

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043217**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.28

(21) Номер заявки
202090204

(22) Дата подачи заявки
2018.07.25

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

(54) АНТИ-CD137 АНТИТЕЛА

(31) 62/539,687

(32) 2017.08.01

(33) US

(43) 2020.05.22

(86) PCT/US2018/043632

(87) WO 2019/027754 2019.02.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
**Фрай Кристофер Карл, Кейлос Майкл
Дивейн, Котанайдс Хелен, Сандефер
Стефани Линн (US)**

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

(56) US-B2-8337850

US-B2-7288638

US-A1-2016244528

TIMOTHY S. FISHER ET AL.: "Targeting of 4-1BB by monoclonal antibody PF-05082566 enhances T-cell function and promotes anti-tumor activity", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, vol. 61, № 10, 11 March 2012 (2012-03-11), pages 1721-1733, XP055391951, Berlin/Heidelberg, ISSN: 0340-7004, DOI: 10.1007/S00262-012-1237-1, page 1724, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 2

ZHIQIANG GUO ET AL.: "Combined TIM-3 blockade and CD137 activation affords the long-term protection in a murine model of ovarian cancer", JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE, BIOMED CENTRAL, vol. 11, № 1, 17 September 2013 (2013-09-17), page 215, XP021164386, ISSN: 1479-5876, DOI: 10.1186/1479-5876-11-215, figure 1
WO-A1-03049755

(57) Изобретение относится к антителам, которые связываются с CD137 человека, проявляют агонистическую активность и могут быть полезны для лечения солидных и гематологических опухолей в монотерапии и в комбинации с химиотерапией и ионизирующим излучением.

B1

043217

**043217
B1**

Данное изобретение относится к области медицины. В частности, данное изобретение относится к агонистическим антителам, направленным на CD137 человека, композициям, содержащим такие агонистические антитела против CD137 человека, и способам применения таких агонистических антител против CD137 человека для лечения солидных и гематологических опухолей в монотерапии или в комбинации с химиотерапией и другими способами лечения рака.

В настоящее время известно, что усиление противоопухолевого иммунного ответа может быть эффективным средством лечения рака. В этом отношении CD137, также известный как 4-1BB, принадлежит к семейству рецепторов TNF и играет роль в активации иммунных ответов Т-клеток, таких как управление пролиферацией и эффекторными функциями Т-клеток, стимулирование иммунологической памяти и ингибирование индуцированной активацией гибели клеток. Агонистические антитела, нацеленные на CD137, продемонстрировали свою эффективность на моделях мышинной опухоли в качестве монотерапии (Melero. I. et al., *Nat. Med.*, 3(6):682-685 (1997)), однако антитела-агонисты, нацеленные на CD137 человека, еще не продемонстрировали достаточных ответов в качестве монотерапии или комбинированной терапии у пациентов-людей. В связи с этим ни утомилумаб (полностью человеческий агонист CD137 mAb IgG2) (Fisher TM et al., *Cancer Immunol. Immunother.* (2012), 61:1721-1733), ни урелумаб (гуманизированный агонист CD137 mAb IgG4) (Segal, N.H., *Clin. Cancer Res.* (2017), 23(8):1929-1936) не получили официальные разрешения для применения в качестве монотерапии или даже в качестве комбинированной терапии. На самом деле, ни одно агонистическое антитело, воздействующее на CD137 человека не было одобрено для терапевтического применения в организме человека.

Таким образом, существует потребность в дополнительных полностью человеческих антителах, которые являются агонистами рецептора CD137 человека и способствуют устойчивому противораковому иммунному ответу, но с приемлемыми профилями токсичности. Также сохраняется потребность в альтернативных агонистических антителах против CD137 человека, которые могут быть объединены с другими терапевтическими средствами для лечения рака. В частности, также сохраняется потребность в антителах против CD137 человека, которые проявляют достаточную активность в качестве монотерапии рака и/или комбинированной терапии.

Не ограничиваясь теорией, полагают, что применение современных агонистических антител, нацеленных на CD137, в качестве монотерапии рака и/или комбинированного агента затрудняется такими факторами, как агонистическая сила указанных антител и связанные с иммунитетом нежелательные явления, возникающие в результате их применения в более высоких, потенциально эффективных дозах. В частности, существующие антитела либо являются слишком сильными, что приводит к нежелательным явлениям, либо проявляют неоптимальную эффективность.

Агонистические антитела против CD137 человека, описанные в данном документе, являются полностью человеческими, Fc-у-рецептор-опосредуемыми не эффекторными антителами, которые связывают CD137 человека и CD137 яванского макака, стимулируют активацию Т-клетки *in vitro*, способствуют экспрессии на клеточной поверхности CD137 человека, усиливают активность NF-каппа В, ингибируют рост опухоли на мышинной модели опухоли немелкоклеточного рака легкого в качестве монотерапии, ингибируют опосредованную регуляторными Т-клетками супрессию *in vitro*, активируют экспрессию иммунных генов, увеличивают частоту внутриопухолевых CD3⁺ Т-клеток, конкурируют с лигандом CD137 человека за связывание с CD137 человека и связываются с уникальными аминокислотными остатками на CD137 человека.

Данное раскрытие обеспечивает антитело против CD137 человека (SEQ ID NO: 1), содержащее HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

Данное раскрытие обеспечивает антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. Данное раскрытие обеспечивает антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

Данное раскрытие обеспечивает антитело, содержащее тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. Данное раскрытие обеспечивает антитело, содержащее тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

Данное раскрытие обеспечивает клетку млекопитающего, способную экспрессировать антитело, содержащее HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2,

Данное изобретение относится к способу лечения рака, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1), содержащего HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом указанное антитело вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением. Данное изобретение относится к способу лечения рака, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела, содержащего варибельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и варибельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; при этом указанное антитело вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением. Данное изобретение относится к способу лечения рака, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела, содержащего варибельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и варибельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; при этом указанное антитело вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением. Данное изобретение относится к способу лечения рака, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела, содержащего тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; при этом указанное антитело вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением. Данное изобретение относится к способу лечения рака, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела, содержащего тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; при этом указанное антитело вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением.

- 4 -

Данное раскрытие обеспечивает применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для изготовления лекарственного средства для лечения рака, при этом указанное антитело содержит HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3 имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1 имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2 имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. Данное раскрытие обеспечивает применение антитела для изготовления лекарственного средства для лечения рака, при этом указанное антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и вариабельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. Данное раскрытие обеспечивает применение антитела для изготовления лекарственного средства для лечения рака, при этом указанное антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и вариабельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. Данное раскрытие обеспечивает применение антитела для изготовления лекарственного средства для лечения рака, при этом указанное антитело содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. Данное раскрытие обеспечивает применение антитела для изготовления лекарственного средства для лечения рака, при этом указанное антитело содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

- 8 -

Данное изобретение относится к антителу, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1), или к фармацевтической композиции, содержащей указанное антитело, при этом указанное антитело связывается с CD137 человека по меньшей мере через один из следующих аминокислотных остатков: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (включительно); необязательно при этом указанное антитело связывается по меньшей мере с двумя из остатков предпочтительно по меньшей мере с тремя из остатков, более предпочтительно по меньшей мере с четырьмя из остатков; более предпочтительно по меньшей мере пятью из остатков; более предпочтительно по меньшей мере с шестью из остатков; более предпочтительно по меньшей мере с семью из остатков; более предпочтительно по меньшей мере с восемью из остатков; более предпочтительно по меньшей мере с девятью из остатков; более предпочтительно по меньшей мере с десятью из остатков; более предпочтительно по меньшей мере с одиннадцатью из остатков; более предпочтительно по меньшей мере с двенадцатью из остатков; более предпочтительно по

ловека (SEQ ID NO: 1), или к фармацевтической композиции, содержащей указанное антитело, при этом указанное антитело связывается с CD137 человека по следующим аминокислотным остаткам: 55, 59, 63, 66, 72, 93- 103 (включительно) и 112-116 (включительно); при этом контакт определяется с помощью рентгеновской кристаллографии и при этом остатки в контакте находятся в пределах шести (6) ангстрем или менее от антитела; при этом рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желчных путей, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, мелкоклеточный рак легких, рак простаты, рак прямой кишки или рак щитовидной железы.

Данное изобретение относится к антителу, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения при лечении рака или для изготовления лекарственного средства для лечения рака, при этом указанное антитело связывается с CD137 человека по следующим аминокислотным остаткам: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (включительно) и 112-116 (включительно). Данное изобретение относится к антителу, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения при лечении рака или для изготовления лекарственного средства для лечения рака, при этом указанное антитело связывается с CD137 человека по следующим аминокислотным остаткам: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (включительно) и 112-116 (включительно); при этом контакт определяется с помощью рентгеновской кристаллографии и при этом остатки в контакте находятся в пределах шести (6) ангстрем или менее от антитела.

Данное изобретение относится к антителу, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения при лечении рака, или к применению антитела, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1), для изготовления лекарственного средства для лечения рака, при этом указанное антитело связывается с CD137 человека по следующим аминокислотным остаткам: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (включительно) и 112-116 (включительно); при этом рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желчных путей, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак простаты, рак прямой кишки или рак щитовидной железы. Данное изобретение относится к антителу, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения при лечении рака, или к применению антитела, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1), для изготовления лекарственного средства для лечения рака, при этом указанное антитело связывается с CD137 человека по следующим аминокислотным остаткам: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (включительно) и 112-116 (включительно); при этом контакт определяется с помощью рентгеновской кристаллографии и при этом остатки в контакте находятся в пределах шести (6) ангстрем или менее от антитела; при этом рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желчных путей, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак простаты, рак прямой кишки или рак щитовидной железы.

Данное изобретение относится к антителу, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1), или к фармацевтической композиции, содержащей указанное антитело, при этом указанное антитело не связывает FcγRI человека, FcγRIIa человека, FcγRIIb человека, FcγRIIIa(F) человека, FcγRIIIa(V) человека, или C1q человек. Данное изобретение относится к антителу, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения при лечении рака или для изготовления лекарственного средства для лечения рака, при этом указанное антитело не связывает FcγRI человека, FcγRIIa человека, FcγRIIb человека, FcγRIIIa(F) человека, FcγRIIIa(V) человека или C1q человека.

Данное изобретение относится к антителу, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1), или к фармацевтической композиции, содержащей указанное антитело, при этом указанное антитело не связывает FcγRI человека, FcγRIIa человека, FcγRIIb человека, FcγRIIIa(F) человека, FcγRIIIa(V) человека или C1q человека; при этом рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желчных путей, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, мелкоклеточный рак легких, рак простаты, рак прямой кишки или рак щитовидной железы. Данное изобретение относится к антителу, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения при лечении рака или для изготовления лекарственного средства для лечения рака, при этом указанное антитело не связывает FcγRI человека, FcγRIIa человека, FcγRIIb человека, FcγRIIIa(F) человека, FcγRIIIa(V) человека или C1q человека; при этом рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желчных путей, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, мелкоклеточный рак легких, рак простаты, рак прямой кишки или рак щитовидной железы.

Данное изобретение относится к антителу, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1), при этом указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь; при этом тяжелая цепь связывается по меньшей мере с одним аминокислотным остатком из следующих на CD137 человека: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (включительно) и 112-116 (включительно); при этом легкая цепь контактирует по меньшей мере с одним аминокислотным остатком из следующих на CD137 человека: 96-98 (включительно), 100 и 114-116 (включительно).

Данное изобретение относится к антителу, которое является агонистом CD137 человека

находятся в пределах шести (6) ангстрем или менее от антитела, как определено рентгеновской кристаллографией; при этом рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желчных путей, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак простаты, рак прямой кишки или рак щитовидной железы.

Данное изобретение относится к антителу, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1), при этом указанное антитело связывается по меньшей мере с одним из следующих аминокислотных остатков на CD137 человека: 97 и 115.

Данное изобретение относится к антителу, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1), при этом указанное антитело связывает по меньшей мере два аминокислотных остатка на CD137 человека: 97, 114 и 115.

Данное изобретение относится к антителу, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1), при этом указанное антитело связывается со следующими аминокислотными остатками на CD137 человека: 97, 114 и 115.

Данное изобретение относится к антителу, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1), при этом указанное антитело связывает по меньшей мере один из следующих аминокислотных остатков на CD137 человека: 97 и 115; при этом связывание определяют с применением мутантного белка CD137 человека, имеющего мутацию в одном или нескольких из следующих аминокислотных остатков: 97, 114 и 115.

Данное изобретение относится к антителу, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1), при этом указанное антитело связывается по меньшей мере с двумя из следующих аминокислотных остатков на CD137 человека: 97, 114 и 115; при этом связывание определяют с применением мутантного белка CD137 человека, имеющего мутацию в одном или нескольких из следующих аминокислотных остатков: 97, 114 и 115.

Данное изобретение относится к антителу, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения при лечении рака, при этом указанное антитело связывается со следующими аминокислотными остатками на CD137 человека: 97, 114 и 115; при этом связывание определяют с применением мутантного белка CD137 человека, имеющего мутацию в одном или нескольких из следующих аминокислотных остатков: 97, 114 и 115.

Данное раскрытие обеспечивает применение антитела, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1), для изготовления лекарственного средства для лечения рака, при этом указанное антитело связывается со следующими аминокислотными остатками на CD137 человека: 97, 114 и 115; при этом связывание определяют с применением мутантного белка CD137 человека, имеющего мутацию в одном или нескольких из следующих аминокислотных остатков: 97, 114 и 115.

Данное изобретение относится к антителу, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения при лечении рака, при этом указанное антитело связывается со следующими аминокислотными остатками на CD137 человека: 97, 114 и 115; при этом связывание определяют с применением мутантного белка CD137 человека, имеющего мутацию в одном или нескольких из следующих аминокислотных остатков: 97, 114 и 115; при этом рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желчных путей, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак простаты, рак прямой кишки или рак щитовидной железы.

Данное раскрытие обеспечивает применение антитела, которое является агонистом CD137 человека (SEQ ID NO: 1), для изготовления лекарственного средства для лечения рака, при этом указанное антитело связывается со следующими аминокислотными остатками на CD137 человека: 97, 114 и 115; при этом связывание определяют с применением мутантного белка CD137 человека, имеющего мутацию в одном или нескольких из следующих аминокислотных остатков: 97, 114 и 115; при этом рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желчных путей, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак простаты, рак прямой кишки или рак щитовидной железы.

Данное изобретение относится к полностью человеческому агонистическому антителу к CD137, содержащему два или более из следующих признаков:

- (a) антитело конкурирует с CD137 человека-лигандом за связывание с CD137 человека;
- (b) антитело не связывает FcγRI человека, FcγRIIa человека, FcγRIIb человека, FcγRIIIa(F) человека, FcγRIIIa(V) человека или C1q человека;
- (c) антитело связывается с CD137 яванского макака;
- (d) антитело ингибирует рост немелкоклеточной опухоли легких человека в качестве монотерапии; и
- (e) антитело увеличивает частоту внутриопухолевых CD3⁺ T-клеток.

Не ограничивающие примеры полезных химиотерапевтических агентов включают 5-фторурацил, гидроксимочевину, гемцитабин, метотрексат, доксорубин, этопозид, карбоплатин, цисплатин, циклофосфамид, мелфалан, дакарбазин, таксол, камптотецин, FOLFIRI, FOLFOX, доцетаксел, даунорубин, паклитаксел, оксалиплатин и их комбинации.

Термин "антитело", используемый в данном описании, относится к полипептидному комплексу, имеющему две тяжелых цепи (HC) и две легких цепи (LC) таким образом, что тяжелые цепи и легкие цепи соединены между собой дисульфидными связями; при этом указанное антитело является антителом подкласса IgG.

Антитело согласно данному изобретению представляет собой сконструированный, не встречающийся в природе полипептидный комплекс. Молекула ДНК согласно данному изобретению представляет собой не встречающуюся в природе молекулу ДНК, которая содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность одного из полипептидов в антителе согласно данному изобретению.

Антитело по данному изобретению представляет собой антитело типа IgG и имеет "тяжелые" цепи и "легкие" цепи, которые перекрестно сшиты внутри- и межцепочечными дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из N-концевой HCVR и константного участка тяжелой цепи ("HCCR - heavy chain constant region"). Каждая легкая цепь состоит из LCVR и константного участка легкой цепи ("LCCR - light chain constant region"). При экспрессии в определенных биологических системах антитела, имеющие Fc-последовательности, гликозилированы в Fc-участке. Как правило, гликозилирование происходит в Fc-участке антитела в высококонсервативном сайте N-гликозилирования. N-гликаны, как правило, присоединяются к аспарагину. Антитела могут быть гликозилированы и в других позициях.

Необязательно антитела против CD137 человека, описанные в данном документе, содержат Fc-часть, которая происходит от IgG1 человека. Хорошо известно, что IgG1 связываются с белками семейства Fc-гамма-рецепторов (FcγR), а также C1q. Взаимодействие с этими рецепторами может индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ). Следовательно, обязательно антитела против CD137 человека, описанные в данном документе, являются полностью человеческим моноклональным антителом, лишенным эффекторной функции Fc (IgG1, Fc-нуль). Для достижения Fc-нуль антитела IgG1 необходим селективный мутагенез остатков в области CH2 его Fc-участка IgG1. Аминокислотные замены L234A, L235E и G237A вводятся в IgG1 Fc для уменьшения связывания с FcγRI, FcγRIIa и FcγRIII, а замены A330S и P331S вводятся для уменьшения C1q-опосредованной фиксации комплемента. Чтобы снизить потенциальную индукцию иммунного ответа при введении человеку, некоторые аминокислоты могут требовать обратных мутаций для соответствия последовательностям антител зародышевой линии.

Участки HCVR и LCVR могут быть далее подразделены на участки гипервариабельности, называемые участками, определяющими комплементарность ("CDR"), перемежающимися с участками, которые являются более консервативными, называемыми каркасными участками ("FR"). Каждый LCVR и HCVR состоит из 3 CDR и 4 FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Здесь три CDR тяжелой цепи обозначены как "HCDR1, HCDR2 и HCDR3", а три CDR легкой цепи обозначены как "LCDR1, LCDR2 и LCDR3". CDR содержат большинство остатков, которые образуют специфические взаимодействия с антигеном. Для целей данного изобретения используются определения North CDR. Определение North CDR (North et al., "A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations", Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011)) основано на кластеризации распространения родства с большим количеством кристаллических структур.

Выделенную ДНК, кодирующую участок HCVR, можно преобразовать в полноразмерный ген тяжелой цепи путем функционального связывания кодирующей HCVR ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константные участки тяжелой цепи. Последовательности генов константные участки тяжелой цепи человека, а также других млекопитающих известны в данной области техники. Фрагменты ДНК, охватывающие эти участки, можно получать, например, с помощью стандартной ПЦР-амплификации.

Выделенную ДНК, кодирующую участок LCVR, можно преобразовать в полноразмерный ген легкой цепи путем функционального связывания кодирующей LCVR ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константный участок легкой цепи. Последовательности генов константные участки легкой цепи человека, а также других млекопитающих известны в данной области техники. Фрагменты ДНК, охватывающие эти участки, можно получать с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константный участок легкой цепи может представлять собой константный участок каппа или лямбда. Предпочтительно для антител по данному изобретению константный участок легкой цепи представляет собой константный участок каппа.

Полинуклеотиды по данному изобретению экспрессируются в клетке-хозяине после функционального соединения указанных последовательностей с последовательностью контроля экспрессии. Экспрессионные векторы, как правило, пригодны для репликации в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде неотъемлемой части хромосомной ДНК хозяина. Обычно экспрессионные векторы содержат селективные маркеры, например, тетрациклина, неомицина и дигидрофолатредуктазы, чтобы обеспечить возможность обнаружения тех клеток, которые трансформированы необходимыми последовательностями ДНК.

Антитело согласно данному изобретению легко можно получать в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO, NSO, HEK293 или COS. Клетки-хозяев культивируют, применяя методики, хорошо из-

вестные в данной области техники.

Векторы, содержащие представляющие интерес полинуклеотидные последовательности (например, полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антитела, и последовательности контроля экспрессии), могут быть перенесены в клетку-хозяин хорошо известными способами, которые изменяются в зависимости от типа клетки-хозяина.

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

В другом варианте реализации данного изобретения антитело или кодирующие его нуклеиновые кислоты предоставлены в выделенной форме. В контексте данного документа термин "выделенный" относится к белку, пептиду или нуклеиновой кислоте, которые не содержат или по существу не содержат любые другие макромолекулярные компоненты, обнаруживаемые в клеточной среде. В контексте данного документа термин "по существу не содержат" означает, что представляющие интерес белок, пептид или нуклеиновая кислота содержат более 80% (в мольном отношении) макромолекулярных компонентов, предпочтительно более 90% и более предпочтительно более 95%.

Антитело согласно данному изобретению или содержащие его фармацевтические композиции, можно вводить парентеральными путями (например, подкожным и внутривенным). Антитело согласно данному изобретению можно вводить пациенту отдельно с фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или наполнителями в однократной или многократных дозах. Фармацевтические композиции согласно данному изобретению можно получать способами, хорошо известными в данной области техники (например, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 22nd ed. (2012), A. Loyd et al., Pharmaceutical Press), и они содержат антитело, описанное в данном документе, и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или наполнителей.

Режимы дозирования могут быть скорректированы для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического эффекта). Дозы лечения могут быть подобраны для оптимизации безопасности и эффективности. Графики дозирования, для внутривенного (в/в) или не внутривенного введения, локализованного или системного или их комбинаций, обычно будут варьироваться от однократной болюсной дозы или непрерывной инфузии до нескольких введений в день (например, каждые 4-6 ч) или как указано лечащим врачом и состоянием пациента. Количество и частота дозирования могут быть определены врачами, которые лечат пациента.

Термин "лечение" (или "лечить", или "процесс лечения") относится к замедлению, прерыванию, приостановке, облегчению, прекращению, уменьшению или обращению вспять прогрессирования или тяжести существующего симптома, нарушения, патологического состояния или заболевания.

"Эффективное количество" означает количество антитела согласно данному изобретению или фармацевтической композиции, содержащей указанное антитело согласно данному изобретению, которое вызывает биологический или клинический ответ или необходимый терапевтический эффект в ткани, системе, организме животного, млекопитающего или человека, который предполагается исследователем, врачом или другим медицинским работником. Эффективное количество антитела может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса индивида, а также от способности антитела вызывать необходимый ответ у индивида. Эффективное количество также является таким, при котором любой токсический или вредный эффект антитела перевешивается терапевтически благоприятными эффектами.

Характеристизация антител, генерация, экспрессия и очистка.

Продукция антител с применением полинуклеотидной последовательности тяжелой цепи, продемонстрированной в SEQ ID NO: 14, и полинуклеотидной последовательности легкой цепи, продемонстрированной в SEQ ID NO: 17, в клетках млекопитающих приводит к получению двух видов, связанных с продуктом антитела:

(a) полноразмерное антитело (далее называемое "антитело A1"), имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, продемонстрированную в SEQ ID NO: 10, и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 11; и

(b) укороченную на одну аминокислоту форму антитела (в дальнейшем называемую "антитело A2"), полученную в результате отсечения n-концевого аланина легкой цепи, при этом указанное антитело A2 имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи, продемонстрированную в SEQ ID NO: 10 и аминокислотную последовательность легкой цепи, показанная в SEQ ID NO: 13.

Используемый в данном документе термин "антитело A1/2" относится к продукту антитела, полученному в результате использования полинуклеотидной последовательности легкой цепи, продемонстрированной в SEQ ID NO: 17, и включает комбинацию антитела A1 (~6%) и антитела A2 (~94%). Антитело A1 может быть синтезировано без значительных количеств антитела A2 с применением полинуклеотидной последовательности тяжелой цепи, продемонстрированной в SEQ ID NO: 14, и полинуклеотидной последовательности легкой цепи, продемонстрированной в SEQ ID NO: 15. Антитело A2 можно синтезировать без значительных количеств антитела A1 с применением полинуклеотидной последовательности тяжелой цепи, продемонстрированной в SEQ ID NO: 14, и полинуклеотидной последователь-

ности легкой цепи, продемонстрированной в SEQ ID NO: 16.

Антитела по данному изобретению могут быть получены с применением известных способов, включая, но не ограничиваясь этим, фаговый дисплей. Кроме того, антитела, полученные как описано выше, могут быть дополнительно подвергнуты скринингу с применением анализов, описанных в данном документе.

Полипептиды вариабельных участков тяжелой цепи и легкой цепи, полные аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи антитела А, антитела В и антитела С и кодирующие их нуклеотидные последовательности, перечислены ниже в разделе, озаглавленном "Аминокислотные и нуклеотидные последовательности". Кроме того, SEQ ID NO для легкой цепи, тяжелой цепи, вариабельного участка легкой цепи и вариабельного участка тяжелой цепи антитела А, В и С приведены в табл. 2.

Таблица 1

Соответствующий SEQ ID (аминокислота)	Антитело A1	Антитело A2
HCDR1	2	2
HCDR2	3	3
HCDR3	4	4
LCDR1	5	5
LCDR2	6	6
LCDR3	7	7
HCVR	8	8
LCVR	9	12
Тяжелая цепь	10	10
Легкая цепь	11	13

Таблица 2

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

Антитела согласно данному изобретению, включая, но не ограничиваясь антителами A1, A2 и A1/2, могут быть получены и очищены в целом следующим образом. Соответствующую клетку-хозяина, такую как HEK293 или CHO, можно временно или стабильно трансфицировать экспрессионной системой для секреции антител, используя оптимального предварительно определенное отношение векторов HC:LC (например, 1:3 или 1:2) или одну векторную систему кодирующую как HC, так и LC. Осветленную среду, в которую происходила секреция антитела, можно очищать, используя любой из многих обычно применяемых способов. Например, в случае фрагмента Fab среду удобно наносить на колонку MabSelect (GE Healthcare) или колонку KappaSelect (GE Healthcare), уравновешенную совместимым буфером, таким как фосфатно-солевой буферный раствор (pH 7,4). Колонка может быть промыта для удаления неспецифических связывающих компонентов. Связанное антитело может быть элюировано, например, градиентом pH (например, 20 mM Трис-буфера pH 7 к 10 mM цитратного натриевого буфера pH 3,0, или фосфатно-солевым буфером pH 7,4 к 100 mM глицинового буфера, до pH 3,0). Обнаружение фракций антител можно проводить, например, с помощью ДСН-ПААГ электрофореза, а затем проводить их объединение. Дальнейшая очистка является необязательной, в зависимости от предполагаемого применения. Антитело может быть сконцентрировано и/или стерильно отфильтровано, с применением обычных методик. Растворимые агрегаты и мультимеры могут быть эффективно удалены обычными способами, включая эксклюзионную, с гидрофобным взаимодействием, ионообменную, мультимодальную или гидроксиапатитную хроматографию. Продукт может быть незамедлительно заморожен при -70°C или может быть лиофилизирован.

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

Антитело A1/2 связывается с CD137 человека.

Способность антител, раскрытых в данном документе, связывать CD137 человека может быть измерена с помощью ИФА. Для измерения связывания с CD137 человека 96-луночный планшет (Nunc) покрывают CD137 человека-Fc (R & D Systems) в течение ночи при 4°C. Лунки блокируют в течение 2 ч с

помощью блокирующего буфера (PBS, содержащего 0,2% бычьего сывороточного альбумина и 0,05% Tween-20). Лунки могут быть трижды промыты PBS, содержащим 0,05% Твин-20. Антитело A1/2 или контрольный IgG (100 мкл) затем добавляют в различных концентрациях и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч. После мытья планшет инкубируют с 100 микролитрами козьего анти-человеческого IgG F(ab')₂-HRP конъюгата (Jackson Immuno Research Laboratories) при комнатной температуре в течение 45 мин. Планшеты промывают и затем инкубируют с 100 мкл 3,3',5,5'-тетраметилбензида. Поглощение при 650 нм измеряют на считывающем устройстве для микропланшетов SpectraMax®. Полумаксимальная эффективная концентрация (EC₅₀) может быть рассчитана с применением программного обеспечения GraphPad prism 7.

В экспериментах, проводимых по существу так же, как описано выше, антитело A1/2 связывает CD137 человека с EC₅₀ 0,027 нМ.

Антитело A1/2 связывается с CD137 яванского макака.

Способность антител, описанных в данном документе, связываться с клеточной поверхностью CD137 яванского макака может быть измерена с применением проточной цитометрии. Стабильные клетки, экспрессирующие CD137 яванского макака, получают трансфекцией плазмидной ДНК рецептора Супо-CD137 в клетки человека 293 (ATCC) с применением реагента Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™) в соответствии с протоколом производителя. Стабильные клетки отбирают с применением 0,5 мкг/мл пурамицина в модифицированной по Дульбекко среде Игла, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% GlutaMAX™. Для проточной цитометрии слипшиеся прилипшие клетки отделяют с помощью буфера диссоциации клеток Gibco® (Life Technologies), блокируют в буфере FACS (забуференном фосфатом физиологическом растворе, содержащем 3% эмбриональной бычьей сыворотки) в течение 1 ч при 4°C, а затем переносят в 96-луночную круглодонную плашку при плотности 1×10⁵ клеток/лунка. Добавляют антитело A1/2, BMS20H4.9, PF83 или контрольный IgG1 человека (разведенный в буфере FACS 1:4, начиная с 0,5 мкг/мл) (100 мкл), и клетки окрашивают в течение 1 ч при 4°C.

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

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

Связывание антитела A1/2 на клетках человека увеличивает экспрессию CD137.

Способность антител, раскрытых в данном документе, модулировать уровни клеточной поверхности CD137 человека может быть определена следующим образом. Стабильные клетки, экспрессирующие CD137 человека, получают трансфекцией плазмидной ДНК CD137 человека в клетки 293 человека (ATCC) с применением реагента Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™) в соответствии с протоколом производителя. Стабильные клетки отбирают с применением 0,5 мкг/мл пурамицина в модифицированной по Дульбекко среде Игла, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% GlutaMAX™. Антитела к CD137, начиная с 300 наномолярных сред, инкубируют с клетками при 37°C в течение 24 ч. Клетки промывают PBS, отделяют с применением буфера диссоциации клеток Gibco® и окрашивают теми же антителами к CD137 в холодном буфере (1× PBS, 1% BSA, 0,09% азида натрия) в течение 2 ч. После отмывки клетки окрашивают козьим анти-человеческим IgG-антителом, конъюгированным с Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories), в течение 30 мин. Клетки промывают и дифференциально помечают Zombie Green Live/Dead (BioLegend) в соответствии с протоколом производителя. Все клетки обрабатывались на Fortessa X-20. Анализ выполняется с помощью программного обеспечения FlowJo® для генерирования средней интенсивности флуоресценции (СИФ) Alexa Fluor 647 и калибруется по стандартной кривой кривой Alexa Fluor 647 эквивалентного растворимого флуорохрома (MESF) (Bangs Laboratories). Значения MESF нормированы на необработанные окрашенные контроли (100%) и необработанные окрашенные изотипом контроли (0%).

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

Анализ репортера люциферазы NF-каппа-B активности антитела A1/2.

Способность антител, раскрытых в данном документе, активировать NF-каппа-B может быть измерена следующим образом. Двойной стабильный репортер люциферазы NF-kappaB/CD137-293 человека получают трансфекцией плазмидной ДНК pGL4.32 [luc2P/NF-kappaB-RE/Hygro] (Promega) в клетки, экс-

прессирующие CD137 человека, с применением реагента Lipofectamine™ 2000 (Life Технологии) по протоколу производителя. Стабильные клетки отбирают с применением 100 мкг/мл гиромидина и 0,5 мкг/мл пуромидина в модифицированной по Дульбекко среде Игла, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% GlutaMAX™. Клетки высевает в 384-луночный планшет при плотности 5×10^3 клеток/луночку, используя дозатор реагентов Thermo MultiDrop Combi (Thermo Fisher Scientific), и культивируют в течение ночи при 37°C. Антитело A1/2, BMS20H4.9, PF83 или контрольный IgG1 человека разводят в фосфатно-солевом буфере (PBS) с применением Hamilton STAR™ (Hamilton Company) в 10-точечных 2-кратных разведениях внутри планшета, начиная с 9 микромоляр или 1,33 микромоляр и перенесен на клетки. Затем клетки инкубируют с антителами в течение 5,5 ч при 37°C в 5% CO₂ и затем обрабатывают, используя систему анализа люциферазы ONE-Glo™ (Promega™) и комбинированный дозатор реагентов Thermo™ Scientific MultiDrop™ Combi. Люминесценцию измеряют с применением устройства для считывания микропланшетов SpectraMax® (Molecular Devices), а анализ данных проводят с применением Genedata Screener® (Genedata). Данные нормализуются следующим образом:

$$\% \text{ Активности} = \frac{(\text{Значение лунки} - \text{Медиана минимального контроля})}{(\text{Медиана максимального контроля} - \text{Медиана минимального контроля})} \times 100\%$$

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

Антитело A1/2 стимулирует выработку Т-клеточного интерферона-гамма. Способность антител, раскрытых в данном документе, стимулировать выработку интерферона-гамма (ИФН-γ), происходящую из Т-клеток, можно измерить следующим образом. Мононуклеарные клетки периферической крови человека (МКПК) выделяют из цельной крови или лейкопака центрифугированием в градиенте плотности фикола (Ficoll® Paque PLUS; GE Healthcare) и выращивают в среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Life Technologies) с 10% фетальной сывороткой теленка (HyClone). Клон анти-человеческого CD3-антитела HIT3a (BD Biosciences) в PBS наносят на 96-луночный планшет (типичный диапазон: от 2 до 15 нанограмм/луночку) и инкубируют в течение ночи при 4°C. После аспирации лунки промывают PBS, и МКПК человека переносят на 96-луночный планшет с плотностью $1,5 \times 10^5$ клеток/луночку. Антитело A1/2, BMS20H4.9, PF83 или контрольный IgG1 человека готовят путем разведения 1:4 в RPMI, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, с начальной концентрацией 80 мкг/мл. Клон CD28.2 антитела против человеческого CD28.2 (BioLegend) добавляют в планшет (типичный диапазон от 0,2 до 2 мкг/мл) с последующим тестированием антителом и инкубируют в течение 96 ч при 37°C в увлажненном инкубаторе с 5% CO₂. Супернатанты собирают и уровни ИФН-γ человека измеряют с применением набора ИФА для ИФН-гамма человека R&D Systems®. Вкратце, антитело для захвата ИФН-γ наносят на планшет (4 мкг/мл) в течение ночи при комнатной температуре. После аспирации и промывания пластина блокируется на 1 ч при комнатной температуре. Образец надосадочной жидкости и стандарт ИФН-γ добавляют и инкубируют в течение 2 ч при комнатной температуре. После промывки добавляли 100 мкл антител, детектирующих ИФН-γ, инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре и промывали. Стрептавидин-HRP (100 мкл разведения 1:40) добавляют в течение 20 мин при комнатной температуре. После промывки планшеты получают путем добавления 100 мкл раствора субстрата в течение 20 мин с последующим добавлением 50 мкл стоп-раствора, и сигнал измеряют при 450 нм с помощью считывающего устройства для микропланшетов SpectraMax®. Анализ данных выполняется с применением программного обеспечения SoftMax Pro и GraphPad Prism (GraphPad Software). Кратность ингибирования рассчитывают как среднее значение ИФН-γ (пг/мл)/контрольное среднее значение ИФН-γ (пг/мл).

В экспериментах, проводимых по существу так же, как описано выше, антитело A1/2 усиливает субоптимальную активацию МКПК человека путем коstimуляции CD3/CD28, измеренную по продукции ИФН-γ-цитокинов. В связи с этим обработка антителом A1/2 при 5 мкг/мл приводит к увеличению продукции ИФН-γ в 3,8 раза, что выше, чем PF83 (в 1,6 раза), и ниже, чем BMS20H4.9 (увеличение в 9,4 раза).

Анализ твердофазного связывания антитела A1/2.

Связывание антитела A1/2 с C1q человека может быть измерено с применением анализа ИФА. Антитело A1/2 и контрольные антитела (отрицательный контрольный IgG1) серийно разводят в PBS и наносят на планшет для ИФА в течение ночи при 4°C. Человеческий C1q в казеиновом буфере добавляют в концентрации 10 мкг/мл и инкубируют в течение 2 ч. Человеческий C1q детектируют путем инкубации планшетов с C1q-HRP человека (AbD Serotec Inc., разведение 1:200) в течение 1 ч, и планшет визуализируют с применением TMB (KPL, Inc.). Поглощение измеряют при 450 нм с помощью гибридного много-режимного считывателя Synergy Neo2 (BioTek®).

Связывание антитела A1/2 с FcγRI, FcγRIIa(H), FcγRIIb, FcγRIIIa(F) и FcγRIIIa(V) определяют с применением анализа MSD (Meso Scale Diagnostics). Вкратце, рецепторы Fcγ наносят на чашку с Meso Scale в течение ночи, и серийно разведенные тестируемые антитела добавляют в планшет и инкубируют в течение 2 ч. Антитело A1/2 детектируют с применением вторичного антитела против антител человека

(Meso Scale Diagnostics, D20TF-6), и планшет визуализируют с помощью Read Buffer T (Meso Scale Diagnostics, R92TC-1). Люминесценцию измеряют с помощью SECTOR Imager 2400 (Meso Scale Diagnostics), а данные анализируют с применением программного обеспечения GraphPad Prism 7.0.

Таблица 3

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

* Обозначает максимальную концентрацию тестируемого антитела.

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

Противоопухолевая эффективность антитела A1/2 в модели развитой опухоли Линия опухолевых клеток немелкоклеточного рака легкого человека (ATCC) HCC827 поддерживается в соответствующих средах и собирается для имплантации. Опухолевые клетки (1×10^7 клеток на мышь) вводят подкожно в правый бок самкам мышей NOD/SCID Gamma (NSG) в возрасте 7 недель (Jackson Laboratories). Когда опухоли достигают размера приблизительно от 350 мм³ до 450 мм³, мышей рандомизируют в группы от 5 до 8. Размноженные Т-клетки человека генерируют путем стимуляции наивных МКЖ человека гранулами CD3/CD28 для размножения Т-клеток человека Dynabeads® (Thermo Fisher Scientific) в течение 9-10 дней и сохраняют в клеточном банке. МКЖ человека (NY Blood Center) готовят центрифугированием на Ficoll® Paque PLUS в пробирках SepMate (STEMCELL Technologies) и сохраняют в клеточном банке. Размноженные Т-клетки оттаивают и 1×10^6 клеток вводят мышам. В качестве контроля только опухолевые клетки имплантируют без Т-клеток или МКЖ в некоторых мышей. Лечение начинается в день 0 или день 1. Группы лечения включают контрольный IgG, BMS20H4.9, PF83 и антитело A1/2. Животным вводят внутривенную инъекцию 10 мг/кг антитела один раз в неделю в течение 4 недель. Вес тела (ВТ) регистрируется два раза в неделю, а процентное изменение ВТ рассчитывается по формуле

$$(\text{ВТ в день наблюдения} - \text{ВТ в первый день}) / \text{ВТ в первый день} \times 100\%$$

Объемы опухолей измеряются два раза в неделю с применением электронных штангенциркулей. Объем опухоли рассчитывают по формуле

$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = \pi/6 \times \text{длина} \times \text{ширина}^2$$

% Т/С рассчитывается по формуле

$$100 \times \Delta T / \Delta C,$$

если $\Delta T > 0$ средних геометрических значений.

ΔT = средний объем опухоли в группе, получавшей лекарственное средство, в день наблюдения исследования - средний объем опухоли в группе, получавшей лекарственное средство, в начальный день введения дозы;

ΔC = средний объем опухоли контрольной группы в день наблюдения исследования - средний объем опухоли контрольной группы в начальный день дозирования.

Статистический анализ данных об объеме опухоли выполняется путем двустороннего повторного анализа дисперсии по времени и обработке с применением процедур MFXED в программном обеспечении SAS (версия 9.2).

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

Результаты кинетики/аффинности для антитела A1, антитела A2 и антитела A1/2.

Прибор Biacore T200 можно использовать для измерения кинетики связывания иммобилизованного

CD137-Fc человека с антителом A1, антителом A2 и антителом A1/2. Рекombинантный внеклеточный белок CD137-Fc человека (R&D Systems) ковалентно иммобилизован на сенсорном чипе CM5 посредством аминной связи (GE Healthcare). Тестирование на антитела к CD137 проводят при скорости потока 30 мкл/мин в буфере HBS-EP⁺. Образцы вводят при различных концентрациях, а измерения получают при 25°C. Поверхность регенерируют после каждого введения пробы 10 миллимолярным глицином-HCl pH 2.0 при скорости потока 30 мкл/мин в течение 24 с, а затем стабилизируют буфером в течение 10 с. Сенсограммы концентраций в диапазоне от 0,123 наномолярных до 30 наномолярных были оценены с применением программного обеспечения Biacore T200. Расчет констант скорости ассоциации (K_a) и диссоциации (K_d) основан на соответствии модели связывания Ленгмюра 1:1. Равновесную константу диссоциации (K_d) или константу аффинности связывания рассчитывали из соотношения кинетических констант скорости $K_{\text{дисс.}}/K_{\text{асс.}}$.

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

Таблица 4

Антитело	K_{on} (1/Мс)	K_{off} (1/с)	K_D (М)	R_{max}	χ^2
Антитело A2	1.33E+06	7.13E-03	5.36E-09	23,10	0,247
Антитело A1	1.61E+06	5.36E-03	3.33E-09	22,76	0,355
Антитело A1/2	1.52E+06	7.11E-03	4.67E-09	20,86	0,303

Анализ на репортер люциферазы NF-каппа-B, сравнивающий антитело A1, антитело A2 и антитело A1/2.

Способность антител, раскрытых в данном документе, активировать NF-каппа-B можно измерить, как описано ранее в данном документе, с той модификацией, что разведения антител готовят в PBS и 10-точечные 2-кратные разведения проводят в планшете, начиная с 9 микромоля.

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

Антитело A1 и антитело A2 способствуют образованию интерферона-гамма, происходящего из Т-клеток.

Способность антител, раскрытых в данном документе, стимулировать выработку интерферона-гамма (ИФН- γ), происходящего из Т-клеток, можно измерить, как описано ранее в данном документе. В экспериментах, проводимых, по существу, как описано в данном документе, антитело A1, антитело A2 и антитело A1/2 усиливают неоптимальная активация МКПК человека с помощью костимуляции CD3/CD28, измеренная по продукции цитокина ИФН- γ . В связи с этим обработка антителом A1/2 при 5 мкг/мл приводит к увеличению выработки ИФН- γ в 3,1 раза, что сопоставимо с антителом A1 (увеличение в 3,5 раза) и антителом A2 (увеличение в 3,5 раза).

Противоопухолевая эффективность антитела A1 и антитела A2 в модели развитой опухоли.

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

В экспериментах, проведенных, как описано выше, антитело A1, антитело A2 и антитело A1/2 ингибируют рост опухоли в HCC827 модели развитой опухоли. Лечение антителом A1/2 (T/C%=47,1%; $P<0,001$) показывает такое же снижение роста опухоли, как и антитело A1 (T/C%=56,0%; $P<0,001$) и антитело A2 (T/C%=48,7%; $P<0,001$).

Эпитоп антитела A1, определенный с помощью рентгеновской кристаллографии A1-Fab антитела очищают от супернатанта клеток 293HEK, используя аффинную матрицу CaptureSelect IgG-CH1 объемом 12 мл. SDS-PAGE и аналитическая эксклюзионная хроматография (SEC) используются для определения чистоты и качества очищенного антитела A1-Fab. Элюированный материал этой матрицы заменяют буфером на 1× трис-буферный солевой раствор (TBS). hCD137* (* (аминокислоты CD137 человека 22-161, Δ C121S) -AAA-6His) очищают от супернатанта 293HEK в три этапа, в которых используются колонки Ni Sepharose® Excel, колонки Ni-NTA и колонки SEC. Вкратце, два литра супернатанта загружают непосредственно без замены буфера в колонку с Ni-сефарозой Excel. Элюант этой стадии заменяют буфером на PBS и дополнительно очищают, используя колонку с гравитационным потоком Ni-NTA. Элюант этой стадии дополнительно очищают и заменяют буфер на 1× TBS с применением подготовительной колонки SEC. Поток от первого шага Ni-сефарозы Excel содержит значительное количество hCD137*. Затем он загружается в колонку с Ni-сефарозой Excel, за которой следуют колонки с Ni-NTA и подготовительными SEC. SDS-PAGE используется для объединения фракций hCD137* в зависимости от их чистоты. Концентрация hCD137* составляет 14,5 мг/мл, а концентрация антитела A1-Fab составляет 7,5 мг/мл.

Комплексы антитело A1-Fab: CD137* объединяют в молярном соотношении 1:1 и затем подвергают гель-фильтрации на колонке, предварительно уравновешенной в 20 миллимолярном Трис, pH 8,0,

100-миллимолярном хлориде натрия. Полученный комплекс концентрируют до 12,5 мг/мл. После фильтрации комплекс антитела A1-Fab: CD137 устанавливают в соотношении 1:1 в условиях скрининга с разрезанными матричными кристаллами в планшетах с фиксированной каплей (sitting drop plate) с применением жидкого манипулятора Phoenix при температуре 21 и 8°C. Крупные призматические кристаллы растут в одном состоянии в течение 4 дней в 1-молярном тринатриевом цитрате, pH 6,5 при 21°C. Кристаллы собирают и криоконсервируют в 20% глицерине и в резервуарах, устанавливают и мгновенно замораживают в жидком азоте, затем с применением Advanced Photo Source, Argonne National Laboratory, образцы подвергают рентгеновскому скринингу и собирают данные. Данные антитела A1-Fab/hCD137* обрабатываются до 2,4 Å с применением набора программ (HYPERLINK "29768960_2020-01-30_10-53-37-731.doc" \1 "_ENREF_2" \o "Collaborative Computational Project, 1994 #144" Winn, M.D. et al., Acta. Cryst., 2011:D67, 235-242). Кристалл принадлежит пространственной группе P3₁21 с параметрами ячейки a=b=124,9 Å, b=112,7 Å, α=β=90° и γ=120°. Структура определяется методом молекулярной замены с помощью программы Phaser (HYPERLINK "29768960_2020-01-30_10-53-37-731.doc" \1 "_ENREF_4" \o "McCoy, 2007, #288", McCoy, A.J. et al., J. Appl. Cryst., 2007, 40:658-674) с применением внутренней структуры Fab в качестве модели поиска. Решение молекулярного замещения для Fab уточняется с помощью Refmac HYPERLINK "29768960_2020-01-30_10-53-37-731.doc" \1 "_ENREF_2" \o "Collaborative Computational Project, 1994, #144" (Winn, M.D. et al., Acta. Cryst., 2011:D67, 235-242; Murshudov, G.N., Act. Cryst., 2011:D67, 355-367) and Buster (HYPERLINK "29768960_2020-01-30_10-53-37-731.doc" \1 "_ENREF_1" \o "Bricogne, 2011, #146, "Bricogne, G. et al., 2016, Buster Version 2.11.6. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.). Карты из уточнения используются для ручной сборки модели для CD137 с помощью программы COOT (HYPERLINK "29768960_2020-01-30_10-53-37-731.doc" \1 "_ENREF_3" \o "Emsley, 2010, #142, "Emsley, P., Acta Cryst., 2010:D66, 486-501). Уточненные R-факторы составляют R=17,8%, Rfree=20,5%.

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

Таблица 5

CD137 человека (Эпитопы)	Антитело A1 Тяжелая цепь (Паратоп)	Антитело A1 Легкая цепь (Паратоп)
S55	Q62	--
Q59	Q62	--
D63	Q62	--
R66	F55	--
F72	F55	--
H93	T103	--
C94	T102, T103, A104, P105	--
L95	M101, T102, T103, P105, G106, T107	--
G96	L100, M101, T102, T103, P105, G106, T107	G92, N93
A97	M101, T102, P105, G106, T107	G92, N93, S94, F95, L97
G98	P105	G92, N93, S94, F95
C99	P105	--
S100	I52, F55, N59, M101, P105, T107	F95
M101	S31, I52, I54, F55, M101	--
C102	F55	--
E103	T103	--
L112	T103	--
T113	T103	--
K114	M101, T102, T103, A104	D51 (D54)
K115	L100, M101, T102, T103, D110	F50, E56, T57
G116	M101, T102, T103	F50

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

Способность антител, раскрытых в данном документе, блокировать взаимодействия CD137-лиганд человека (далее CD137L) человека можно измерить с помощью анализа ИФА. Во-первых, анализ ИФА, используется для количественного определения связывания EC₅₀ hCD137** (CD137 человека аминокислоты 22-164, ΔC121S) -AAA-FLAG до hCD137L* и антитела A1/2, BMS20H4.9 и PF83. Лунки 96-луночного планшета ИФА Immulon® 4HBX покрывают в течение ночи 50 нанограммами hCD137** в 100 мкл PBS, pH 7,2 с легким перемешиванием при 4°C. После блокирования 5% BSA в PBST и промывки, серия пятикратного разведения (392-0,005 наномоль) His-меченного рекомбинантного CD137L человека (далее называемого hCD137L*) (R & D Systems), (53-0,00068 наномоль) BMS20H4.9, (107-0,0014 наномоль) PF83 или (53-0,00068 наномоль) антитела A1/2 добавляют при каждом разведении, проводимом в двух экземплярах, и инкубируют с легким перемешиванием в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем лунки, обработанные анти-CD137-антителами, промывают и добавляют разведенное 1:10000 козье анти-Fab-антитело, конъюгированное с HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories), и инкубируют при комнатной температуре в соответствии со стандартным протоколом. Затем лунки, обработанные hCD137L*, промывают и добавляют разведение 1:5000 конъюгированного с HRP мышинового анти-His-антитела (Sigma-Aldrich®) и планшеты инкубируют при комнатной температуре в соответствии со стандартным протоколом. Хромогенный субстрат и стоп-раствор ТМВ-пероксидазы используются в соответствии с инструкцией производителя по визуализации и обнаружению сигналов. Показания абсорбции представлены на графике в GraphPad Prism Software Version 6. Значения EC₅₀ рассчитываются с помощью анализа подгонки кривой нелинейной регрессии функции программного обеспечения "Одно место - специфическое связывание" (One Site - Specific Binding). В экспериментах, выполненных, как описано, аффинности связывания (EC₅₀) с hCD137** определяют как 0,6 наномолярную для hCD137L, 1,4 наномолярную для антитела 1/2, 0,43 наномолярную для BMS20H4.9 и более 10 наномолярную для PF83.

Способность hCD137L* конкурировать с BMS20H4.9, PF83 и антителом A1/2 за связывание с hCD137** можно определить следующим образом. 96-луночный планшет ИФА Immulon 4HBX покрывают в течение ночи 50 нанограммами hCD137** в 100 мкл PBS, pH 7,2 с легким перемешиванием при 4°C. После блокирования (с 5% BSA в PBST) и промывки пятикратное разведение (196-0,0025 наномолярного) hCD137L* смешивают с насыщенными количествами указанного антитела: антитело A1/2 (200 нанограмм/лунку), BMS20H4.9 (3 нанограмма/лунку) или PF83 (1000 нанограмм/лунку). Затем смеси добавляют в лунки в двух экземплярах и инкубируют при слабом перемешивании при комнатной температуре в течение 1 ч. После мытья планшет инкубируют с HRP-конъюгированным козьим анти-Fab-антителом (разведения 1:1000, Jackson ImmunoResearch Laboratories) при комнатной температуре в соответствии со стандартным протоколом. Хромогенный субстрат и стоп-раствор ТМВ-пероксидазы используются в соответствии с инструкцией производителя по визуализации и обнаружению сигналов.

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

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

Антитело A1/2 связывает CD137 человека через определенные аминокислотные остатками, которые отличаются от BMS20H4.9 и PF83.

Точечные мутации CD137 человека вводятся для определения аминокислотных остатков, в которых антитело A1/2, BMS20H4.9 и PF83 связываются с CD137 человека. Мутанты CD137-Fc генерируются с применением стандартного протокола коммерчески доступного набора для сайт-направленного мутагенеза (набор Quickchange II, Qiagen). Белки CD137-Fc дикого типа и мутантные белки экспрессируются и очищаются. Все указанные в данном документе мутанты имеют профиль исключения по размеру, сходный с таковым для CD137-Fc дикого типа (то есть введенные мутации не нарушают структурную целостность белка). Чтобы определить влияние мутации на связывание антител, используют точечный ИФА-анализ против CD137-Fc дикого типа и мутантов. Лунки 96-луночного планшета ИФА Immulon 4HBX покрывают в течение ночи 50 нанограммами CD137-ECD-C121S-Fc человека или его мутантов в 100 мкл PBS, pH 7,2, с легким перемешиванием при 4°C. После блокирования (с 5% BSA в PBST) и отмывки добавляют пятикратное разбавление восьмиточечной серии (100-0,00128 наномоль) указанного антитела и инкубируют с легким перемешиванием при комнатной температуре в течение 1 ч. Лунки промывают и добавляют вторичное антитело, конъюгированное с HRP (разведение 1:10000 козьего анти-Fab-антитела, конъюгированного с HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories), и инкубируют при комнатной температуре в соответствии со стандартным протоколом. Хромогенный субстрат и стоп-раствор ТМВ-пероксидазы применяют в соответствии с инструкцией производителя по визуализации и обнаружению сигналов. Показания поглощения для каждой точки концентрации нормированы по поглощению взаимодействия дикого типа. Для каждого мутанта определяется среднее нормализованное отношение для восьми концентраций.

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

Таблица 6

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

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

Таблица 7

	Антитело A1/2 (% связывания относительно hCD137 дикого типа)	PF83 (% связывания относительно hCD137 дикого типа)
K115Q	25	100
R130A *	100	100
R130H *	100	100
I132V *	100	100
R134Q *	100	25

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

Экспрессия гена CD137 в опухолях человека.

Профиль экспрессии гена CD137 в иммунных инфильтратах опухолей человека можно анализировать с применением базы данных Атласа генома рака (TCGA - The Cancer Genome Atlas) и вычислительных методологий. Вкратце, отношения экспрессии CD137/CD3ε получены из результатов курации TCGA RNASeq Omicsoft. Для сравнения соотношений экспрессии CD137/CD3ε в образцах опухоли и соседних нормалей одной и той же ткани проводят t-тест и рассчитывают d Коэна для каждого типа опухоли. Типы опухолей, которые имеют значение $P < 0,05$ в t-тесте соотношения экспрессии опухоли по сравнению с нормой и большой размер эффекта $d > 0$ по Коэну, являются статистически значимыми. Разница в соотношении экспрессии CD137/CD3ε в опухоли по сравнению с нормальной тканью рассчитывается как логарифмическое изменение (logFC).

Experiments В экспериментах, выполненных, как описано, повышенное соотношение CD137/CD3 в опухоли наблюдается при различных типах рака, включая, но не ограничиваясь этим, молочную железу, толстую кишку, эндометрий, мочевого пузырь и голову и шею (табл. 8). Опухоли, обогащенные лимфоцитами CD137⁺, являются кандидатами для терапии антителом CD137 с применением антитела A1, антитела A2 или антитела A1/2.

Таблица 8

Рак	Коэффициент экспрессии CD137/CD3 (logFC)	Значение P
Мочевой пузырь	1,92	3.85E-03
Молочная железа	2,46	3.56E-39
Холангиокарцинома	1,78	4.81E-06
Толстый кишечник	2,36	1.23E-19
Эндометрий	2,14	4.01E-15
Пищевод	1,07	1.71E-04
Желудок	1,68	9.27E-10
Голова и шея	1,90	8.06E-15
Аденокарцинома легких	1,37	2.63E-13
Плоскоклеточная карцинома	1,63	2.37E-13
Простата	1,04	2.73E-04
Прямая кишка	1,62	1.40E-05
Щитовидная железа	1,24	2.29E-06

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

Способность антител, раскрытых в данном документе, изменять инфильтрацию опухоли Т-клеток на гуманизированных моделях мышей можно определить с помощью иммуногистохимии (ИГХ). Вкратце, линию клеток L55 немелкоклеточного рака легких человека (L55-CBG-2A-GFP, Университет Пенсильвании) имплантируют мышам NSG. Когда размер опухолей достигает 250-300 мм³, вводят МКПК человека (8×10⁶ клеток) и антитела вводят в дозе 10 мг/кг один раз в неделю в течение 4 недель. В конце исследования опухоли собирают в формалин, перерабатывают в парафин, разрезают и окрашивают анти-телом против CD3 (Cell Signaling Technology). Изображения получают при увеличении 200× с помощью Aperio XT ScanScope® и анализируют полуколичественно. Процент CD3-положительных клеток к общему количеству опухолевых клеток рассчитывают с применением программного обеспечения Aperio ImageScope. Результаты сравниваются с помощью One Way ANOVA, после чего следует метод Холма-Сидака для множественных сравнений (Sigma Plot 12.5, Systat Software).

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

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности.

SEQ ID NO: 1 (CD137 человека)

MGNSCYNIVATLLLVLFNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSA
GGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTNAECDCTPGFHCGLGAGCSMCEQDCKQGQELTK
KGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSV
TPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT
TQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

SEQ ID NO: 2 (HCDR1)

KASGGTFSSYAIS

SEQ ID NO: 3 (HCDR2)

GIPIFGTANYAQKFQG

SEQ ID NO: 4 (HCDR3)

ARDLMTTAPGTYFDL

SEQ ID NO: 5 (LCDR1)

QASQDIGNSLG

SEQ ID NO: 6 (LCDR2)

FDASDLET

SEQ ID NO: 7 (LCDR3)

QQGNSFPLT

SEQ ID NO: 8 (HCVR)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDLMTTAPGTYFDLWG
RGTLVTV

SEQ ID NO: 9 (LCVR Антитела A1)

AIRMTQSPPSLSASVGDRVITTCQASQDIGNSLGWYQQKPGKAPKLVIFDASDLE
TGVPSRFGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGQGRLEIK

SEQ ID NO: 10 (HC)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDLMTTAPGTYFDLWG
RGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP
PCPAPEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 11 (LC Антитела A1)

AIRMTQSPPSLSASVGDRVITTCQASQDIGNSLGWYQQKPGKAPKLVIFDASDLE
TGVPSRFGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGQGRLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 12 (LCVR Антитела A2)

IRMTQSPPSLSASVGDRVITTCQASQDIGNSLGWYQQKPGKAPKLVIFDASDLET
GVPSRFGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGQGRLEIK

SEQ ID NO: 13 (LC Антитела A2)

IRMTQSPPSLSASVGDRVITTCQASQDIGNSLGWYQQKPGKAPKLVIFDASDLET
GVPSRFGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGQGRLEIKRTVAAPSVFI
PPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 14 (ДНК HC)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGG
TGAAGGTCTCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGG
TGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTT
GGTACAGCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGA
ATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCG
TGTATTACTGTGCGAGAGATCTGATGACTACGGCCCCTGGGACGTACTTCGATCTCT

GGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCT
 TCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC
 TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAATCAGGCGCACTG
 ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC
 AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA
 CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTT
 GTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGAGGGGGCACCG
 TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
 GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA
 CTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC
 AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAAGACTGGC
 TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCATCCTCCATC
 GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT
 GCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
 AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
 AACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTAT
 TCCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC
 GGGCAAATGA

SEQ ID NO: 15 (ДНК LC Антитела A1)

ATGAGGCTGCTGCCTCTGCTGGCCCTCCTGGCCCTGTGGGGCCCAGACCCAG
 CCAGAGCCGCCATCCGGATGACCCAGTCTCCACCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAG
 ACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTGGCAACTCTTTAGGTTGGT
 ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAACTCGTGATCTTCGATGCATCAGATCTG
 GAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGCACAGATTTAGTCT
 CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGGTAA
 CAGTTTCCCGCTCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGAACCTGCCTC
 TGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT
 GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA
 AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAG
 AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTAC
 AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO: 16 (ДНК LC Антитела A2)

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGCT
 CCACCGGCATCCGGATGACCCAGTCTCCACCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACA
 GAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTGGCAACTCTTTAGGTTGGTATC
 AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAACTCGTGATCTTCGATGCATCAGATCTGGAA
 ACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGCACAGATTTAGTCTCACC
 ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGGTAACAGT
 TTCCCGCTCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGAACCTGTGGCCGC

ACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT
GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT
GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA
AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG
AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC
AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO: 17 (ДНК LC Антитела A1/2)

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGCT
CCACCGGCGCCATCCGGATGACCCAGTCTCCACCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAG
ACAGAGTCAACATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTGGCAACTCTTTAGGTTGGT
ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAACTCGTGATCTTCGATGCATCAGATCTG
GAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGCACAGATTTCACTCT
CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGGTAA
CAGTTTCCCGCTCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGAACTGTGG
CTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGT
CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA
AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGAC
AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA
CGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCG
TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO: 18 (HC BMS20H4.9)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAYVGGSFSGYYWSWIRQSPEKGLEWIGEINHG
GYVTYNPSLESRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDYGPNGYDWFYDLWG
RGTLTVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPA
PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSR
LTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 19 (LC BMS20H4.9)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFGGGTKEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTY
SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 20 (HC PF83)

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPGKGLEWMGKIYPG
DSYTNYSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGLT
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPCPAPPVAG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
NSTFRVSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
METDTLLLVWLLWVPGSTGAIRMTQSPPSLSASVGDRTITCQASQDIGNSLGWYQQK
PGKAPKLIVFDASDLETGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGQ
GTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECNNYK
TTPPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 21 (LC PF83)

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVLVIYQDKNRPS
GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCATYTGFGSLAVFGGGTKLTVLGQPKAA
PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPPSKQSNK
YAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против CD137 человека, содержащее HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

2. Антитело по п.1, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и вариабельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

3. Антитело по п.1, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и вариабельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

4. Антитело против CD137 человека, содержащее тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

5. Антитело против CD137 человека, содержащее тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

6. Полинуклеотид, кодирующий антитело по п.4 или 5.

7. Полинуклеотид по п.6, имеющий последовательность SEQ ID NO: 14 и одну из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17.

8. Экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид по п.6 или 7.

9. Клетка млекопитающего, способная экспрессировать антитело по п.4 или 5, содержащая экспрессионный вектор по п.8.

10. Способ получения антитела по п.4 или 5, включающий культивирование клетки млекопитающего по п.9 и выделение указанного антитела.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-5 и приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

12. Способ лечения рака, включающий в себя введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела по любому из пп.1-5.

13. Способ по п.12, в котором рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желчных путей, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак простаты, рак прямой кишки или рак щитовидной железы.

14. Способ по п.12, в котором раком является холангиокарцинома, плоскоклеточный рак головы и шеи, аденокарцинома легкого, плоскоклеточный рак легкого или светлоклеточный рак почки.

15. Способ по п.12, в котором рак представляет собой рак мочевого пузыря, плоскоклеточный рак головы и шеи или почечно-клеточный рак.

16. Способ по любому из пп.12-15, в котором антитело вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением.

17. Способ по любому из пп.12-16, в котором антитело вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с одним или несколькими химиотерапевтическими агентами.

18. Применение антитела по любому из пп.1-5 в терапии.

19. Применение по п.18, где применение в терапии представляет собой применение в лечении рака.

20. Применение по п.19, где рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желчных путей, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, рак простаты, рак прямой кишки или рак щитовидной железы.

21. Применение по п.19, где рак представляет собой холангиокарциному, плоскоклеточный рак головы и шеи, аденокарциному легкого, плоскоклеточный рак легкого или светлоклеточный рак почки.

22. Применение по п.19, где рак представляет собой рак мочевого пузыря, плоскоклеточный рак головы и шеи или почечно-клеточный рак.

23. Применение антитела по любому из пп.1-5 для изготовления лекарственного средства для лечения рака.

24. Применение по п.23, где рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желчных путей, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак простаты, рак прямой кишки или рак щитовидной железы.

25. Применение по п.23, где рак представляет собой холангиокарциному, плоскоклеточный рак головы и шеи, аденокарциному легкого, плоскоклеточный рак легкого или светлоклеточный рак почки.

26. Применение по п.23, где рак представляет собой рак мочевого пузыря, плоскоклеточный рак головы и шеи или почечно-клеточный рак.

