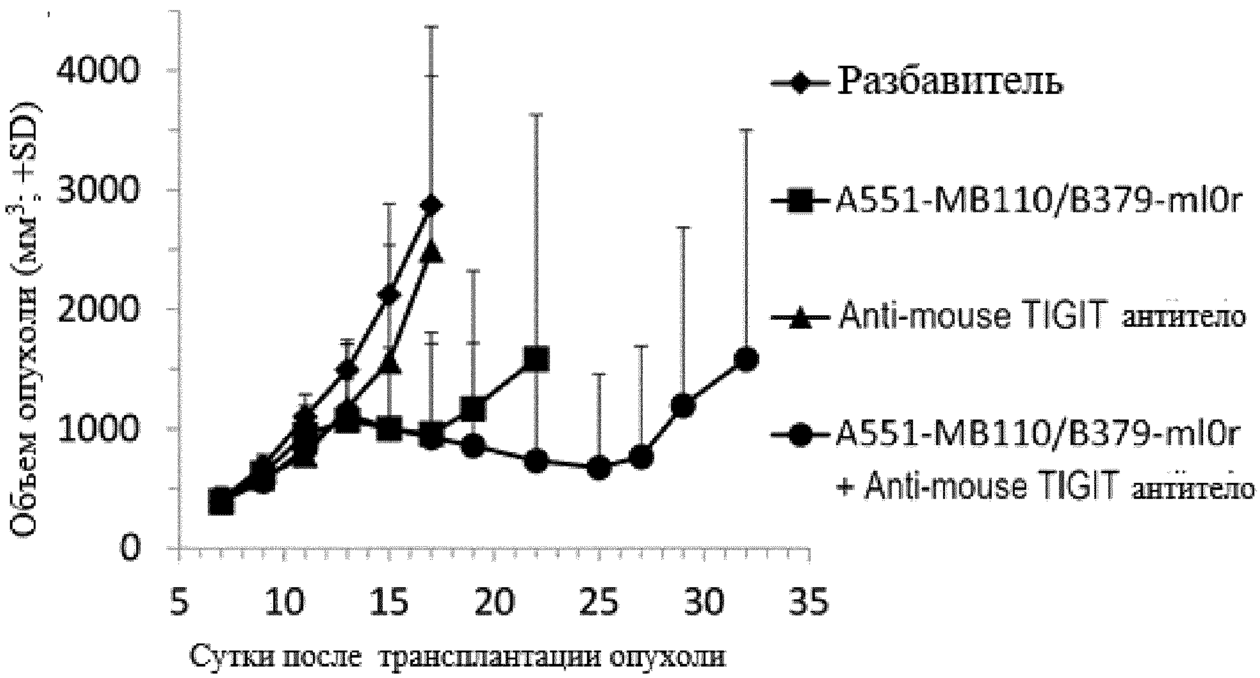
Фигура 102.


Абсолютное число KLRG-1+ CD8+ T-клеток в дренирующем опухоль лимфатическом узле (DLN)BW
4.0E+03
3.0E+03
2.0E+03
1.0E+03
0.0E+00
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1Ab
Sta-MB + PD-L1Ab
Ure-MB + PD-L1Ab
Абсолютное число ICOS+ CD8+ T-клеток в дренирующем опухоль лимфатическом узле (DLN) BW
1.0E+04
8.0E+03
6.0E+03
4.0E+03
2.0E+03
0.0E+00
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab
Абсолютное число PD-1+ CD8+ T-клеток в дренирующем опухоль лимфатическом узле (DLN) BW
8.0E+03
6.0E+03
4.0E+03
2.0E+03
0.0E+00
Разбавитель
Sta-MB
Ure-MB
PD-L1 Ab
Sta-MB + PD-L1 Ab
Ure-MB + PD-L1 Ab

Фигура 103.

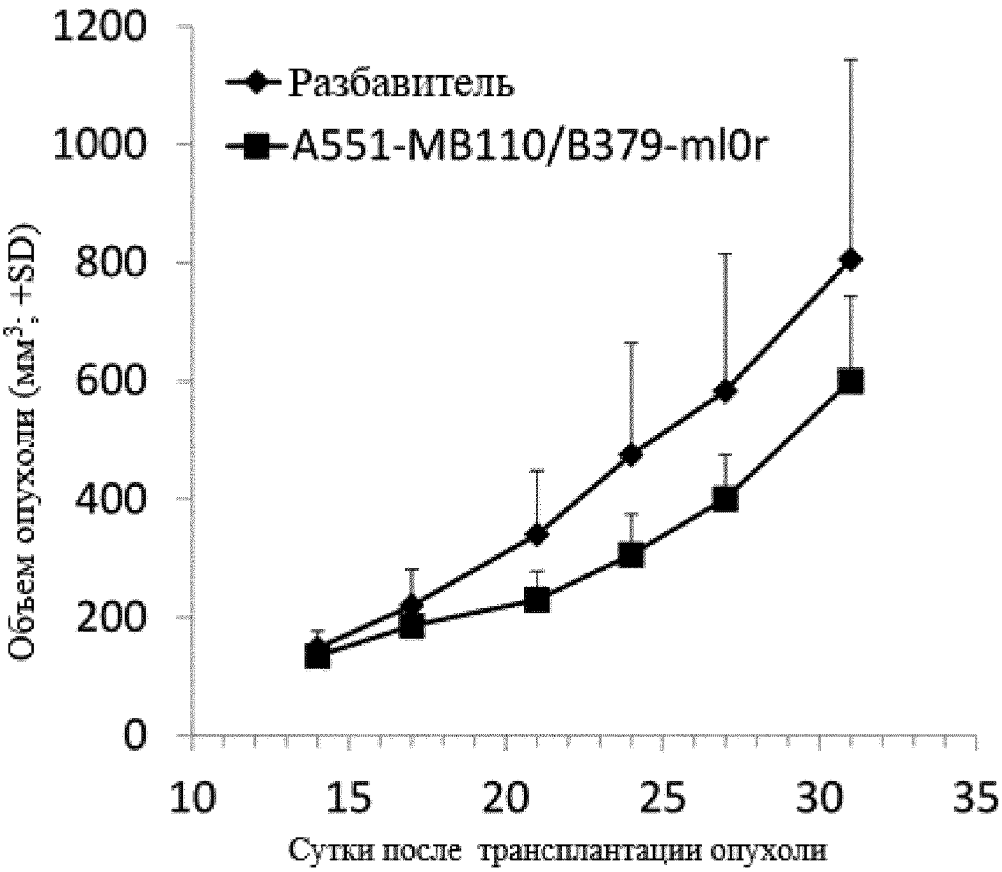

Масса легкого/100 г массы тела
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
Здоровое легкое (n=10)
Без опухоли
Разбавитель (n=14)
Sta-MB (n=15)
С опухолью
p <0.05 (T-тест)

Фигура 104.



Объем опухоли (мм^3; +SD)
4000
3000
2000
1000
0
5
10
15
20
25
30
35
Сутки после трансплантации опухоли
Разбавитель
A551-MB110/B379-ml0r
Anti-mouse TIGIT антитело
A551-MB110/B379-ml0r
+ Anti-mouse TIGIT антитело

Фигура 105.


Разбавитель
A551-MB110/B379-ml0r
Объем опухоли (мм³; +SD)
0
200
400
600
800
1000
1200
10
15
20
25
30
35
Сутки после трансплантации опухоли

Фигура 106.