

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293306** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.27

(22) Дата подачи заявки
2021.05.18

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

(54) СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(31) 63/026,883; 63/037,241

(32) 2020.05.19; 2020.06.10

(33) US

(86) PCT/US2021/032990

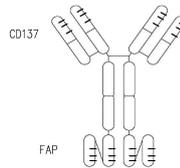
(87) WO 2021/236658 2021.11.25

(71) Заявитель:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Боргес Эрик (DE), Гупта Панкадж,
Роу Дэниел Кристофер, Шеер
Джастин М. (US), Суабни Абдалла,
Тирапу Иньиго (DE), Туманг Джозеф
Рональд (US)**

(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) Изобретение относится к связывающим молекулам, которые специфически связываются с CD137 и FAP, и к их применению в медицине, к фармацевтическим композициям, содержащим их, и к способам их применения в качестве агентов для лечения и/или профилактики рака.



202293306

A1

A1

202293306

СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

5 Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был представлен в электронной форме в ASCII-формате и, таким образом, полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Указанная копия формата ASCII, созданная 22 апреля 2021 года, называется 09-0703-WO-1_SL.txt, и имеет размер 873 263 байт.

10 Область техники изобретения

Это изобретение относится к связывающим молекулам, которые связываются с CD137 (4-1BB, TNFRSF9), членом семейства TNFR (англ.: *tumor necrosis factor receptors - рецепторов факторов некроза опухоли*), и белком активации фибробластов (FAP, англ.: *fibroblast activation protein*), и к их применению в медицине, к фармацевтическим композициям, содержащим их, и к способам их применения в качестве агентов для лечения и/или профилактики рака.

15 Предпосылки создания изобретения

20 Рак представляет собой группу заболеваний, обычно основанных на аномальной пролиферации клеток и способности раковых клеток поражать или распространяться по всему телу. Это серьезное заболевание и основная причина смерти во всем мире.

В попытке контролировать или в некоторых случаях лечить рак применяли различные способы лечения, включая хирургию, химиотерапию, лучевую терапию и гормональную терапию. Недавние достижения в иммунотерапии изменили ландшафт лечения рака. Все еще, большинство пациентов с местно-распространенными или метастатическими опухолями умирают от своего заболевания, что оправдывает существенную потребность в новых терапевтических стратегиях.

30 Биологические молекулы на основе антител имеют потенциал стать мощными терапевтическими агентами для лечения рака. Антитела предназначены для распознавания и связывания со специфическими белками на поверхности клеток (их антигенами-мишенями), и такие белки могут

присутствовать только на поверхности специфических раковых клеток или на иммунных клетках. Это связывание может вызывать ряд различных биологических реакций, в зависимости от функции их белка антигена мишени, а также от структуры антитела как такового.

5 Например, некоторые антитела запускают иммунную систему с тем, чтобы она атаковала и уничтожала раковые клетки, либо посредством привлечения иммунных клеток к раковым клеткам, либо посредством прямого влияния на активность иммунной системы как таковой. Еще один тип терапии на основе антител основан на связывании с раковыми клетками, с тем, чтобы остановить
10 или уменьшить деление клеток, тем самым, замедляя или предотвращая аномальную пролиферацию клеток. Другие типы антител содержат прикрепленные к ним лекарственные средства или радиоактивные частицы и, следовательно, доставляют указанные терапевтические средства к раковой клетке как таковой.

15 FAP является членом семейства дипептидилпептидаз (DPP) (который также называют белком активации фибробластов альфа, пропил эндопептидазой FAP, 170 кДа выделяемой меланомой мембранносвязанной желатиназой, интегральной мембранной серинпротеазой). Он временно экспрессируется в
20 некоторых мезенхимальных тканях плода, и редко в здоровых тканях взрослых, где присутствие FAP обычно ограничено клетками эндометрия. FAP также экспрессируется при заболеваниях, связанных с активированной стромой, включая заживление ран, ревматоидный артрит, остеоартрит, цирроз печени и фиброз легких; часто индуцируется в активированных фибробластах после травмы или повреждения ткани. FAP также экспрессируется в ткани стромы
25 опухоли всех видов эпителиальных опухолей человека и в злокачественных клетках различных сарком костей и мягких тканей. FAP экспрессируется в более, чем 90 % эпителиальных злокачественных новообразований человека, включая колоректальные новообразования, новообразования яичников, молочной железы, мочевого пузыря и легкого. FAP предпочтительно
30 обнаруживают в фибробластах, которые встречаются вблизи вновь образующихся или образованных кровеносных сосудов, и они образуют специфический клеточный компартмент между эндотелием капилляров опухоли и имеющимися злокачественными эпителиальными клетками и скоплениями клеток.

Стромальные фибробласты играют важную роль в развитии, росте и метастазировании карцином. Профиль экспрессии FAP позволяет предположить, что FAP играет роль в инвазии опухоли в здоровую ткань, а также в образовании опухоли и метастаз. Ингибиторы FAP, то есть вещества, которые способны
5 уменьшать или ингибировать протеолитическую активность FAP, являются полезными терапевтическими агентами для лечения всех видов опухолевых заболеваний. Ингибиторы FAP предпочтительно могут применяться для лечения опухолей эпителиального происхождения, таких как опухоли молочной железы, немелкоклеточные карциномы легких, колоректальные карциномы и карциномы
10 мягких тканей.

Антитела против FAP известны в данной области. Например, сибротузумаб, представляет собой гуманизированный мышиный FAP, который после гуманизации связывался с человеческим FAP, но не демонстрировал обнаруживаемого связывания с FAP мыши и не уничтожал опухоль на мышиных
15 моделях. (WO 1993005804, Cheng, и др. Tumors and their microenvironments: tilling the soil. Commentary re: A. M. Scott и др., A Phase I dose-escalation study of sibrotuzumab in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer. Clin. Cancer Res., 9: 1639-1647). На стадии коммерческой доклинической или клинической разработки находится по меньшей мере
20 различных антител, которые нацеливаются на FAP (смотри, например, US 8999342, Ludwig Institute for Cancer Research (mAb/доклиническое); WO 2016110598, US 20170369592 Mabimmune Diagnostics/Univ Zurich (mAb/доклиническое); WO 2015118030, US 10137202, Oncomatrix (mAb-конъюгат/доклинический); WO 1993005804, WO 1999057151, WO 2001068708,
25 WO 2002083171, WO 2007077173, US 8568727, сибротузумаб, Boehringer Ingelheim (гуманизированный мышиный FAP/ограниченный после PH1 в колоректальном отделе)).

CD137 (4-1BB, TNFRSF9, CDw137, гомология Т-клеточного антигена 4-1BB, Т-клеточный антиген ILA, CD_антиген CD137) также является членом
30 надсемейства рецепторов факторов некроза опухоли. CD137 экспрессируется на активированных Т-лимфоцитах и при взаимодействии с лигандом обеспечивает усиленную функцию Т-клеток. Активация CD137 зависит от олигомеризации рецептора. CD137 экспрессируется на активированных CD4+ и CD8+ Т-клетках, Treg, DC, моноцитах, тучных клетках и эозинофилах. Активация CD137 играет

важную роль в активации и выживании CD8⁺ Т-клеток. Он поддерживает и усиливает, а не инициирует эффекторные функции, и преимущественно поддерживает выработку TNF-цитокинов. В CD4⁺ Т-клетках, стимуляция CD137 сначала приводит к активации, а затем к индуцированной активацией гибели клеток, что позволяет автоматически предположить, почему агонистические антитела к CD137 могут иметь терапевтическое действие на опухолевый иммунитет, а также на аутоиммунитет.

Дополнительно, CD137 экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках, таких как дендритные клетки и макрофаги, и стимуляция CD137 на указанных типах клеток может индуцировать иммунную активацию, что может привести к иммунитету, направленному против опухоли. CD137 играет существенную роль в иммунном надзоре. Дефицит CD137 приводит к снижению иммунных ответов Т-клеток у нокаутных мышей, таким как выработка цитокинов и цитолитическая активность Т-клеток (Kwon, 2002, Narazaki, 2010). У людей, дефицит CD137 связан с иммунной дисрегуляцией, нарушением лимфоцитарных реакций и EBV-ассоциированным лимфомагенезом (Somekh, 2019).

Также было показано, что агонистическое антитело к CD137 активирует эндотелиальные клетки в опухолевой среде, что приводит к активации ICAM-1 и VCAM-1 и к улучшенному рекрутированию Т-клеток. Несколько исследований продемонстрировали индукцию противоопухолевого иммунитета в результате лечения агонистическими антителами к CD137, причем пионерская работа относится к 1997 году (Melero, 1997).

Более 25 агентов, которые нацеливаются на CD137, в настоящее время находятся в доклинической или клинической разработке, но прогресс в отношении этой цели был медленным. Урелумаб (BMS-66513), полностью человеческое антитело IgG4, разработанное компанией Bristol-Myers Squibb, было первым агонистом CD137, введенным в клинические исследования в 2005 г. Он показал многообещающую эффективность у пациентов с меланомой в комбинации с пембролизумабом, но несколько испытаний было остановлено вследствие опасений по поводу гепатотоксичности. Будущее урелумаба является неясным, он был исключен из программы BMS (*Bristol-Myers Squibb*), хотя ряд спонсируемых BMS испытаний все еще продолжается. Другой ведущий агонист CD137, утомилумаб компании Pfizer (PF-05082566), полностью человеческое

антитело IgG2, продемонстрировало лишь умеренную клиническую эффективность в различных комбинациях. В то время как урелумаб может стимулировать Т-клетки без дополнительного сшивания, утомилумаб, напротив, нуждается в FcγR-опосредованном сшивании для инициирования агонистического действия (Fisher, 2012). В последнем случае, FcγR-опосредованное сшивание не является прогнозируемым процессом, что ограничивает противоопухолевую эффективность утомилумаба. В апреле 2018 года, компания Pfizer объявила, что она больше не разрабатывает утомилумаб в качестве монотерапии или в комбинации с пембролизумабом, хотя другие комбинированные испытания могут продолжаться. Таким образом, в то время как предварительные данные позволяют предположить, что хотя утомилумаб, в отличие от урелумаба, был переносимым, он продемонстрировал всего лишь умеренное противоопухолевое действие, даже в комбинации с авелумабом и ритуксимабом. Испытание III фазы компании Pfizer недавно сократили с 500 до 29 пациентов.

Современные разрабатываемые CD137-агенты фокусируют активность на опухоли, одновременно нацеливаясь на опухолевый антиген (например, HER2), и это может обеспечивать повышенную активность без повышения токсичности. PRS-343, биспецифический CD137/Her2, недавно показал многообещающие результаты на I фазе испытания у имеющих рак пациентов, которых предварительно интенсивно лечили по поводу нескольких типов опухолей. PRS-343 продемонстрировал противоопухолевую активность, увеличение инфильтрирующих опухоль CD8+ Т-клеток и хороший профиль безопасности. Считается, что экспрессия FAP на ассоциированных с опухолью фибробластах в строме является более стабильной, чем экспрессия HER2 на раковых клетках и, таким образом, комбинация CD137 с HER2 в качестве совместно локализованных мишеней, может иметь ограниченную эффективность.

Другая биспецифическая молекула CD137/FAP DARPIn (MP-0310, от компании AMGEN/Molecular Partners) представляет собой еще одну такую нацеливающуюся на опухоль молекулу, отформатированную в виде связывающей одновалентной молекулы в отношении FAP и связывающей одновалентной молекулы в отношении CD137. При этом не ясно, обеспечивает ли этот формат связывание природного лиганда CD137 *in vivo*, или же связывающая одновалентная молекула в отношении CD137 способна сшивать

CD137, таким образом в достаточной степени активируя Т-клетки. DARPin (разработанные белки анкириновых повторов) не являются антителами, а представляют собой сконструированные с помощью генной инженерии белки-миметики антител; новый класс неиммуноглобулиновых белков, которые были
5 использованы вместо антител для связывания с мишенями при открытии лекарственных средств и разработке лекарственных средств (смотри, например, WO 2002/020565), US 20130244940, и Link и др. “Preclinical pharmacology of MP0310: a 4-1BB/FAP bi-specific DARPin® drug candidate promoting tumor restricted T cell co-stimulation.” Poster 3572,
10 (<https://investors.molecularpartners.com/~media/Files/M/Molecular-Partners/documents/201804-mp0310-pharmacology-poster-3752.pdf>).

Кроме того, молекула CD137-L/FAP (RG-7827 от компании Roche targeting) представляет собой тримеризованный лиганд CD137 человека, а не плечо связывания антител. Неизвестно, обеспечивает ли лиганд CD137
15 мультимеризацию CD137 более высокого порядка, которая, как считают, необходима для повышения агонистической активности. Кроме того, ожидается, что RG-7827 будет конкурировать с эндогенным лигандом CD137. (Смотри, например, WO 2019175125; WO 2017055398; WO 2017060144; US 20170114141; US 20170247467; а также J. Sam, C. Claus, C. Ferrara, S. Lang, V. Nicolini,
20 S. Colombetti, V. Teichgräber, S. Evers, M. Bacac, P. Umana, C. Klein. (AACR 2018, Poster 5621, FAP-4-1BBL: A novel versatile tumor-stroma targeted 4-1BB agonist for combination immunotherapy with checkpoint inhibitors, T-cell bispecific antibodies, and ADCC-mediating antibodies.)

Таким образом, в то время как в доклинических моделях системное
25 введение агонистических антител к 4-1BB может было показано в качестве эффективных нацеливающихся на опухоль агентов, клиническая разработка не прошла успешно II фазу испытаний, что затруднялось либо значительной ограничивающей дозу гепатотоксичностью, либо ограниченной клинической эффективностью, что может быть связано с относительно низкой активностью
30 и/или зависимостью от опосредованной рецептором Fcγ гиперкластеризации. Таким образом, хотя биспецифические молекулы CD137 и молекулы CD137 с различными партнерами по комбинации в настоящее время находятся в разработке, безопасность и клиническая эффективность этого антигена еще должна быть продемонстрирована.

С точки зрения лечения рака в целом, несмотря на недавние крупные достижения, некоторые сложно поддающиеся лечению солидные опухоли не реагируют на доступную терапию, либо же на лекарственные средства, которые в настоящее время являются стандартом лечения, либо же на современные и
5 сначала многообещающие лекарственные средства, которые находятся в настоящее время на клинических испытаниях. Даже если пациенты реагируют сначала, часто они не испытывают длительной реакции и редко достигают полной ремиссии или излечения. Например, в случае немелкоклеточного рака легкого, одной из таких неудовлетворенных потребностей, около 40-50 % всех
10 случаев НМКРК (*немелкоклеточного рака легкого*) не отвечают на терапию первой линии, в то время как другие 50 % случаев, которые отвечают, не испытывают длительной реакции с текущей терапией первой линии (например, включая анти-PD1 иммунотерапию). Кроме того, менее 30-40 % пациентов не испытывают прогрессирования по истечению 12 месяцев. Варианты
15 последующей терапии для пациентов 2-й/3-й линии, которые ранее получали анти-PD-L1 лечение, ограничены и не полностью признаны. При этом такие варианты химиотерапии, как доцетаксел или схемы на основе платины (если они не применялись на 1-й линии) имеют ограниченную пользу.

Принимая во внимание доступные доклинические и клинические данные, а также плохие перспективы для таких имеющих рак пациентов, существует очевидная необходимость в выявлении более эффективной терапии, в частности, терапии, обладающей улучшенной переносимостью для пациента и нацеленной специфичностью в отношении типов опухолей, устойчивых к доступной в
20 настоящее время терапии. Таким образом, существует потребность в новых подходах, которые бы включали иммунологически активные агенты с
25 различными механизмами действий.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение основано на концепции, согласно которой ограничивающая опухоль активация опухоль-специфичных ТИЛ (*tumor infiltrating lymphocytes - инфильтрирующих опухоль лимфоцитов*) представляет
30 многообещающую модальность лечения рака. Варианты осуществления изобретения представляют собой биспецифические, двухвалентные молекулы, которые объединяют сайты связывания, которые специфически связываются с белком активации фибробластов (FAP), с сайтами связывания с низкой

аффинностью, которые специфически связываются с CD137 (4-1BB, TNFRSF9) в пределах одной связывающей молекулы. Биспецифические молекулы в соответствии с изобретением активируют, взаимодействуют с CD137 на Т-клетках только в контексте стромы рака микроокружения опухоли, где экспрессируется FAP.

Как обсуждается более подробно ниже, одним из преимуществ молекулы в соответствии с изобретением является улучшение активации опухолерепреактивных Т-клеток и распространение существующего ответа опухоли на микроокружение опухоли, что приводит к регрессии опухоли у пациентов, при улучшении безопасности, по сравнению с традиционными агонистами CD137. Если обусловить взаимодействие CD137 проксимальной экспрессией FAP из-за его низкой аффинности, активность CD137 и рекрутирование Т-клеток происходит только в FAP+ опухолевой среде многих типов рака. Указанное взаимодействие с низкой аффинностью является улучшением по сравнению с другими одновалентными подходами CD137, поскольку двухвалентные молекулы в соответствии с изобретением в значительной степени связываются и активируют только те Т-клетки, которые находятся в опухоли в присутствии FAP, вызывая их пролиферацию и секрецию IFN γ , таким образом, обеспечивая лучший локализованный опухоленаправленный иммунный ответ. В конечном счете, нацеленная активность антитела против CD137/FAP будет приводить к регрессии опухоли у пациентов с хорошей переносимостью и улучшенным профилем безопасности, по сравнению с традиционными агонистами CD137.

Следовательно, первый аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, имеющую по меньшей мере один сайт связывания антигена, который специфически связывается с белком активации фибробластов (FAP), и по меньшей мере один сайт связывания антигена, который специфически связывается с CD137 (4-1BB, TNFRSF9).

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, молекула является биспецифической и четырехвалентной; двухвалентной в отношении CD137 и двухвалентной в отношении FAP.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, который специфически

связывается с CD137 (4-1BB, TNFRSF9), является частью молекулы иммуноглобулина (Ig), и сайт связывания антигена, который специфически связывается с белком активации фибробластов (FAP), содержит один или большее количество scFv, слитых с N-концом Fc-домена, предпочтительно через пептидный линкер.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, один или большее количество scFv имеют ориентацию VL-VH от N-конца к C-концу.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, один или большее количество scFv слиты с C-концом тяжелой цепи молекулы Ig.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, молекула Ig представляет собой IgG1KO.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, один или большее количество scFv слиты с молекулой Ig посредством пептидного линкера, предпочтительно пептидного линкера, имеющего длину, составляющую приблизительно 4 - 20 аминокислот.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывается с CD137 (4-1BB), выбирают из группы, которая включает в себя:

I) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:290 (CDR1), SEQ ID №:8 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:12 (CDR1), SEQ ID №:13 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); или

II) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:18 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:22 (CDR1), SEQ ID №:23 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); или

III) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:28 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:32 (CDR1), SEQ ID №:33 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); или

IV) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:38 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:42 (CDR1), SEQ ID №:43 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); или

5 V) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:48 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:52 (CDR1), SEQ ID №:53 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); или

10 VI) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:58 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:62 (CDR1), SEQ ID №:63 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); или

15 VII) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:68 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:72 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); или

20 VIII) CDR тяжелой цепи, содержащие SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:78 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:72 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); или

IX) CDR тяжелой цепи, содержащие SEQ ID №:308(CDR1), SEQ ID №:88 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); или

25 X) CDR тяжелой цепи, содержащие SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:98 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:93 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); или

30 XI) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:672 (CDR1), причем X1 выбирают из группы, состоящей из A или S, SEQ ID №:335 (CDR2), причем X1 выбирают из группы, состоящей из N или Q, X2 выбирают из группы, состоящей из D или E, X3 выбирают из группы, состоящей из G или A, и X4 выбирают из группы, состоящей из T-или K, X5 выбирают из группы, состоящей из L или V, X6 выбирают из группы, состоящей

из D или E, X7 выбирают из группы, состоящей из L или V, и X8 выбирают из группы, состоящей из S или G, и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:336 (CDR1), причем X1 выбирают из группы, состоящей из K или R, X2 выбирают из группы, состоящей из D или S, X3 выбирают из группы, состоящей из V или I, X4 выбирают из группы, состоящей из S или T, и X5 выбирают из группы, состоящей из V и L, SEQ ID №:337 (CDR2), причем X1 выбирают из группы, состоящей из S или A, X2 выбирают из группы, состоящей из Y или S, X3 выбирают из группы, состоящей из R или L, X4 выбирают из группы, состоящей из Y и Q, и X5 выбирают из группы, состоящей из S или T, и SEQ ID №:14 (CDR3); или

XII) CDR тяжелой цепи, содержащие SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:338 (CDR2), причем X1 выбирают из группы, состоящей из Y или I, и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:669 (CDR1), причем X1 выбирают из группы, состоящей из N или Q, SEQ ID №:339 (CDR2), причем X1 выбирают из группы, состоящей из L или G, и SEQ ID №:74 (CDR3); или

XIII) CD137-антиген связывающую молекулу, которая связывает эпитоп на CD137 во внеклеточном CRD3-домене между аминокислотами 87-118 (SEQ ID №:352) и блокирует связывание и/или конкурирует за связывание с любой из указанных выше антигенсвязывающих молекул (I)-(XII); или

XVI) CD137-антиген связывающую молекулу, которая связывает эпитоп на CD137 во внеклеточном CRD2/CRD3-домене между аминокислотами 46-117 (SEQ ID №:356) и блокирует связывание и/или конкурирует за связывание с любой из указанных выше антигенсвязывающих молекул (I)-(XVI).

В предпочтительном варианте осуществления иммуноглобулиноподобной связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, который специфически связывается с CD137 (4-1BB), является частью молекулы иммуноглобулина, содержащей переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем участки VH и VL выбирают из группы, которая включает в себя:

I) переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:10, и переменную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:15; или

II) переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:20, и переменную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:25; или

5 III) переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:30, и переменную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:35; или

IV) переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:40, и переменную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:45; или

10 V) переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:50, и переменную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:55; или

15 VI) переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:60, и переменную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:65; или

VII) переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:70, и переменную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:75; или

20 VIII) переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:80, и переменную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:85; или

IX) переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:90, и переменную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:95; или

25 X) переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:100, и переменную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:105; или

XI) переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:10, которая отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:672 CDRH1 аминокислотной заменой не более чем одной аминокислоты, причем X1 выбирают из группы, состоящей из A или S, и/или отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:335 CDRH2 аминокислотной заменой не более чем четырех аминокислот, причем X1 выбирают из группы, состоящей из N или Q, X2 выбирают из группы, состоящей

из D или E, X3 выбирают из группы, состоящей из G или A, и X4 выбирают из группы, состоящей из T-или K, X5 выбирают из группы, состоящей из L или V, X6 выбирают из группы, состоящей из D или E, X7 выбирают из группы, состоящей из L или V, и X8 выбирают из группы, состоящей из S или G, и
5
вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:15, которая отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:336 CDRL1 аминокислотной заменой не более чем четырех аминокислот, причем X1 выбирают из группы, состоящей из K или R, X2 выбирают из группы, состоящей из D или S, X3 выбирают из группы, состоящей из V или I, X4 выбирают из группы, состоящей из S или T, и X5 выбирают из группы, состоящей из V и L, и/или которая отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:337 CDRL2 аминокислотной заменой не более чем пяти аминокислот, причем X1 выбирают из группы, состоящей из S или A, X2 выбирают из группы, состоящей из Y или S, X3 выбирают из группы, состоящей из R или L, X4 выбирают из группы, состоящей из Y и Q, и X5
10
выбирают из группы, состоящей из S или T; или

XII) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:70, которая отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:338 CDRH2 аминокислотной заменой не более чем одной аминокислоты, причем X1 выбирают из группы, состоящей из Y или I, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:75, которая отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:669 CDRL1 аминокислотной заменой не более чем одной аминокислоты, причем X1 выбирают из группы, состоящей из N или Q, и которая отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:339 CDRL2 аминокислотной заменой не более чем одной аминокислоты, причем X1 выбирают из группы, состоящей из L или G; или
20
25

XIII) вариабельный участок тяжелой цепи VH, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, или 100 % идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №:10, SEQ ID №:20, SEQ ID №:30, SEQ ID №:40, SEQ ID №:50, и SEQ ID №:60, и вариабельный участок легкой цепи VL, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 95 %, 96 %, 30

97 %, 98 %, 99 %, или 100 % идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №:15, SEQ ID №:25, SEQ ID №:35, SEQ ID №:45, SEQ ID №:55, SEQ ID №:65; или

XIV) вариабельный участок тяжелой цепи VH, содержащий
5 аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, или 100 % идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №:70, SEQ ID №:80, SEQ ID №:90, и SEQ ID №:100, и вариабельный участок легкой цепи VL, содержащий аминокислотную последовательность, которая по
10 меньшей мере приблизительно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, или 100 % идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №:75, SEQ ID №:85, SEQ ID №:95, и SEQ ID №:105; или

(XV) CD137-антигенсвязывающую молекулу, которая связывает эпитоп на CD137 во внеклеточном CRD3-доме между аминокислотами 87-118
15 (SEQ ID №:352) и блокирует связывание и/или конкурирует за связывание с любой из указанных выше антигенсвязывающих молекул (I)-(XIV); или

(XVI) CD137-антигенсвязывающую молекулу, которая связывает эпитоп на CD137 во внеклеточном CRD2/CRD3-доме между аминокислотами 46-117
20 (SEQ ID №:356) и блокирует связывание и/или конкурирует за связывание с любой из указанных выше антигенсвязывающих молекул (I)-(XIV).

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, который специфически связывается с белком активации фибробластов (FAP), выбирают из группы scFv, содержащей:

25 I) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:108 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:111 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

II) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности
30 SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

III) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR

легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

IV) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:328 (CDR1), SEQ ID №:135 (CDR2) и SEQ ID №:136 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

V) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:333 (CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

VI) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:341 (CDR2), причем X1 выбирают из D или E, и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:691 (CDR1), причем X1 выбирают из группы, состоящей из N, R, или S, и X2 выбирают из N или S, и SEQ ID №:112 (CDR2), и SEQ ID №:113 (CDR3); или

VII) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:694 (CDR1), причем X1 выбирают из группы, состоящей из S или N, SEQ ID №:342 (CDR2), причем X1 выбирают из группы, состоящей из D или E, и SEQ ID №:343 (CDR3), причем X1 выбирают из N или E, и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), и SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3).

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, который специфически связывается с белком активации фибробластов (FAP), выбирают из группы scFv, содержащей:

I) переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:106, и переменную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:110; или

II) переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:115, и переменную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:119; или

III) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:124, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:128; или

5 IV) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:133, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:137; или

V) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:142, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:146; или

10 VI) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:106, которая отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:341 CDRH2 аминокислотной заменой не более чем одной аминокислоты, причем X1 выбирают из D или E, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность
15 SEQ ID №:110, которая отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:691 CDRL1 аминокислотной заменой не более чем двух аминокислот, причем X1 выбирают из группы, состоящей из N, R, или S, и X2 выбирают из группы, состоящей из N или S; или

20 VII) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:133, которая отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:694 CDRH1 аминокислотной заменой не более чем одной аминокислоты, причем X1 выбирают из группы, состоящей из S или N, и/или которая отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:342 CDRH2 аминокислотной заменой не более чем одной
25 аминокислоты, причем X1 выбирают из группы, состоящей из D или E, и/или которая отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:343 CDRH3 аминокислотной заменой не более чем одной аминокислоты, причем X1 выбирают из группы, состоящей из N или E, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:137; или

30 VIII) вариабельный участок тяжелой цепи VH, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, или 100 % идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №:106, SEQ ID №:115, и SEQ ID №:124, и вариабельный участок легкой цепи VL,

содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, или 100 % идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №:110, SEQ ID №:119, и SEQ ID №:128; или

5 VIV) вариабельный участок тяжелой цепи VH, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, или 100 % идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №:133 и SEQ ID №:142, и вариабельный участок легкой цепи VL, содержащий
10 аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, или 100 % идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №:137 и SEQ ID №:146.

Предпочтительный вариант осуществления иммуноглобулиноподобной
15 связывающей молекулы в соответствии с изобретением содержит первый сайт связывания антигена, который специфически связывается с CD137 (4-1BB), и второй сайт связывания антигена, который специфически связывается с белком активации фибробластов (FAP), выбранный из группы, содержащей:

I) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи,
20 содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:290 (CDR1), SEQ ID №:8 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:12 (CDR1), SEQ ID №:13 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи,
25 содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:108 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:111 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

II) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи,
30 содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:290 (CDR1), SEQ ID №:8 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:12 (CDR1), SEQ ID №:13 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

III) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:290 (CDR1), SEQ ID №:8 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:12 (CDR1), SEQ ID №:13 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

IV) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:290 (CDR1), SEQ ID №:8 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:12 (CDR1), SEQ ID №:13 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:328 (CDR1), SEQ ID №:135 (CDR2) и SEQ ID №:136 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

V) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:290 (CDR1), SEQ ID №:8 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:12 (CDR1), SEQ ID №:13 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:333 (CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139

(CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или (VI) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:18 (CDR2) и SEQ ID №: 9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:22 (CDR1), SEQ ID №:23 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:108 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:111 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

(VII) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:18 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:22 (CDR1), SEQ ID №:23 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

(VIII) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:18 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:22 (CDR1), SEQ ID №:23 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

IX) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:18 (CDR2) и SEQ ID №: 9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие

аминокислотные последовательности SEQ ID №:22 (CDR1), SEQ ID №:23 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:328 (CDR1), SEQ ID №:135 (CDR2) и SEQ ID №:136 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

(X) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:18 (CDR2) и SEQ ID №: 9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:22 (CDR1), SEQ ID №:23 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:333 (CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

(XI) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:28 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:32 (CDR1), SEQ ID №:33 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:108 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:111 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

(XII) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:28 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:32 (CDR1), SEQ ID №:33 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1),

SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

5 (XIII) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:28 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:32 (CDR1), SEQ ID №:33 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

10 (б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

15 (XIV) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:28 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:32 (CDR1), SEQ ID №:33 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

20 (б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:328 (CDR1), SEQ ID №:135 (CDR2) и SEQ ID №:136 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

25 (XV) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:28 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:32 (CDR1), SEQ ID №:33 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

30 (б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:333(CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

(XVI) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:38 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:42 (CDR1), SEQ ID №:43 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:108 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:111 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

(XVII) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:38 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:42 (CDR1), SEQ ID №:43 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

(XVIII) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:38 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:42 (CDR1), SEQ ID №:43 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

(XIX) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:38 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие

аминокислотные последовательности SEQ ID №:42 (CDR1), SEQ ID №:43 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:328 (CDR1), SEQ ID №:135 (CDR2) и SEQ ID №:136 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139(CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

(XX) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:38 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:42 (CDR1), SEQ ID №:43 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:333 (CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

(XXI) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:48 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:52 (CDR1), SEQ ID №:53 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:108 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:111 (CDR1), SEQ ID №:111 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

(XXII) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:48 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:52 (CDR1), SEQ ID №:53 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1),

SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

5 (XXIII) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:48 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:52 (CDR1), SEQ ID №:53 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

10 (б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

15 (XXIV) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:48 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:52 (CDR1), SEQ ID №:53 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

20 (б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:328 (CDR1), SEQ ID №:135 (CDR2) и SEQ ID №:136 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

25 (XXV) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:48 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:52 (CDR1), SEQ ID №:53 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

30 (б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:333 (CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

(XXVI) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:58 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:62 (CDR1), SEQ ID №:63 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:108 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:111 (CDR1), SEQ ID №:111 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

(XXVII) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:58 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:62 (CDR1), SEQ ID №:63 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

(XXVIII) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:58 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:62 (CDR1), SEQ ID №:63 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

(XXIX) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:58 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие

аминокислотные последовательности SEQ ID №:62 (CDR1), SEQ ID №:63 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:328 (CDR1), SEQ ID №:135(CDR2) и SEQ ID №:136 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

(XXX) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:58 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:62 (CDR1), SEQ ID №:63 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:333 (CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

(XXXI) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:68 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:72 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:108 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:111 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

(XXXII) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:68 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:72 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1),

SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

5 (XXXIII) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:68 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:72 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); и

10 (б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

15 (XXXIV) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:68 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:72 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); и

20 (б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:328 (CDR1), SEQ ID №:135 (CDR2) и SEQ ID №:136 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

25 (XXXV) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:68 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:72 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); и

30 (б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:333 (CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

(XXXVI) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:78 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:72 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:108 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:111 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

(XXXVII) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:78 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:72 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

(XXXVIII) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:78 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:72 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

(XXXIX) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:78 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи,

содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:72 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:328 (CDR1), SEQ ID №:135 (CDR2) и SEQ ID №:136 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

(XL) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:78 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:72 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:333 (CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

(XLI) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:88 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:108 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:111 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

(XLII) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:88 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1),

SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

5 (XLIII) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:88 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); и

10 (б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

15 (XLIV) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:88 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); и

20 (б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:328 (CDR1), SEQ ID №:135 (CDR2) и SEQ ID №:136 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

25 (XLV) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:88 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); и

30 (б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:333 (CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

(XLVI) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:98 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:108 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:111 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

(XLVII) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:98 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

(XLVIII) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:98 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

(XLIX) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:98 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие

аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:328 (CDR1), SEQ ID №:135 (CDR2) и SEQ ID №:136 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

(L) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:98 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3) и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:333 (CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

(LI) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:672 (CDR1), где X1 представляет собой A или S, SEQ ID №:335 (CDR2), причем X1 выбирают из группы, состоящей из N или Q, X2 выбирают из группы, состоящей из D или E, X3 выбирают из группы, состоящей из G или A, и X4 выбирают из группы, состоящей из T-или K, X5 выбирают из группы, состоящей из L или V, X6 выбирают из группы, состоящей из D или E, X7 выбирают из группы, состоящей из L или V, и X8 выбирают из группы, состоящей из S или G, и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:336 (CDR1), причем X1 выбирают из группы, состоящей из K или R, X2 выбирают из группы, состоящей из D или S, X3 выбирают из группы, состоящей из V или I, X4 выбирают из группы, состоящей из S или T, и X5 выбирают из группы, состоящей из V и L, SEQ ID №:337 (CDR2), причем X1 выбирают из группы, состоящей из S или A, X2 выбирают из группы, состоящей из Y или S, X3 выбирают из группы, состоящей из R или L, X4 выбирают из группы, состоящей из Y и Q, и X5 выбирают из группы, состоящей из S или T, и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:341 (CDR2), причем X1 выбирают из D или E, и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:691 (CDR1), причем X1 выбирают из группы, состоящей из N, R, или S, и X2 выбирают из выбирают из N или S, SEQ ID №:112 (CDR2), и SEQ ID №:113 (CDR3); или

(LII) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:672 (CDR1), причем X1 выбирают из группы, состоящей из A или S, SEQ ID №:335 (CDR2), причем X1 выбирают из группы, состоящей из N или Q, X2 выбирают из группы, состоящей из D или E, X3 выбирают из группы, состоящей из G или A, и X4 выбирают из группы, состоящей из T-или K, X5 выбирают из группы, состоящей из L или V, X6 выбирают из группы, состоящей из D или E, X7 выбирают из группы, состоящей из L или V, и X8 выбирают из группы, состоящей из S или G, и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:336 (CDR1), причем X1 выбирают из группы, состоящей из K или R, X2 выбирают из группы, состоящей из D или S, X3 выбирают из группы, состоящей из V или I, X4 выбирают из группы, состоящей из S или T, и X5 выбирают из группы, состоящей из V и L, SEQ ID №:337 (CDR2), причем X1 выбирают из группы, состоящей из S или A, X2 выбирают из группы, состоящей из Y или S, X3 выбирают из группы, состоящей из R или L, X4 выбирают из группы, состоящей из Y и Q, и X5 выбирают из группы, состоящей из S или T, и SEQ ID №:14 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:694 (CDR1), причем X1 выбирают из группы, состоящей из S или N, SEQ ID №:342 (CDR2), причем X1 выбирают из группы, состоящей из D или E, и SEQ ID №:343 (CDR3), причем X1 выбирают из N или E, и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2), и SEQ ID №:140 (CDR3); или

(LIII) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:338 (CDR2), причем X1 выбирают из группы, состоящей из Y или I, и

SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:669 (CDR1), причем X1 выбирают из группы, состоящей из N или Q, SEQ ID №:339 (CDR2), причем X1 выбирают из группы, состоящей из L или G, и SEQ ID №:74 (CDR3) и

5 (б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:341 (CDR2), причем X1 выбирают из D или E, и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:691 (CDR1), причем X1 выбирают из группы, состоящей из N, R, или
10 S, и X2 выбирают из выбирают из N или S, SEQ ID №:112 (CDR2), и SEQ ID №:113 (CDR3); или (LIX) (а) сайт связывания CD137, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:338 (CDR2), причем X1 выбирают из группы, состоящей из Y или I, и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие
15 аминокислотные последовательности SEQ ID №: 669 (CDR1), причем X1 выбирают из группы, состоящей из N или Q, SEQ ID №:339 (CDR2), причем X1 выбирают из группы, состоящей из L или G, и SEQ ID №:74 (CDR3); и

(б) сайт связывания FAP, который включает в себя CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:694 (CDR1),
20 причем X1 выбирают из группы, состоящей из S или N, SEQ ID №:342 (CDR2), причем X1 выбирают из группы, состоящей из D или E, и SEQ ID №:343 (CDR3), причем X1 выбирают из N или E, и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2), и SEQ ID №:140 (CDR3). Дополнительный аспект изобретения

25 обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую

(I) тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем C-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:151, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:152; или

(II) тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем C-конце,
30 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:153, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:154; или

(III) тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем C-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:155, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:156; или

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:264; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:265; или

(XXIII) тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:269; и легкую

5 цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:270; или

(XXIV) тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:274; и легкую

цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:275; или

(XXV) (а) первый полипептид, содержащий тяжелую цепь

10 иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:151, причем переменная часть тяжелой цепи, специфически связывающаяся с CD137, отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:672 CDRH1 аминокислотной заменой не более чем одной аминокислоты, причем X1

15 выбирают из группы, состоящей из А или S, и/или которая отличается от SEQ ID №:335 CDRH2 аминокислотной заменой не более чем четырех аминокислот, причем X1 выбирают из группы, состоящей из N или Q, X2 выбирают из группы, состоящей из D или E, X3 выбирают из группы, состоящей из G или A, и X4 выбирают из группы, состоящей из T-или K, X5 выбирают из

20 группы, состоящей из L или V, X6 выбирают из группы, состоящей из D или E, X7 выбирают из группы, состоящей из L или V, и X8 выбирают из группы, состоящей из S или G, причем указанный scFv представляет собой FAP-связывающий scFv и содержит домен тяжелой цепи (VH) и домен легкой цепи, причем указанный VH FAP отличается аминокислотной последовательностью от

25 SEQ ID №:341 CDRH2 аминокислотной заменой не более чем одной аминокислоты, причем X1 выбирают из D или E, и указанный FAP VL отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:691 CDRL1 аминокислотной заменой не более чем двух аминокислот, причем X1 выбирают из группы, состоящей из N, R, или S, и X2 выбирают из N или S, и

30 (б) второй полипептид, содержащий домен легкой цепи (VL), который специфически связывается с CD137, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:152, который отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:336 CDRL1 аминокислотной заменой не более чем четырех аминокислот, причем X1 выбирают из группы, состоящей из

К или R, X2 выбирают из группы, состоящей из D или S, X3 выбирают из группы, состоящей из V или I, X4 выбирают из группы, состоящей из S или T, и X5 выбирают из группы, состоящей из V и L, и/или который отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:337 CDRL2 аминокислотной заменой не более чем пяти аминокислот, причем X1 выбирают из группы, состоящей из S или A, X2 выбирают из группы, состоящей из Y или S, X3 выбирают из группы, состоящей из R или L, X4 выбирают из группы, состоящей из Y и Q, и X5 выбирают из группы, состоящей из S или T; или

(XXVI) (а) первый полипептид, содержащий тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:155, причем варибельная часть тяжелой цепи, специфически связывающаяся с CD137, отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:672 CDRH1 аминокислотной заменой не более чем одной аминокислоты, причем X1 выбирают из группы, состоящей из A или S, и/или которая отличается от SEQ ID №:335 CDRH2 аминокислотной заменой не более чем четырех аминокислот, причем X1 выбирают из группы, состоящей из N или Q, X2 выбирают из группы, состоящей из D или E, X3 выбирают из группы, состоящей из G или A, и X4 выбирают из группы, состоящей из T-или K, X5 выбирают из группы, состоящей из L или V, X6 выбирают из группы, состоящей из D или E, X7 выбирают из группы, состоящей из L или V, и X8 выбирают из группы, состоящей из S или G, и, причем указанный scFv представляет собой FAP-связывающий scFv, содержащий домен тяжелой цепи (VH) и домен легкой цепи (VL), причем указанный VH FAP отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:694 CDRH1 аминокислотной заменой не более чем одной аминокислоты, причем X1 выбирают из группы, состоящей из S или N, и/или который отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:342 CDRH2 аминокислотной заменой не более чем одной аминокислоты, причем X1 выбирают из группы, состоящей из D или E, и/или который отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:343 CDRH3 аминокислотной заменой не более чем одной аминокислоты, причем X1 выбирают из группы, состоящей из N или E; и

(б) второй полипептид, содержащий легкую цепь, который специфически связывается с CD137, содержащую аминокислотную последовательность

SEQ ID №:156, которая отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:336 CDRL1 аминокислотной заменой не более чем четырех аминокислот, причем X1 выбирают из группы, состоящей из K или R, X2 выбирают из группы, состоящей из D или S, X3 выбирают из группы, состоящей из V или I, X4 выбирают из группы, состоящей из S или T, и X5 выбирают из группы, состоящей из V и L, и/или которая отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:337 CDRL2 аминокислотной заменой не более чем пяти аминокислот, причем X1 выбирают из группы, состоящей из S или A, X2 выбирают из группы, состоящей из S или Y, X3 выбирают из группы, состоящей из S или Y, и, X4 выбирают из группы, состоящей из Y или Q, и X5 выбирают из группы, состоящей из S или T; или

(XXVI) (а) первый полипептид, содержащий тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце последовательность SEQ ID №:153, причем вариабельная часть тяжелой цепи, специфически связывающаяся с CD137, отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:338 CDRH2 аминокислотной заменой не более чем одной аминокислоты, причем X1 выбирают из группы, состоящей из Y или I, и причем указанный scFV представляет собой FAP-связывающий scFv, содержащий домен тяжелой цепи (VH) и домен легкой цепи, причем указанный VH FAP отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:341 CDRH2 аминокислотной заменой не более чем одной аминокислоты, причем X1 выбирают из D или E, и указанный VL FAP отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:691 CDRL1 аминокислотной заменой не более чем двух аминокислот, причем X1 выбирают из группы, состоящей из N, R, или S, и X2 выбирают из N или S, и

(б) второй полипептид, содержащий легкую цепь, которая специфически связывается с CD137, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:154, которая отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:669 CDRL1 аминокислотной заменой не более чем одной аминокислоты, причем X1 выбирают из группы, состоящей из N или Q, и/или отличается от SEQ ID №:339 CDRL2 аминокислотной заменой не более чем одной аминокислоты, причем X1 выбирают из группы, состоящей из L или G; или

(XXVIII) (а) первый полипептид, содержащий тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:153, причем вариабельная часть тяжелой цепи, специфически связывающаяся с CD137, отличается

5 аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:338 CDRH2 аминокислотной заменой не более чем одной аминокислоты, причем X1 выбирают из группы, состоящей из Y или I, и причем указанный scFv представляет собой FAP-связывающий scFv, содержащий домен тяжелой цепи (VH) и домен легкой цепи (VL), причем указанный VH FAP отличается

10 аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:341 CDRH2 аминокислотной заменой не более чем одной аминокислоты, причем X1 выбран из группы, состоящей из D или E, и указанный VL FAP отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:691 CDRL1 аминокислотной заменой не более чем двух аминокислот, причем X1 выбирают из группы,

15 состоящей из N, R, или S, и X2 выбирают из N или S; и

(б) второй полипептид, содержащий легкую цепь, которая специфически связывается с CD137, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:154, которая отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:669 CDRL1 аминокислотной заменой не более чем одной

20 аминокислоты, причем X1 выбирают из группы, состоящей из N или Q, и/или отличается аминокислотной последовательностью от SEQ ID №:339 CDRL2 аминокислотной заменой не более чем одной аминокислоты, причем X1 выбирают из группы, состоящей из L или G.

Таким образом, в дополнительном аспекте, изобретение обеспечивает

25 биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, причем

(I) каждый из полипептидов, способных специфически связываться с CD137, содержит

(а) вариабельный участок тяжелой цепи VH, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно

30 на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, или 100 % идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №:10, SEQ ID №:20, SEQ ID №:30, SEQ ID №:40, SEQ ID №:50, и SEQ ID №:60, и вариабельный участок легкой цепи VL, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 95 %, 96 %,

97 %, 98 %, 99 %, или 100 % идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №:15, SEQ ID №:25, SEQ ID №:35, SEQ ID №:45, SEQ ID №:55, SEQ ID №:65; или

(б) вариабельный участок тяжелой цепи VH, содержащий
5 аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, или 100 % идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №:70, SEQ ID №:80, SEQ ID №:90, и SEQ ID №:100, и вариабельный участок легкой цепи VL, содержащий аминокислотную последовательность, которая по
10 меньшей мере приблизительно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, или 100 % идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №:75, SEQ ID №:85, SEQ ID №:95, и SEQ ID №:105; и

(II) каждый из полипептидов, способных специфически связываться с FAP, содержит

(а) вариабельный участок тяжелой цепи VH, содержащий
15 аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, или 100 % идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №:106, SEQ ID №:115, и SEQ ID №:124, и вариабельный участок легкой цепи VL,
20 содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, или 100 % идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №:110, SEQ ID №:119, и SEQ ID №:128; или

(б) вариабельный участок тяжелой цепи VH, содержащий
25 аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, или 100 % идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №:133 и SEQ ID №:142, и вариабельный участок легкой цепи VL, содержащий
аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно
30 на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, или 100 % идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №:137 и SEQ ID №:146.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает молекулу нуклеиновой кислоты или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие

иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу в соответствии с изобретением, или вектор экспрессии или векторы экспрессии, содержащие такую молекулу нуклеиновой кислоты. Термин "вектор" или "вектор экспрессии" является синонимом термина "конструкт экспрессии" и относится к молекуле ДНК, которую применяют для введения и направления экспрессии специфического гена, с которым она функционально связана, в клетке-мишени. Термин включает в себя вектор в качестве самовоспроизводящейся структуры нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Вектор экспрессии в соответствии с настоящим изобретением содержит кассету экспрессии. Термин "кассета экспрессии" относится к полинуклеотиду, полученному рекомбинантным или синтетическим путем, с рядом определенных элементов нуклеиновой кислоты, которые обеспечивают транскрипцию конкретной нуклеиновой кислоты в клетке-мишени. Рекомбинантная кассета экспрессии может быть включена в плазмиду, хромосому, митохондриальную ДНК, пластидную ДНК, вирус, или фрагмент нуклеиновой кислоты. Обычно, часть рекомбинантной кассеты экспрессии вектора экспрессии включает в себя, среди других последовательностей, последовательность нуклеиновой кислоты, подлежащую транскрипции, и промотор. В некоторых вариантах осуществления, кассета экспрессии в соответствии с изобретением содержит полинуклеотидные последовательности, которые кодируют биспецифические антигенсвязывающие молекулы в соответствии с изобретением или их фрагменты; обычно несколько векторов экспрессии, кодирующие различные части (например, тяжелая цепь и легкая цепь кодируются в разных векторах экспрессии) иммуноглобулиноподобной связывающей молекулы в соответствии с изобретением, трансфицируются в одну и ту же клетку-хозяина в одно и то же время. Векторы экспрессии позволяют транскрипцию больших количеств стабильной мРНК. Как только вектор экспрессии оказывается внутри клетки-мишени, молекула рибонуклеиновой кислоты или белок, кодируемый геном, продуцируется механизмом клеточной транскрипции и/или трансляции. В одном варианте осуществления, вектор или векторы экспрессии в соответствии с изобретением содержат кассету или кассеты экспрессии, которые содержат полинуклеотидные последовательности, которые кодируют биспецифические антигенсвязывающие молекулы в соответствии с изобретением или их фрагменты.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает клетку-хозяина, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением в функциональной связи с последовательностью контроля экспрессии. Термины "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев," и "культура клеток-хозяев" применяют взаимозаменяемо, и они относятся к клеткам, в которые была введена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают в себя "трансформанты" и "трансформированные клетки", которые включают в себя первично трансформированную клетку и потомство, полученное из нее, независимо от количества пассажей. Потомство может не быть полностью идентичным родительской клетке по составу нуклеиновых кислот, но может содержать мутации. Под данное понятие подпадает мутантное потомство, которое обладает той же функцией или биологической активностью, что и отобранная путем скрининга или селекции изначально трансформированная клетка. Клетка-хозяин представляет собой любой тип клеточной системы, которая может применяться для получения биспецифических антигенсвязывающих молекул в соответствии с настоящим изобретением. Клетки-хозяева включают в себя культивируемые клетки, например, культивируемые клетки млекопитающих, такие как СНО-клетки (*клетки яичника китайского хомячка*), или клетки гибридомы, клетки дрожжей, клетки насекомых, и клетки растений, и это только некоторые из них, а также клетки, содержащиеся в трансгенных животных или тканях животных.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает способ получения связывающей молекулы в соответствии с изобретением, как описано в этой заявке выше, который включает стадии

- 25 (а) культивирования клетки-хозяина в соответствии с изобретением в условиях, обеспечивающих экспрессию молекулы; и,
(б) выделения молекулы.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу в соответствии с изобретением, предназначенную для применения в медицине.

30 Термин "рак", как его используют в этой заявке, относится к пролиферативным заболеваниям, таким как лимфомы, лимфоцитарные лейкозы, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (НМКРК), бронхиолоальвеолярный рак легкого, рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или

шей, меланома кожи или внутриглазная меланома, рак матки, рак яичников, рак прямой кишки, рак анальной области, рак кишечника, рак желудка, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак матки, карцинома фаллопиевых труб, карцинома эндометрия, карцинома шейки матки, карцинома влагалища, карцинома вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, саркома мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карцинома почек, карцинома почечной лоханки, мезотелиома, гепатоклеточный рак, билиарный рак, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), опухоли оси позвоночника, глиома ствола головного мозга, мультиформная глиобластома, астроцитомы, шваномы, эпендиомы, медуллобластомы, менингиомы, плоскоклеточные карциномы, аденома гипофиза и саркома Юинга, включая не поддающиеся лечению варианты любого из указанных выше типов рака, или к комбинации одного или нескольких из указанных выше типов рака. Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу в соответствии с изобретением, предназначенную для применения в терапии рака, предпочтительно колоректального рака (CRC) (например, колоректальной аденокарциномы), рака желудка (GC) (например, аденокарциномы желудка), рака поджелудочной железы (PAC) (например, аденокарциномы поджелудочной железы), и рака легкого (LC) (например, плоскоклеточной карциномы легкого, аденокарциномы легкого). Дополнительный аспект изобретения обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения, вместе с фармацевтически приемлемым носителем и необязательно одним или большим количеством дополнительных действующих веществ, например, химиотерапевтическим агентом, радиоактивным облучением и/или другими средствами, подлежащими применению при иммунотерапии рака.

В одном аспекте, обеспечена биспецифическая, иммуноглобулиноподобная связывающая молекула в соответствии с одним из вариантов осуществления, которые описаны, или фармацевтическая композиция, содержащая указанную иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу в соответствии с изобретением, предназначенную для применения для стимуляции Т-клеточного

ответа; для поддержания выживания и/или рекрутирования активированных Т-клеток; для предотвращения подавления и/или анергии иммунных клеток; для лечения инфекций, для лечения рака; для замедления прогрессирования рака; и/или для продления выживания пациента, страдающего на рак.

- 5 Дополнительный аспект изобретения обеспечивает способ лечения рака, который включает введение эффективного количества иммуноглобулиноподобной связывающей молекулы в соответствии с изобретением пациенту, который нуждается в этом.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

- 10 **ФИГ. 1А-Б:** А. Схематическое представление иммуноглобулиноподобной связывающей молекулы в соответствии с изобретением Doppelmaб. Б. Схема механизма действия CD137/FAP-связывающих молекул в строме опухоли, где агонистическая активность CD137 будет ограничена микроокружением, экспрессирующим FAP+ стромальные клетки.

- 15 **ФИГ. 2А-Б:** А. Связывание антител против CD137 человека с экспрессированными на поверхности CD137 яванского макака: Репрезентативные клоны CD137 #B13, B17, B19, B20, B21, B27, B28, B30, и B31, выражены в виде средней интенсивности флуоресценции в зависимости от повышения концентрации антитела (нМ); Б. Связывание антител против
- 20 **CD137 человека с экспрессированными на поверхности CD137 человека**
Репрезентативные клоны CD137 #B13, B17, B19, B20, B21, B27, B28, B30, B31, выраженные в виде средней интенсивности флуоресценции в зависимости от повышения концентрации антитела (нМ).

- ФИГ. 3А-Г:** Зависимая от сшивания активность молекул CD137
- 25 А. Кривая EC₅₀ агонистической активации очищенного химерного IgG против CD137 с сшиванием вторичного антитела (CL+) и без сшивания вторичного антитела (CL-). Репрезентативные клоны CD137#A16, A17, A18, A19, A20, A21, A49, A51, A50, A53, A54, и A57. Б. Гистограммы агонистической активации очищенного химерного IgG против CD137 с вторичным антителом (+) и без
- 30 вторичного антитела (-). (В) При этом активность во время анализа клеток Jurkat NFκB, измеренная в виде RLU (*Relative Light Units* - относительные световые единицы), демонстрирует агонистическую активность только с сшиванием вторичного антитела. Положительными контролями являются урелумаб, химерный IgG1-КО, и утомилумаб, IgG1-КО. Репрезентативные

клоны против CD137 включают в себя #B2, B5, B7, B9, B10, B12, B13, B17, B19, B27, B30, B31, A1, A13, A2, A25, A3, A30, A39, A4, A47, B3, B4, B21, A12, A16, A17, A19, A26, A27, A41, A44, A45, A46, A49, A57, A8, A34, и A35. С. При этом активность во время анализа клеток Jurkat NFκB, измеренная в виде RLU, демонстрирует агонистическую активность только без сшивания вторичного антитела.

ФИГ. 4А-Б: А Схема 2D-исследования, где связанные с CD137 Fab-фрагменты инкубируют в присутствии биотинилированного антигена huCD137, и связанный биотинилированный антиген выявляют с помощью меченого флуорохромом стрептавидина. **Б.** Титрования с помощью ИФА (иммуоферментный анализ, *англ.: ELISA*) привитого Fab по сравнению с химерным Fab-фрагментом B21. Различные привитые препараты оценивали во время исследования связывания с помощью ИФА, и при этом химерный Fab продемонстрировал лучшее связывание по сравнению с привитым Fab. Неродственный Fab-фрагмент 2H11 сохраняли в качестве отрицательного контроля.

ФИГ. 5: ИФА оптимизированных по верхнему каркасному участку Fab-фрагментов клонов CD137. Fab-фрагменты, выявленные на основе связывания во время исследований ИФА, оценивали на предмет связывания по сравнению с химерным Fab-фрагментом клона B21 CD137. Показан анализ связывания Fab-фрагментов с CD137 человека для 22 молекул-кандидатов из библиотеки комбинаций VK/VH; включая B21. V55, V49, V51, V69, V47, V61, V72, V48, V56, V75, V54, V50, V71, V53, V70, V63, V74, V52, V62, и V61 расположены по сравнению с родительской молекулой родительского B21.

ФИГ. 6А-Б: А. Анализ связывания постмутационной модификации кандидатов против CD137 участков Vk-CDR. Каждый столбик представляет положение аминокислотной модификации в варибельной легкой цепи. **Б. Анализ связывания постмутационной модификации кандидатов против CD137 участков VH-CDR.** Каждый столбик представляет положение аминокислотной модификации в варибельной тяжелой цепи и соответствующую OD (*оптическую плотность*).

ФИГ. 7. ИФА результаты, сравнивающие связывание Fab-фрагментов против CD137, включающих комбинации аминокислотных модификаций Vk и VH. Fab-фрагменты, которые были выявлены на основе первичных

исследований ИФА связывания, затем оценивали на предмет связывания по сравнению с химерным родительским Fab-фрагментом химерного B21. Анализ связывания Fab-фрагментов с CD137 человека показан для 15 положительных связывающих молекул из библиотеки комбинаций VK/VH, включая V68, V73, V74, V14, V18, V64, V15, V17, V16, V67, V75, V66, V62, V71, и V72, расположенные по сравнению с химерным родительским Fab-фрагментом родительского B21.

ФИГ. 8А-Б. А. Зависимая от сшивания активность оптимизированных кандидатов против CD137 после оптимизации Vk и VH. А и

10 **Б:** Агонистическая активация без сшивания вторичного антитела (**А**) и с сшиванием вторичного антитела (**Б**), измеренная посредством NFκB-активности во время анализа на клетках Jurkat, выраженная в виде RLU. Репрезентативные клоны CD137: B21.V1-V.40, и A49.V41-V.48, по сравнению с родительскими клонами.

15 **ФИГ. 9. Данные картирования эпитопов кандидатов связывания с анти-CD137.** Антитела к CD137 были способны связываться с полноразмерным CD137 человека, который экспрессирует линия клеток Jurkat, но связывание было потеряно, когда различные CDR человека (huCD137) систематически заменяли мышинными (mCRD1, mCRD2, mCRD3, и mCRD4). Каждый вариант
20 клона CD137 отмечен на панели слева. Связывание эпитопа графически изображено в виде шкалы градиентов (как показано справа), где “черный цвет” = + связывание и “белый цвет” = отсутствие связывания.

ФИГ. 10А-Б. Влияние CD137-связывающих молекул на препятствование активации CD137 человека, экспрессируемого клетками Jurkat, индуцируемой
25 клетками, экспрессирующими лиганд CD137. (**А**) Различные CD137-связывающие молекулы дифференцированно влияют на активацию клеток Jurkat, экспрессирующих CD137 человека в присутствии 293 клеток, экспрессирующих лиганд CD137 человека. В то время как BMSAB, PfizerAb и молекула компании Roche split-trimeric-4-1BBL (71-248)/FAP(28H1) (“конструкт 2.11”; смотри
30 WO 2017/194438) препятствуют активации клеток Jurkat, индуцируемой лигандом CD137, вариант B21 CD137 обеспечивает связывание лиганда CD137 и продуктивную активацию Т-клеток, индуцируемую лигандом CD137.

(Б) Титрование дозы варианта B21 CD137 и молекулы конструкта 2.11 в более широком диапазоне в системе анализа, описанной в (А). Вариант B21 CD137,

при тестировании до 100 нМ, не блокирует функциональное взаимодействие между CD137 человека и лигандом CD137 человека.

ФИГ. 11А-В. А. Титры сывороток разных антител против FAP человека, полученных из OminChicken®, демонстрирующие кросс-реактивность к FAP человека, мыши и яванского макака, измеренную с помощью ИФА. **Б.** MFI (*mean fluorescence intensity: средняя интенсивность флуоресценции*) связывания антител против FAP со стабильными клеточными линиями, экспрессирующими FAP человека (HT1080-FAP), по сравнению с клетками дикого типа (ДТ) дикого типа HT1080. Репрезентативные клоны # D6, E11, G3, H12, H3, A9, C12, C3, C8, D2, E1, E11.2, и H9. **В.** MFI связывания антител против FAP со стабильными клеточными линиями, экспрессирующими FAP мыши (B16-FAP), по сравнению с клетками дикого типа дикого типа B16. Репрезентативные клоны # D6, E11, G3, H12, H3, A9, C12, C3, C8, D2, E1, E11.2, и H9.

ФИГ. 12 А-В. Влияние биспецифических в отношении CD137 (4-1BB, TNFRSF9)/ белка активации фибробластов (FAP) молекул на активацию клеток. **А.** Клетки FAP+ HT1080 и клетки FAP-ve HT1080 инкубировали на протяжении 24 часов вместе с биспецифической в отношении CD137/FAP молекулой; по сравнению с **Б.** одним только урелумабом, одновалентным антителом против CD137 (4-1BB, TNFRSF9); или **В.** одним только утомилумабом, одновалентным антителом против CD137 (4-1BB, TNFRSF9).

ФИГ. 13А-Г А. Варианты B21 CD137, совместно культивированные с клетками HT1080, экспрессирующими FAP. Зависимая от NF-κB индукция репортерного гена люциферазы в клетках Jurkat-CD137, при совместном культивировании с клетками HT1080-FAP (А, В) или клетками дикого типа HT1080 (Б, Г). Уровни активности репортерного гена коррелируют с вариантами репрезентативных клонов, включая: B21.V16 (CD137#2)/ FAP#5, B21.V22 (CD137 #3)/FAP #3, B21.V37 (CD137#6)/FAP #3, B21.V16 (CD137 #2)/FAP #2, B21.V22 (CD137 #4)/ FAP#3, B21.V25 (CD135#5)/ FAP#3, B21.V22 (CD137#4)/ FAP#2, B21.V25 (CD137#5)/ FAP#2, B21.V22 CD137#3/ FAP#2, B21.V25 (CD137 #4)/ FAP#5, B21.V22 (CD137 #3)/ FAP#5, B21.V37 (CD137 #6)/ FAP#2, B21.V29 (CD137#5)/ FAP#5, и B21.V37 (CD137#6)/ FAP#5. **Б. Варианты B21 CD137, которые показаны на (А), с клетками дикого типа HT1080.** **В. Варианты A49 CD137, совместно культивированные с клетками HT1080, экспрессирующими FAP.** Варианты репрезентативных клонов включают в себя:

A49.V48 (CD137#7)/ FAP#3, A49.V47 (CD137 #9)/FAP #3, A49.V43 (CD137#8)/FAP #3, A49.V48 (CD137 #7)/FAP #5, A49.V48 (CD137 #7)/FAP #2, A49.V47 (CD137 #9)/ FAP#5, A49.V47 (CD135#9)/ FAP#2, A49.V43 (CD137#8)/ FAP#2, и A49.V43 (CD137#8)/ FAP#5. **Г. Варианты А49 CD137, как показано на (В), с клетками дикого типа НТ1080.**

ФИГ. 14А-З. Продуцирование IFN-γ в присутствии РВМС, варианты CD137/FAP: А. Стимулированные анти-CD3 клетки РВМС (*peripheral blood mononuclear cell* - мононуклеарные клетки периферической крови), совместно культивированные с клетками НТ1080, экспрессирующими FAP, продуцируют повышенный уровень IFN-γ в результате CD137 костимуляции. Варианты репрезентативных клонов включают в себя B21.V16 (CD137#2)/ FAP#5, B21.V16 (CD137 #2)/FAP #2, B21.V16 (CD137 #2)/FAP #3; **Б.** Варианты репрезентативных клонов включают в себя B21.V22 (CD137 #3)/ FAP #5, B21.V22 CD137 #3/ FAP #2, B21.V22 (CD137 #3)/FAP #3; **В.** Варианты репрезентативных клонов включают в себя B21.V25 (CD137 #4)/ FAP#5, B21.V22 (CD137#4)/ FAP#2, B21.V22 (CD137 #4)/ FAP#3; **Г.** Варианты репрезентативных клонов включают в себя B21.V29 (CD137#5)/ FAP#5, B21.V25 (CD137#5)/ FAP#2, B21.V25 (CD135#5)/ FAP#3; **Д.** Варианты репрезентативных клонов включают в себя B21.V37 (CD137#6)/ FAP#5, B21.V37 (CD137 #6)/ FAP#2, B21.V37 (CD137#6)/FAP #3; **Е.** Варианты репрезентативных клонов включают в себя A49.V43 (CD137#8)/ FAP#5, A49.V43 (CD137#8)/ FAP#2, A49.V43 (CD137#8)/FAP #3; **Ж.** Варианты репрезентативных клонов включают в себя A49.V47 (CD137 #9)/ FAP#5, A49.V47 (CD135#9)/ FAP#2, A49.V47 (CD137 #9)/FAP #3; **З.** Варианты репрезентативных клонов включают в себя A49.V48 (CD137 #7)/FAP #5, A49.V48 (CD137 #7)/FAP #2, A49.V48 (CD137#7)/ FAP#3.

ФИГ. 15А-Б. Секреция IFN-γ отдельными донорскими РВМС, инкубированными с повышающимися концентрациями примерной биспецифической молекулы B21 CD137/FAP в присутствии клеток НТ1080 дикого типа **(А)** или клеток НТ1080, экспрессирующих FAP **(Б)**.

ФИГ. 16А-Б. А. Ферментный анализ FAP: Примерные молекулы в соответствии с изобретением, CD137-B21/FAP-С3 человека и CD137-B21/FAP-A11 мыши, не влияют на ферментативную активность белка FAP. **Б. Анализ**

ингибирования мезилата талабостата: Положительный контроль ингибирования FAP.

ФИГ. 17. Схематическое представление схемы применения молекул на подкожной сингенной модели колоректального рака MC38 у мышей CD137 KI HuGEMM™.

ФИГ. 18А-Г. In vivo эффективность монотерапии B21 CD137 /C3 FAP человека и B21 CD137/A11 FAP мыши на подкожной сингенной модели колоректального рака MC38 у мыши CD137 KI HuGEMM. (А) Кривая среднего роста опухоли после лечения B21 CD137/C3 FAP человека; (Б) Кривая отдельного роста опухоли после лечения B21 CD137/C3 FAP человека; (В) Кривая среднего роста опухоли после лечения B21 CD137/A11 FAP мыши; и (Г) Кривая отдельного роста опухоли после лечения B21 CD137/A11 FAP мыши.

ФИГ. 19А-Б. Рекрутирование TIL молекулами CD137/FAP: Связывающие молекулы B21 CD137/C3 FAP человека и B21 CD137/A11 FAP мыши в соответствии с изобретением способны индуцировать увеличение CD3+ Т-клеточных инфильтратов (А) или CD8+ Т-клеточных инфильтратов (Б) в микроокружении опухоли при сравнении с контрольной группой.

ФИГ. 20А-Д. Комбинированное лечение PD-1 и CD137/FAP
А. Схематическое представление мышинной модели и схемы применения CD137/FAP и PD-1. **Б.** Связывающие молекулы в соответствии с изобретением способны индуцировать уменьшения объема опухоли в комбинации с mAb-антагонистом PD-1 при сравнении с контрольной группой, и при этом эффект зависит от дозы. **(Б), (Г)** показывают комбинированную терапию антителом к PD-1 мыши и B21 CD137/C3 FAP человека; или **(В), (Д)** показывают комбинированную терапию PD-1 мыши и мышинным B21 CD137/A11 FAP. Оба привели к сильному и статистически значимому ($p < 0,0001$) подавлению роста опухоли, как продемонстрировано уменьшением объема опухоли.

ФИГ. 21А-Ж. Связывающие молекулы в соответствии с изобретением способны индуцировать как CD4, так и CD8 Т-клеточную инфильтрацию при комбинировании с агонистом PD-1, по сравнению с контрольными группами. (А) Площадь жизнеспособной опухоли, измеренная после лечения одним только растворителем, одним только анти-PD-1, одним только huB21 CD137/FAP-C3, или комбинацией huB21 CD137/FAP-C3 + PD-1. (Б) Плотность клеток CD4+, измеренная в области жизнеспособной опухоли после лечения

одним только растворителем, одним только анти-PD-1, одним только huB21 CD137 /FAP-C3, или комбинацией huB21 CD137/FAP-C3 + PD-1. (В) Плотность клеток CD8+, измеренная в области жизнеспособной опухоли после лечения одним только растворителем, одним только анти-PD-1, одним только huB21 CD137 /FAP-C3, или комбинацией huB21 CD137/FAP-C3 + PD-1. (Г) Площадь жизнеспособной опухоли представлена в виде зависимости от плотности CD8+ Т-клеток при лечении одним только растворителем. (Д) Площадь жизнеспособной опухоли представлена в виде зависимости от плотности CD8+ Т-клеток при лечении одним только анти-PD-1. (Е) Площадь жизнеспособной опухоли представлена в виде зависимости от плотности CD8+ Т-клеток при лечении одним только huCD137-B21/FAP-C3. (Ж) Площадь жизнеспособной опухоли представлена в виде зависимости от плотности CD8+ Т-клеток при лечении huCD137-B21/FAP-C3 в комбинации с анти-PD-1. Данные также демонстрирует, что увеличение инфильтрации CD8+ Т-клеток положительно коррелирует с потерей площади жизнеспособной опухоли

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

CD137 широко экспрессируется во всех гемопоэтических и негемопоэтических компартментах: активированные Т-клетки, Т-регуляторные клетки, НК-клетки, дендритные клетки, активированные моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки, активированные В-клетки, клетки Рида-Штенберга и стенки кровеносных сосудов (на эндотелиальном слое и гладкомышечных клетках сосудов), и т.д. Как показано в доклинических исследованиях, в клинических испытаниях урелумаба, эффективного моноспецифического агонистического антитела к CD137, сообщалось о серьезной гепатотоксичности, включая летальный исход. Считается, что как высокая аффинность с CD137, так и гиперкластеризация посредством FcγR на находящихся в печени Т-клетках способствует опосредованной урелумабом гепатотоксичности.

Связывающие молекулы CD137/FAP в соответствии с изобретением сконструированы таким образом, чтобы для своей активности иметь более низкую аффинность связывания с CD137, LALA-мутацию для снижения связывания FcγR и требование одновременного связывания с CD137 и специфичным в отношении стромы опухоли FAP. FAP (белок активации фибробластов) представляет собой якорную мишень. FAP экспрессируется только на активированных фибробластных клетках, которые расположены в

строме опухоли. Следовательно, FAP-биспецифическая молекула будет функционировать только для стимулирования активации Т-клеток и уничтожения раковых клеток, которые находятся в близком физическом контакте с активированным фибробластом. Опухолевые клетки, которые не находятся в непосредственном контакте с активированным фибробластом, не будут затронуты данным лечением и будут продолжать пролиферировать. Следовательно, использование FAP в качестве якорной мишени для опосредования индуцированной рецептором CD137 активации и инфильтрации Т-клеток имеет явные преимущества только в месте опухоли.

10 Изобретатели обнаружили совместно локализованную экспрессию CD137 и FAP в опухоли. Изобретатели исследуют распространенность совместно локализованной экспрессии в большом подмножестве колоректального рака (CRC), рака желудка (GC), и рака поджелудочной железы (PAC). Постоянная высокая распространенность была показана в случае экспрессии CD137 (88-15 100 %), а также в случае экспрессии FAP (87-100 %) в CRC. В случае GC, CD137 также был продемонстрирован в 56-90 % всех случаев, в значительной степени с более высокой частотой в случае кишечных типов, по сравнению с диффузными типами, в то время как было показано, что FAP конститутивно экспрессируется на высоких уровнях в первичных и метастатических карциномах желудка. В 20 случае PAC, экспрессия CD137 может быть продемонстрирована в 50-82 % всех случаев и экспрессия FAP может быть продемонстрирована в 81 % случаев.

Таким образом, CD137 и FAP показывают совместно локализованную экспрессию в целом ряде опухолей, с незначительной коэкспрессией или без коэкспрессии в нераковых клетках. Примечательно, что FAP не обнаруживался в 25 нормальной ткани печени или гепатоцитах с заявленной чувствительностью к активации CD137.

Терминам, не определенным здесь конкретно, следует придавать значения, которые им придавал бы специалист в данной области в свете раскрытия и контекста. Однако, как их используют в данном описании, если не указано иное, 30 следующие термины имеют указанное значение, и соблюдаются следующие правила.

Первый аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, имеющую по меньшей мере один сайт связывания антигена, который специфически связывается с CD137 (4-1BB, TNFRSF9),

причем сайт связывания антигена, который специфически связывается с CD137 (рецептор лиганда 4-1BB), является частью молекулы иммуноглобулина (Ig), и по меньшей мере один сайт связывания антигена, который специфически связывается с белком активации фибробластов (FAP), причем сайт связывания антигена, который специфически связываются с белком активации фибробластов (FAP), содержит scFv. Каждый белок и связанные с ним гены известны в данной области и также представлены в биологических базах данных.

“CD137 (4-1BB, TNFRSF9) человека” определяется как белок, представленный в NCBI: NP_001552 и Uniprot: Q07011, (SEQ ID № 1), и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая этот белок. Аминокислоты, определяющие различные участки CRD внеклеточного домена (ECD) определены в Таблице 1 ниже. Аминокислотные последовательности человеческого белка –Fc- His с меткой для CD137 человека и CD137 яванского макака, которые применяют в качестве иммуногенов в кампании иммунизации, включены в Таблицу 1, соответствующие SEQ ID №№: 335 и 343. “CD137 (4-1BB, TNFRSF9 яванского макака)” определяется как белок, представленный в Uniprot под регистрационным № F6W5G6 (SEQ ID №: 2), и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая этот белок. “CD137 (4-1BB, TNFRSF9) мыши” определяется как белок, представленный в Uniprot под регистрационным № P20334 (SEQ ID №:3), и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая этот белок.

Таблица 1.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ АНТИГЕНОВ			
SEQ ID №:1	ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ 4-1BB (CD137)	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRT RKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGT NDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPP APAREPGHSPQ	UniProt: Q07011
SEQ ID №:349	человеческий белок – Fc- His ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО 4-1BB (CD137)	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRT RKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGT FNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPP APAREPGHSPQENLYFQGGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGKAGSGHHHHHH	Применяемый для иммунизации
SEQ ID №:350	ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ 4-1BB CRD1	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC	Аминокислоты 24-45
SEQ ID №:351	ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ 4-1BB CRD2	SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAEC	Аминокислоты 46-86
SEQ ID №:352	ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ 4-1BB CRD3	DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCK	Аминокислоты 87-118
SEQ ID №:353	ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ 4-1BB CRD 4	DCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCG	Аминокислоты 119-159
SEQ ID №:354	ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ 4-1BB CRD 1-3	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRT RKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCK	Аминокислоты 24-118
SEQ ID №:355	ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ 4-1BB CRD 1-2	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRT RKECSSTSNAEC	Аминокислоты 24-86
SEQ ID №:356	ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ 4-1BB CRD 2-3	SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGA GCSMCEQDCKQGQELTKKGCK	Аминокислоты 46-118
SEQ ID №:357	ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ 4-1BB CRD 3-4	DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCK KCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCG	Аминокислоты 88-159
SEQ ID №:358	ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ 4-1BB CRD2/CRD3/CRD4	SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGA GCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSV LVNGTKERDVVCG	Аминокислоты 46-159
SEQ ID №:2	4-1BB ЯВАНСКОГО МАКАКА	LQDLCSN CPAGTFCDNN RSQICSPCPP NSFSSAGGQR TCDICRQCKG VFKTRKECSS TSNAECD CIS GYHCLGAEC S MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG	Uniprot: F6W5G6

		TKERDVVCGP SPADLSPGAS SATPPAPARE PGHSPQ	
SEQ ID №:359	белок Fc-His 4-1BB ЯВАНСКОГО МАКАКА	QDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFKTR KECSSTSNAECDICISGYHCLGAECMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTF NDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSATPP APAREPGHSPQENLYFQGGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVM HEALHNHYTQKLSLSPGKAGSGHHHHHH	Применяемый для иммунизации
SEQ ID №:3	МЫШИНЫЙ 4-1BB	VQNSCDNCQPGTFCRKYNPVCSCPPSTFSSIGGQPNCNICRVCAGYFRFK KFCSSSTHNAECECIEGFHCLGPQCTRCEKDCRPGQELTKQGCKTCSLGTFN DQNGTGVCRPWTNCSLDGRSVLKTGTTEKD VVCGPPVVSFSPSTTISVTPE GGPGGHS LQVL	Uniprot:P20334
SEQ ID №:360	МЫШИНЫЙ 4-1BB CRD1	LQDPCDNCQPGTFCRKYNPVC	
SEQ ID №:361	МЫШИНЫЙ 4-1BB CRD2	SPCPPSTFSSIGGQPNCNICRVCAGYFRFKKFCSSSTHNAEC	
SEQ ID №: 362	МЫШИНЫЙ 4-1BB CRD3	DCIEGFHCLGPQCTRCEKDCRPGQELTKQGCK	
SEQ ID №: 363	МЫШИНЫЙ 4-1BB CRD4	DCSLGTFN DQNGTGVCRPWTNCSLDGRSVLKTGTTEKD VVCG	
SEQ ID №:4	ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ FAP	MKTWVKIVFGVATS AVLALLVMCIVLRPSRVHNSEENTMRALTLKDILNG TFSYKTFPPNWISGQEYLHQ SADNNIVLYNIETGQSYTILSNRTMKSVNASN YGLSPDRQFVYLEDYSKLRYSYATYIYDLSNGEFVRGNELPRPIQYL CWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITFNGRENKIFNGIPDWVYEEE MLATKYALWVSPNGKFLAYAEFNDDIPVIAYSYYGDEQYPR TINIPYPKA GAKNPVVRIFIIDTTYPAYVGPQEVVPAMIASSDY YFSWLTWVTDERVCL QWLKRVQNVSVLSICDFREDWQ TWDCPKTQEHIEESRTGWAGGFFVSTPV FSYDAISYKIFSDKDGYKHIHYIKDTVENAIQEGOGKWEAINIFRVTQDSL FYSSNEFEEYPGRRNIYRISIGSYPPSKKCVTCHLRKER CQYYTASFSDYAK YYALVCYGGPISTLHDGR TDQEIKILEENKELENALKNIQLPKEEIKKLEV DEITLWYKMILPPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQS VRSVFAVNWISYLASK EGMVIALVDGRGTA FQGDKLLYAVYRKLGVYEVEDQITAVRKFIEMGFID EKRIAIWGW SYGGYVSSLALASGTGLFKCGIAVAPVSSWEYYASVYTERF MGLPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNSAQI AKALVNAQVDFQAMWYSDQNHGLSGLSTNHL YTHMTHFLKQCFSLSD	NCBI: NP_004451 и Uniprot: Q12884
SEQ ID №:5	МЫШИНЫЙ FAP	MKTWLKTVFGVTTLAALALVVICIVLRPSRGNTKRALTLKDILNGTFSYKT YFPNWISEQEYLHQSEDDNIVFYNIETRESYIILSNSTMKSVNATDYGLSPD	NCBI: NP_032012.1 и UniProt P97321

		RQFVYLESKLRWYSYTATYYIYDLQNGEFVIRGYELPRPIQYLCWSPV GSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITYTGRENRIENGIPDWVYEEEMLATK YALWVSPDGKFLAYVEFNDSDIPIIAYSYYGDGQYPRITINIPYKAGAKNP VVRVFIVDTTYPHHVGPMEVPVPEMIASSDYYFSWLTWVSSERVCLQWLK RVQNVSVLSICDFREDWHAWECPKNQEHVEESRTGWAGGFFVSTPAFSQD ATSYYKIFSDKDGKHIHYIKDTVENAIQEQOGKWEAIYIFRVTQDSLFISS NEFEGYPGRRNIYRISIGNSPPSKKCVTCHLRKERQYYTASFSYKAKYYA LVCYGPLPISTLHDGRDQEIQVLEENKELENSLRNIQLPKVEIKKLDGG LTFWYKMLPPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSVKSVFAVNWITYLASKEG IVIALVDGRGTAFAQGDKFLHAVYRKLGVYEVEDQLTAVRKFIEMGFIDEER IAIWGWSYGGYVSSLALASGTGLFKCGIAPVSSWEYYASIYSERFMGLP TKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNSAQIAKAL VNAQVDFQAMWYSDQNHGISSGRSQNHLYTHMTHFLKQCFSLSD	
--	--	--	--

“Белок активации фибробластов (FAP) человека” определяется как белок, представленный в NCBI: NP_004451 и Uniprot: Q12884 (SEQ ID №:4), и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая указанный белок. Термин "Белок активации фибробластов (FAP)", также известен как пропил эндопептидаза FAP или сепсаза (EC 3.4.21). В одном варианте осуществления, антигенсвязывающая молекула в соответствии с изобретением способна специфически связываться с человеческим, мышинным FAP и/или FAP яванского макака. Внеклеточный домен (ECD) человеческого FAP простирается от положения аминокислоты 26 до 760. Аминокислотная последовательность мышинного FAP показана в UniProt под регистрационным № P97321 (SEQ ID №:4), или NCBI RefSeq NP_032012.1. Внеклеточный домен (ECD) мышинного FAP простирается от положения аминокислоты 26 до 761. Предпочтительно, анти-FAP-связывающая молекула в соответствии с изобретением связывается с внеклеточным доменом FAP.

Настоящее изобретение относится к связывающим молекулам, которые обладают специфичностью связывания по меньшей мере в отношении двух разных сайтов. Что касается настоящего изобретения, иммуноглобулиноподобные связывающие молекулы получают из антител. Методы получения связывающих молекул включают, но не ограничиваются ими, рекомбинантную коэкспрессию двух пар тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина, имеющих разные специфичности (смотри Milstein и Cuello, Nature 305: 537 (1983)), WO 93/08829, и Traunecker и др. EMBO J. 10: 3655 (1991)), а также конструирование "knob-in-hole" ("*выступы во впадины*") (смотри, например, US 5 731 168). Иммуноглобулиноподобные связывающие молекулы в соответствии с изобретением также могут быть получены посредством конструирования с использованием эффекта электростатического взаимодействия для получения Fc-гетеродимерных молекул антитела (WO 2009/089004A1); сшивания двух или большего количества антител или фрагментов (смотри, например, патент США № 4 676 980, и Brennan и др. Science, 229: 81 (1985)); применения лейциновых застежек-й для получения биспецифических антител (смотри, например, Kostelny и др., Immunol. 148(5): 1547-1553 (1992)); применения технологии "диатело" для получения фрагментов биспецифических антител (смотри, например, Hollinger и др. PNAS. USA, 90:6444- 6448 (1993)); а также применения одноцепочечных димеров Fv (sFV)

(смотри, например, Gruber и др., J. Immunol. 152:5368 (1994)); и посредством получения триспецифических антител, которые описаны, например, в Tutt и др., J. Immunol. 147: 60 (1991).

Как его используют в этой заявке термин “сайт связывания антигена”
5 содержит переменный домен тяжелой цепи (V_H) и переменный домен легкой цепи (V_L), полученные из антитела. Термин “переменный участок” или “переменный домен” относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антигенсвязывающей молекулы с антигеном. Переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L соответственно)
10 нативного антитела, как правило, имеют подобные структуры, где каждый домен при этом содержит четыре консервативных каркасных участка (FR) и три гиперпеременных участка. В таком случае, каждый переменный домен V_H и V_L содержит три определяющие комплементарность участка (CDR), которые составляют гиперпеременные участки или петли. Как правило, нативные
15 четырехцепочечные антитела содержат шесть гиперпеременных участков, три в V_H (H1, H2, H3) и три в V_L (L1, L2, L3). Одного домена V_H или V_L может быть достаточно для обеспечения антигенсвязывающей специфичности. В одном аспекте, сайт связывания антигена в соответствии с настоящим изобретением или определенные части белка, как правило, получают из антитела. Обобщенная
20 структура антител или молекул иммуноглобулина хорошо известна специалистам в данной области.

Термин “антигенсвязывающая молекула” или “антигенсвязывающий полипептид” в своем наиболее широком смысле относится к молекуле, которая специфически связывается с антигенной детерминантой. Примерами
25 антигенсвязывающих молекул или полипептидов являются антитела и фрагменты антител.

“Антитела” или “молекулы иммуноглобулинов” (также известные как иммуноглобулины, сокращенно Ig) представляют собой белки гамма-глобулинов, которые могут обнаруживаться в крови или другие жидкостях
30 организма позвоночных, и которые используются иммунной системой для выявления и нейтрализации инородных объектов, таких как бактерии и вирусы. Обычно они состоят из основных структурных единиц - каждый с двумя большими тяжелыми цепями и двумя меньшими легкими цепями - образуя, например, мономеры с одной единицей, димеры с двумя единицами или

пентамеры с пятью единицами. Антитела могут связываться, посредством нековалентного взаимодействия, с другими молекулами или структурами, известными как антигены. Указанное связывание является специфичным в том смысле, что антитело будет связываться только со специфичной структурой, с 5 высокой аффинностью. Уникальная часть антигена, распознаваемая антителом, называется эпитопом, или антигенной детерминантой. Часть антитела, связывающуюся с эпитопом, иногда называют паратопом, и она находится в так называемом переменном домене, или в переменном участке (Fv) антитела. 10 Переменный домен содержит три так называемых определяющих комплементарности участка (CDR), разделенных каркасными участками (FR). “Имуноглобулиноподобные связывающие молекулы” имеют антигенсвязывающие характеристики, сходные таковыми молекул иммуноглобулина, и используют ту же функциональную стратегию молекулы антитела, то есть они способны специфически связываться с антигеном и имеют 15 по меньшей мере один антигенсвязывающий участок. Однако, иммуноглобулиноподобные молекулы не ограничиваются теми структурами и последовательностями, которые встречаются в природе.

Термин “биспецифический” означает, что антигенсвязывающая молекула способна специфически связываться по меньшей мере с двумя различными 20 антигенными детерминантами. Термин “валентный” относится к наличию определенного количества сайтов связывания, специфичных для одной отдельной антигенной детерминанты в антигенсвязывающей молекуле для одной отдельной антигенной детерминанты. Таким образом, термин “двухвалентный” обозначает наличие двух сайтов связывания, специфичных для определенной 25 антигенной детерминанты в антигенсвязывающей молекуле, соответственно. В определенных аспектах изобретения, биспецифические антигенсвязывающие молекулы также являются двухвалентными для каждой антигенной детерминанты, что означает в этом контексте то, что они имеют два сайта связывания, специфичные в отношении CD137, и два сайта связывания, 30 специфичные в отношении FAP.

Термины "определяющий комплементарность участок" и "CDR" известны в данной области как такие, которые относятся к несмежным последовательностям аминокислот в переменных участках антител, которые обеспечивают антигенную специфичность и аффинность связывания. Как правило, существуют

три (3) CDR в каждом переменном участке тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три (3) CDR в каждом переменном участке легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3).

5 Границы аминокислотной последовательности конкретного CDR могут
 10 быть определены посредством применения любой из ряда известных схем,
 включая схемы, которые описаны у Kabat и др. (1991), "Sequences of Proteins of
 Immunological Interest", 5-е изд. Public Health Service, National Institutes of
 Health, Bethesda, Md. (схема нумерации "Kabat"), Al-Lazikani и др. (1997) JMB
 273, 927-948 (схема нумерации "Chothia"), MacCallum и др. J. Mol. Biol. 262:732-
 15 745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site
 topography", J. Mol. Biol. 262, 732-745." (схема нумерации "Contact"),
 Lefranc M.P. и др. "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor
 variable domains and Ig superfamily V-like domains" Dev Comp Immunol, январь
 2003; 27(1):55-77 (схема нумерации "IMGT" или "CCG"), и Honegger A. и
 20 Pltickthun A., "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:
 an automatic modeling and analysis tool", J Mol Biol, 8 янв. 2001 г.; 309(3):657-70,

Границы конкретного CDR могут варьироваться в зависимости от
 указанного правила. Положения аминокислот, присвоенные CDR и FR,
 например, могут определяться в соответствии с системой нумерации, причем
 20 конкретные аминокислоты переменных участков антител в соответствии с
 изобретением нумеруются в последовательности, начиная с N-конца в качестве
 аминокислоты "1" молекулы, и заканчивая C-концом молекулы, и где границы
 CDR определяются приведенной ниже нумерацией аминокислот:

Таблица 2А: CDR 1-3 VH/VL CD137 #1-6

VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3
КАВАТ	31-35	50-66	99-108
СНОТНІА	26-32	52-57	100-107
ССG	26-35	50-66	97-108
IMGT	24-33	51-58	97-108
VL	LCDR1	LCDR2	LCDR3
КАВАТ	24-34	50-56	89-97
СНОТНІА	24-34	50-56	89-97

CCG	24-34	50-56	89-97
IMGT	27-32	50-52	89-97

Таблица 2Б: CDR 1-3 VH/VL CD137 #7-10

VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3
КАВАТ	31-35	50-65	98-107
СНОТНІА	26-32	52-56	99-106
ССГ	26-35	50-65	98-107
IMGT	26-33	51-57	96-107
VL	LCDR1	LCDR2	LCDR3
КАВАТ	24-39	55-61	94-102
СНОТНІА	24-39	55-61	94-102
ССГ	24-39	55-61	94-102
IMGT	27-37	55-57	94-102

Таблица 2В: CDR 1-3 VH/VL FAP #1-3

VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3
КАВАТ	31-35	50-65	98-106
СНОТНІА	26-32	52-56	98-106
ССГ	26-35	50-65	98-106
IMGT	26-33	51-57	96-106
VL	LCDR1	LCDR2	LCDR3
КАВАТ	24-34	50-56	89-98
СНОТНІА	24-34	50-56	89-98
ССГ	24-34	50-56	89-98
IMGT	27-32	50-52	89-98

5

Таблица 2Г: CDR 1-3 VH/VL FAP #4-5

VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3
КАВАТ	32-36	51-67	100-109
СНОТНІА	27-33	53-58	100-109
ССГ	27-36	51-67	100-109

IMGT	27-34	52-59	98-109
VL	LCDR1	LCDR2	LCDR3
KABAT	24-34	50-56	89-99
CHOTHIA	24-34	50-56	89-99
CCG	24-34	50-56	89-99
IMGT	27-37	50-52	89-99

Например, в соответствии с правилом Kabat для CD137 #1-6, CDR VH расположены следующим образом: остатки 31-35 (CDR1), 50-66 (CDR2), и 99-108 (CDR3). Также, в соответствии с системой нумерации Kabat для CD137 #1-6, CDR VL расположены следующим образом: остатки 24-34 (CDR1), 50-56 (CDR2), и 89-97 (CDR3). В соответствии с правилом Kabat для CD137 VH #7-10, CDR VH расположены следующим образом: остатки 31-35 (CDR1), 50-65 (CDR2), и 98-107 (CDR3). Также, в соответствии с системой нумерации Kabat для CD137 #7-10, CDR VL расположены следующим образом: остатки 24-39 (CDR1), 55-61 (CDR2), и 94-102 (CDR3).

В контексте этого изобретения, ссылка на CDR основывается на определении правил Kabat, однако, настоящее раскрытие не ограничивается FR и CDR, определенных какой-либо одной системой нумерации, а включает в себя все системы нумерации, в то числе, обсуждаемые выше.

Таким образом, если не указано иное, термины "CDR" и "определяющий комплементарность участок" конкретного антитела или его участка, такого как переменный участок, а также отдельные CDR (например, "CDR-H1, CDR-H2) и каркасные участки (FR) антитела или его участка, следует понимать как такие, которые охватывают соответствующий участок (например, определяющий комплементарность участок), которые определены любой из известных систем, описанных в этой заявке выше. В некоторых случаях, указывается схема идентификации конкретного участка CDR или участков CDR, например, CDR, который определяется в соответствии с Kabat, Chothia, CCG, IMGT, или другими методами, известными в данной области. В других случаях, приводится конкретная аминокислотная последовательность участка CDR. Альтернативные правила для каждого из участков CDR в соответствии с изобретением представлены в Таблицах 3А-3 ниже:

ТАБЛИЦА 3А. CDR VH/VL CD137 #1-#10 в соответствии с номенклатурой**КАВАТ:**

CD137 (#1)			
	KABAT SEQ	SEQ ID №:	Аминокислота #
HCDR1	DFYMA	SEQ ID №:290	31-35
HCDR2	NINYDG SSTYYLDSLKS	SEQ ID №:8	50-66
HCDR3	EGDEGWYFDV	SEQ ID №:9	99-108
LCDR1	KASQDVSTAVA	SEQ ID №:12	24-34
LCDR2	SASYRYT	SEQ ID №:13	50-56
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №:14	89-97
CD137 #2			
HCDR1	DFYMS	SEQ ID №:295	31-35
HCDR2	NINYEG SSKYYVESVKG	SEQ ID №:18	50-66
HCDR3	EGDEGWYFDV	SEQ ID №:9	99-108
LCDR1	KASQDISSAVA	SEQ ID №:22	24-34
LCDR2	SASSRYT	SEQ ID №:23	50-56
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №:14	89-97
CD137 #3			
HCDR1	DFYMS	SEQ ID №:295	31-35
HCDR2	NINYEASSKYYVDSLKG	SEQ ID №:28	50-66
HCDR3	EGDEGWYFDV	SEQ ID №: 9	99-108
LCDR1	RASQSVSSALA	SEQ ID №:32	24-34
LCDR2	AASYRQS	SEQ ID №:33	50-56
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №:14	89-97
CD137 #4			
HCDR1	DFYMS	SEQ ID №:295	31-35
HCDR2	NIQYEGSSKYYVESLKG	SEQ ID №:38	50-66
HCDR3	EGDEGWYFDV	SEQ ID №:9	99-108
LCDR1	RASQSISTAVA	SEQ ID №:42	24-34
LCDR2	AASYLYS	SEQ ID №:43	50-56
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №:14	89-97
CD137 #5			
HCDR1	DFYMS	SEQ ID №:295	31-35
HCDR2	NIQYEGSSKYYVESLKG	SEQ ID №:48	50-66
HCDR3	EGDEGWYFDV	SEQ ID №:9	99-108
LCDR1	RASQSISTALA	SEQ ID №:52	24-34
LCDR2	AASYRYS	SEQ ID №:53	50-56

LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №:14	89-97
CD137 #6			
HCDR1	DFYMS	SEQ ID №:295	31-35
HCDR2	NIN YEG SSK YYV ESV KG	SEQ ID №:58	50-66
HCDR3	EGDEGWYFD V	SEQ ID №:9	99-108
LCDR1	RASQSISTALA	SEQ ID №:62	24-34
LCDR2	AASYRYS	SEQ ID №:63	50-56
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №:14	89-97
КОНСЕНСУСНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ КАВАТ (#1-6)			
		X	SEQ ID №:
HCDR1	DFYMX ₁	X ₁ =A или S	SEQ ID №:672 31-35
HCDR2	NIX ₁ YX ₂ X ₃ SSX ₄ YYX ₅ X ₆ SX ₇ KX ₈	X ₁ = N, Q, X ₂ =D, E; X ₃ =G, A; X ₄ =T, K; X ₅ = L, V; X ₆ = D, E; X ₇ = L, V; X ₈ = S, G	SEQ ID №:335 50-66
HCDR3	EGDEGWYFDV		SEQ ID №:9 99-108
LCDR1	X ₁ ASQ X ₂ X ₃ SX ₄ AX ₅ A	X ₁ = K, R; X ₂ =D, S; X ₃ =V, I; X ₄ =T, S; X ₅ = V, L	SEQ ID №:336 24-34
LCDR2	X ₁ AS X ₂ X ₃ X ₄ X ₅	X ₁ = S, A; X ₂ =S, Y; X ₃ =R, L; X ₄ =Y, Q; X ₅ = S, T	SEQ ID №:337 50-56
LCDR3	QQHYSNPWT		SEQ ID №:14 89-97
анти-CD137 (#7)			
HCDR1	SYYS	SEQ ID №:308	31-35
HCDR2	YIYSGSTNYPNPSLKS	SEQ ID №:68	50-65
HCDR3	DQSGGGSFQH	SEQ ID №:69	98-107
LCDR1	RSSQSLLYSNGYNHLD	SEQ ID №:72	24-39
LCDR2	LGSNRAS	SEQ ID №:73	55-61
LCDR3	MQALQTPPT	SEQ ID №:74	94-102
анти-CD137 #8			
HCDR1	SYYS	SEQ ID №:308	31-35
HCDR2	YIYSGSTNINPSLKS	SEQ ID №:78	50-65
HCDR3	DQSGGGSFQH	SEQ ID №:69	98-107
LCDR1	RSSQSLLYSNGYNHLD	SEQ ID №:72	24-39
LCDR2	LGSNRAS	SEQ ID №:73	55-61
LCDR3	MQALQTPPT	SEQ ID №:74	94-102
анти-CD137 #9			
HCDR1	SYYS	SEQ ID №:308	31-35
HCDR2	YIYSGSTNINPSLKS	SEQ ID №:88	50-65

HCDR3	DQSGGGSFQH	SEQ ID №:69	98-107	
LCDR1	RSSQSLLYSQGYNHLD	SEQ ID №:92	24-39	
LCDR2	GGSNRAS	SEQ ID №:93	55-61	
LCDR3	MQALQTPPT	SEQ ID №:74	94-102	
анти-CD137 #10				
HCDR1	SYAWS	SEQ ID №:308	31-35	
HCDR2	YIYSGSTQYNPSLKS	SEQ ID №:98	50-65	
HCDR3	DQSGGGSFQH	SEQ ID №:69	98-107	
LCDR1	RSSQSLLYSQGYNHLD	SEQ ID №:92	24-39	
LCDR2	GGSNRAS	SEQ ID №:93	55-61	
LCDR3	MQALQTPPT	SEQ ID №:74	94-102	
КАВАТ КОНСЕНСУСНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (#7-10)				
		X	SEQ ID №:	
HCDR1	SYAWS		SEQ ID №:308	31-35
HCDR2	YIYSGSTX ₁ X ₂ NPSLKS	X ₁ =N, Q; X ₂ = Y, I	SEQ ID №:338	50-65
HCDR3	DQSGGGSFQH		SEQ ID №:69	98-107
LCDR1	RSSQSLLYSX ₁ GYNHLD	X ₁ = N, Q	SEQ ID №:669	24-39
LCDR2	X ₁ GSNRAS	X ₁ = L, G	SEQ ID №:339	55-61
LCDR1	MQALQTPPT		SEQ ID №:74	94-102

ТАБЛИЦА 3Б: CDR VH/VL CD137 #1-10 в соответствии с номенклатурой CHOTHIA:

CD137 #1			
	CHOTHIA SEQ	SEQ ID №:	Аминокислота #
HCDR1	GFTFSDF	SEQ ID №:291	26-32
HCDR2	NYDGSS	SEQ ID №:292	52-57
HCDR3	GDEGWYFD	SEQ ID №:675	100-107
LCDR1	KASQDVSTAVA	SEQ ID №:12	24-34
LCDR2	SASYRYT	SEQ ID №:13	50-56
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №:14	89-97
CD137 (#2)			
HCDR1	GFTFSDF	SEQ ID №:291	26-32
HCDR2	NYEGSS	SEQ ID №:296	52-57
HCDR3	GDEGWYFD	SEQ ID №:675	100-107
LCDR1	KASQDISSAVA	SEQ ID №:22	24-34
LCDR2	SASSRYT	SEQ ID №:23	50-56
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №:14	89-97
CD137 (#3)			

HCDR1	GFTFSDF	SEQ ID №:291	26-32
HCDR2	NYEASS	SEQ ID №:299	52-57
HCDR3	GDEGWYFD	SEQ ID №:675	100-107
LCDR1	RASQSVSSALA	SEQ ID №:32	24-34
LCDR2	AASYRQS	SEQ ID №:33	50-56
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №:14	89-97

CD137 (#4)

HCDR1	GFTFSDF	SEQ ID №:291	26-32
HCDR2	QYEGSS	SEQ ID №:302	52-57
HCDR3	GD EGWYFD	SEQ ID №:675	100-107
LCDR1	RASQSISTAVA	SEQ ID №:42	24-34
LCDR2	AASYLYS	SEQ ID №:43	50-56
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №:14	89-97

CD137 (#5)

HCDR1	GFTFSDF	SEQ ID №:291	26-32
HCDR2	QYEGSS	SEQ ID №:302	52-57
HCDR3	GDEGWYFD	SEQ ID №:675	100-107
LCDR1	RASQSISTALA	SEQ ID №:52	24-34
LCDR2	AASYRYS	SEQ ID №:53	50-56
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №:14	89-97

CD137 (#6)

HCDR1	GFTFSDF	SEQ ID №:291	26-32
HCDR2	NYEGSS	SEQ ID №:296	52-57
HCDR3	GDEGWYFD	SEQ ID №:675	100-107
LCDR1	RASQSISTALA	SEQ ID №:62	24-34
LCDR2	AASYRYS	SEQ ID №:63	50-56
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №:14	89-97

**КОНСЕНСУСНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
СНОТНІА (#1-6)**

		X	SEQ ID №:
--	--	---	-----------

HCDR1	GFTFSDF		SEQ ID №:291	26-32
HCDR2	X ₁ YX ₂ X ₃ SS	X ₁ = N, Q; X ₂ =D, E; X ₃ =G, A	SEQ ID №:673	52-57
HCDR3	QSGGGSFQ		SEQ ID №:682	100-107
LCDR1	X ₁ ASQ X ₂ X ₃ SX ₄ AX ₅ A	X ₁ = K, R; X ₂ =D, S; X ₃ =V, I; X ₄ =T, S; X ₅ = V, L	SEQ ID №:336	24-34
LCDR2	X ₁ AS X ₂ X ₃ X ₄ X ₅	X ₁ = S, A; X ₂ =S, Y; X ₃ =R, L; X ₄ =Y, Q; X ₅ = S, T	SEQ ID №:337	50-56

LCDR3	QQHYSNPWT		SEQ ID №:14	89-97
анти-CD137 (#7)				
HCDR1	GGSISSY	SEQ ID №:309	26-32	
HCDR2	YYSGS	SEQ ID №:310	52-56	
HCDR3	QSGGGSFQ	SEQ ID №:682	99-106	
LCDR1	RSSQSLLYSNGYNHLD	SEQ ID №:72	24-39	
LCDR2	LGSNRAS	SEQ ID №:73	55-61	
LCDR3	MQALQTPPT	SEQ ID №:74	94-102	
анти-CD137 (#8)				
HCDR1	GGSISSY	SEQ ID №:309	26-32	
HCDR2	YYSGS	SEQ ID №:310	52-56	
HCDR3	QSGGGSFQ	SEQ ID №:682	99-106	
LCDR1	RSSQSLLYSNGYNHLD	SEQ ID №:72	24-39	
LCDR2	LGSNRAS	SEQ ID №:73	55-61	
LCDR3	MQALQTPPT	SEQ ID №:74	94-102	
анти-CD137 (#9)				
HCDR1	GGSISSY	SEQ ID №:309	26-32	
HCDR2	YYSGS	SEQ ID №:310	52-56	
HCDR3	QSGGGSFQ	SEQ ID №:682	99-106	
LCDR1	RSSQSLLYSQGYNHLD	SEQ ID №:92	24-39	
LCDR2	GGSNRAS	SEQ ID №:93	55-61	
LCDR3	MQALQTPPT	SEQ ID №:74	94-102	
анти-CD137 (#10)				
HCDR1	GGSISSY	SEQ ID №:309	26-32	
HCDR2	YYSGS	SEQ ID №:310	52-56	
HCDR3	QSGGGSFQ	SEQ ID №:682	99-106	
LCDR1	RSSQSLLYSQGYNHLD	SEQ ID №:92	24-39	
LCDR2	GGSNRAS	SEQ ID №:93	55-61	
LCDR3	MQALQTPPT	SEQ ID №:74	94-102	
КОНСЕНСУСНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ СНОТНІА (#7-10)				
		X	SEQ ID №:	
HCDR1	GGSISSY		SEQ ID №:309	26-32
HCDR2	YYSGS		SEQ ID №:310	52-56
HCDR3	QSGGGSFQ		SEQ ID №:682	99-106
LCDR1	RSSQSLLYSX ₁ GYNHLD	X1= N, Q	SEQ ID №:669	24-39
LCDR2	X ₁ GSNRAS	X1= L, G	SEQ ID №:339	55-61

LCDR3	MQALQTPPT		SEQ ID №:74	94-102
-------	-----------	--	-------------	--------

ТАБЛИЦА 3В: CDR VH/VL CD137 #1-10 в соответствии с номенклатурой

CCG:

CD137 (#1)			
	CCG SEQ	SEQ ID №:	Аминокислота #
HCDR1	GFTFSDFYMA	SEQ ID №:7	26-35
HCDR2	NINYDGSSTYYLDSLKS	SEQ ID №:8	50-66
HCDR3	EGDEGWYFDV	SEQ ID №:9	99-108
LCDR1	KASQDVSTAVA	SEQ ID №:12	24-34
LCDR2	SASYRYT	SEQ ID №:13	50-56
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №:14	89-97
CD137 (#2)			
HCDR1	GFTFSDFYMS	SEQ ID №:17	26-35
HCDR2	NINYEGSSKYYVESVKG	SEQ ID №:18	50-66
HCDR3	EGDEGWYFDV	SEQ ID №:19	99-108
LCDR1	KASQDISSAVA	SEQ ID №:22	24-34
LCDR2	SASSRYT	SEQ ID №:23	50-56
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №: 24	89-97
CD137 (#3)			
HCDR1	GFTFSDFYMS	SEQ ID №:27	26-35
HCDR2	NINYEASSKYYVDSLKG	SEQ ID №:28	50-66
HCDR3	EGDEGWYFDV	SEQ ID №:29	99-108
LCDR1	RASQSVSSALA	SEQ ID №:32	24-34
LCDR2	AASYRQS	SEQ ID №:33	50-56
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №: 34	89-97
CD137 (#4)			
HCDR1	GFTFSDFYMS	SEQ ID №:37	26-35
HCDR2	NIQYEGSSKYYVESLKG	SEQ ID №:38	50-66
HCDR3	EGDEGWYFDV	SEQ ID №:39	99-108

LCDR1	RASQSISTAVA	SEQ ID №:42	24-34
LCDR2	AASYLYS	SEQ ID №:43	50-56
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №: 44	89-97

CD137 (#5)

HCDR1	GFTFSDFYMS	SEQ ID №:47	26-35
HCDR2	NIQYEGSSKYYVESLKG	SEQ ID №:48	50-66
HCDR3	EGDEGWYFDV	SEQ ID №:49	99-108

LCDR1	RASQSISTALA	SEQ ID №:52	24-34
LCDR2	AASYRYS	SEQ ID №:53	50-56
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №: 54	89-97

CD137 (#6)

HCDR1	GFTFSDFYMS	SEQ ID №:57	26-35
HCDR2	NINYEGSSKYYVESVKG	SEQ ID №:58	50-66
HCDR3	EGDEGWYFDV	SEQ ID №:59	99-108

LCDR1	RASQSISTALA	SEQ ID №:62	24-34
LCDR2	AASYRYS	SEQ ID №:63	50-56
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №: 64	89-97

**КОНСЕНСУСНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
CCG (#1-#6)**

		X	SEQ ID №:	
HCDR1	GTFSDFYMX ₁	X ₁ =A или S	SEQ ID №:348	26-35
HCDR2	NIX ₁ YX ₂ X ₃ SSX ₄ YX ₅ X ₆ SX ₇ KX ₈	X ₁ = N, Q, X ₂ =D, E; X ₃ =G, A; X ₄ =T, K; X ₅ = L, V; X ₆ = D, E; X ₇ = L, V; X ₈ = S, G	SEQ ID №:335	50-66
HCDR3	EGDEGWYFD V		SEQ ID №:9	99-108
LCDR1	X ₁ ASQ X ₂ X ₃ SX ₄ AX ₅ A	X ₁ = K, R, X ₂ =D, S, X ₃ =V, I; X ₄ =T, S; X ₅ = V, L	SEQ ID №:336	24-34
LCDR2	X ₁ AS X ₂ X ₃ X ₄ X ₅	X ₁ = S, A; X ₂ =S, Y; X ₃ =R, L; X ₄ =Y, Q; X ₅ = S, T	SEQ ID №:337	50-56

LCDR3	QQHYSNPWT		SEQ ID №:14	89-97
-------	-----------	--	-------------	-------

анти-CD137 (#7)

HCDR1	GGSISSYYWS	SEQ ID №:67	26-35
HCDR2	YIYYSGSTNYNPSLKS	SEQ ID №:68	50-65
HCDR3	DQSGGGSFQH	SEQ ID №:69	98-107
LCDR1	RSSQSLLYSNGYNHLD	SEQ ID №:72	24-39
LCDR2	LGSNRAS	SEQ ID №:73	55-61
LCDR3	MQALQTPPT	SEQ ID №:74	94-102

анти-CD137 (#8)

HCDR1	GGSISSYYWS	SEQ ID №:77	26-35
HCDR2	YIYYSGSTN _I NPSLKS	SEQ ID №:78	50-65
HCDR3	DQSGGGSFQH	SEQ ID №:79	98-107
LCDR1	RSSQSLLYSNGYNHLD	SEQ ID №: 82	24-39
LCDR2	LGSNRAS	SEQ ID №: 83	55-61
LCDR3	MQALQTPPT	SEQ ID №:84	94-102

анти-CD137 (#9)

HCDR1	GGSISSYYWS	SEQ ID №:87	26-35
HCDR2	YIY YSG STN _I NP SLKS	SEQ ID №:88	50-65
HCDR3	DQSGGGSFQH	SEQ ID №:89	98-107
LCDR1	RSSQSLLYSQ _Q GYNHLD	SEQ ID №:92	24-39
LCDR2	<u>G</u> GSNRAS	SEQ ID №:93	55-61
LCDR3	MQALQTPPT	SEQ ID №:94	94-102

анти-CD137 (#10)

HCDR1	GGSISSYYWS	SEQ ID №:97	26-35
HCDR2	YIYYSGSTQ _Q YNPSLKS	SEQ ID №:98	50-65
HCDR3	DQSGGGSFQH	SEQ ID №:99	98-107
LCDR1	RSSQSLLYSQ _Q GYNHLD	SEQ ID №: 102	24-39
LCDR2	<u>G</u> GSNRAS	SEQ ID №: 103	55-61
LCDR3	MQALQTPPT	SEQ ID №:104	94-102

КОНСЕНСУСНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ CCG (#7-10)				
		X	SEQ ID №:	
HCDR1	GGSISSYYWS		SEQ ID №:67	26-35
HCDR2	YIYYSGSTX ₁ X ₂ NPSLKS	X ₁ =N, Q; X ₂ = Y, I	SEQ ID №:338	50-65
HCDR3	DQSGGGSFQH		SEQ ID №:69	98-107
LCDR1	RSSQSLLYSX ₁ GYNHLD	X ₁ = N, Q	SEQ ID №:669	24-39
LCDR2	X ₁ GSNRAS	X ₁ = L, G	SEQ ID №:339	55-61
LCDR3	MQALQTPPT		SEQ ID №:74	94-102

ТАБЛИЦА 3Г: CDR VH/VL CD137 #1-10 в соответствии с номенклатурой

IMGT:

CD137 (#1)			
	IMGT SEQ	SEQ ID №:	Аминокислота #
HCDR1	GFTFSDFY	SEQ ID №:286	26-33
HCDR2	INYDGSST	SEQ ID №:287	51-58
HCDR3	AREGDEGWYFDV	SEQ ID №:676	97-108
LCDR1	QDVSTA	SEQ ID №:288	27-32
LCDR2	SAS	SEQ ID №:678	50-52
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №:14	89-97
CD137 (#2)			
HCDR1	GFTFSDFY	SEQ ID №:286	26-33
HCDR2	IN YEG SSK	SEQ ID №:293	51-58
HCDR3	AREGDEGWYFDV	SEQ ID №:676	97-108
LCDR1	QDISSA	SEQ ID №: 294	27-32
LCDR2	SAS	SEQ ID №:678	50-52
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №: 14	89-97

CD137 (#3)			
HCDR1	GFTFSDFY	SEQ ID №:286	26-33
HCDR2	INYEASSK	SEQ ID №:297	51-58
HCDR3	AREGDEGWYFDV	SEQ ID №:676	97-108
LCDR1	QSVSSA	SEQ ID №:298	27-32
LCDR2	AAS	SEQ ID №:679	50-52
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №:14	89-97
CD137 (#4)			
HCDR1	GFTFSDFY	SEQ ID №:286	26-33
HCDR2	IQYEGSSK	SEQ ID №:300	51-58
HCDR3	AREGDEGWYFDV	SEQ ID №:676	97-108
LCDR1	QSISTA	SEQ ID №:301	27-32
LCDR2	AAS	SEQ ID №:679	50-52
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №:14	89-97
CD137 (#5)			
HCDR1	GFTFSDFY	SEQ ID №:286	26-33
HCDR2	IQYEGSSK	SEQ ID №:300	51-58
HCDR3	AREGDEGWYFDV	SEQ ID №:676	97-108
LCDR1	QSISTA	SEQ ID №:301	27-32
LCDR2	AAS	SEQ ID №:679	50-52
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №:14	89-97
CD137 (#6)			
HCDR1	GFTFSDFY	SEQ ID №:286	26-33
HCDR2	INYEGSSK	SEQ ID №:293	51-58
HCDR3	AREGDEGWYFDV	SEQ ID №:676	97-108
LCDR1	QSI STA	SEQ ID №:301	27-32
LCDR2	AAS	SEQ ID №:679	50-52
LCDR3	QQHYSNPWT	SEQ ID №:14	89-97
КОНСЕНСУСНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ IMGT (#1-6)			

	IMGT SEQ	X	SEQ ID №:
HCDR1	GFTFSDFY		SEQ ID №:286
HCDR2	IX1YX2X3SSX4	X1= N, Q; X2=D, E; X3=G, A; X4=T, K	SEQ ID №:674*
HCDR3	AREGDEGWYFDV		SEQ ID №:676
LCDR1	QX1X2SX3A	X1=D, S; X2 =V, I; X3=T, S	SEQ ID №:677
LCDR2	X1AS	X1= S, A	SEQ ID №:680
LCDR3	QQHYSNPWT		SEQ ID №:14

анти-CD137 (#7)

HCDR1	GGSISSYY	SEQ ID №:304	26-33
HCDR2	IYYSGST	SEQ ID №:305	51-57
HCDR3	ARDQSGGGSFQH	SEQ ID №:683	96-107
LCDR1	QSLLYSNGYNH	SEQ ID №:306	27-37
LCDR2	LGS	SEQ ID №:685	55-57
LCDR3	MQALQTPPT	SEQ ID №:74	94-102

анти-CD137 (#8)

HCDR1	GGSISSYY	SEQ ID №:304	26-33
HCDR2	IYYSGST	SEQ ID №:305	51-57
HCDR3	ARDQSGGGSFQH	SEQ ID №:683	96-107
LCDR1	QSLLYSNGYNH	SEQ ID №:306	27-37
LCDR2	LGS	SEQ ID №:685	55-57
LCDR3	MQALQTPPT	SEQ ID №:74	94-102

анти-CD137 (#9)

HCDR1	GGSISSYY	SEQ ID №:304	26-33
-------	----------	--------------	-------

HCDR2	IYYSGST	SEQ ID №:305	51-57
HCDR3	ARDQSGGGSFQH	SEQ ID №:683	96-107
LCDR1	QSLLYSQGYNH	SEQ ID №:313	27-37
LCDR2	GGG	SEQ ID №:686	55-57
LCDR3	MQALQTPPT	SEQ ID №:74	94-102

анти-CD137 (#10)

HCDR1	GGSISSYY	SEQ ID №:304	26-33
HCDR2	IYYSGST	SEQ ID №:305	51-57
HCDR3	ARDQSGGGSFQH	SEQ ID №:683	96-107
LCDR1	QSLLYSQGYNH	SEQ ID №:313	27-37
LCDR2	GGG	SEQ ID №:686	55-57
LCDR3	MQALQTPPT	SEQ ID №:74	94-102

**КОНСЕНСУСНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
IMGT (#7-10)**

	IMGT SEQ	X	SEQ ID №:	
HCDR1	GGSISSYY		SEQ ID №:304	26-33
HCDR2	IYYSGST		SEQ ID №:305	51-57
HCDR3	ARDQSGGGSFQH		SEQ ID №:683	96-107
LCDR1	QSLLYSX ₁ GYNH	X ₁ = N, Q	SEQ ID №:684	27-37
LCDR2	X ₁ GS	X ₁ = L, G	SEQ ID №:687	55-57
LCDR3	MQALQTPPT		SEQ ID №:74	94-102

ТАБЛИЦА 3Д. CDR VH/VL FAP #1-5 в соответствии с номенклатурой**КАВАТ:**

FAP (#1)				
	КАВАТ SEQ	SEQ ID №:	Аминокислота #	
HCDR1	NFAMT	SEQ ID №:319	31-35	
HCDR2	GIRGSGTTYADSVKG	SEQ ID №:108	50-65	
HCDR3	TWGTEYFDY	SEQ ID №:109	98-106	
LCDR1	RASQPINNYLA	SEQ ID №:111	24-34	
LCDR2	SASNRAT	SEQ ID №:112	50-56	
LCDR3	QQYYDWPPYT	SEQ ID №:113	89-98	
FAP (#2)				
HCDR1	NFAMT	SEQ ID №:319	31-35	
HCDR2	GIRGSGTTYAESVKG	SEQ ID №:117	50-65	
HCDR3	TWGTEYFDY	SEQ ID №:109	98-106	
LCDR1	RASQPIRSYLA	SEQ ID №:120	24-34	
LCDR2	SASNRAT	SEQ ID №:112	50-56	
LCDR3	QQYYDWPPYT	SEQ ID №:113	89-98	
FAP (#3)				
HCDR1	NFAMT	SEQ ID №:319	31-35	
HCDR2	GIRGSGTTYAESVKG	SEQ ID №:126	50-65	
HCDR3	TWGTEYFDY	SEQ ID №:109	98-106	
LCDR1	RASQPISSYLA	SEQ ID №:129	24-34	
LCDR2	SASNRAT	SEQ ID №:112	50-56	
LCDR3	QQYYDWPPYT	SEQ ID №:113	89-98	
КОНСЕНСУСНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ КАВАТ FAP #1 -3				
	КАВАТ SEQ	X	SEQ ID №:	Аминокислота #
HCDR1	NFAMT		SEQ ID №:319	31-35
HCDR2	GIRGSGTTYAX ₁ SVKG	X ₁ = D, E	SEQ ID №:341	50-65
HCDR3	TWGTEYFDY		SEQ ID №:109	98-106
LCDR1	RASQPIX ₁ X ₂ YLA	X ₁ =N, R S; X ₂ = N, S	SEQ ID №:691	24-34
LCDR2	SASNRAT		SEQ ID №:112	50-56
LCDR3	QQYYDWPPYT		SEQ ID №:113	89-98
FAP (#4)				
HCDR1	NYDMG	SEQ ID №:328	32-36	
HCDR2	GIRGRGGSTYYADSVKG	SEQ ID №:135	51-67	
HCDR3	ENNRHSFFEY	SEQ ID №:136	100-109	
LCDR1	RASQSVGHYLA	SEQ ID №:138	24-34	
LCDR2	DASNRAI	SEQ ID №:139	50-56	

LCDR3	QYYNDWPPLT	SEQ ID №:140	89-99
FAP (#5)			
HCDR1	SYDMG	SEQ ID №:333	32-36
HCDR2	GIRGRGGSTYYAESVKG	SEQ ID №:144	51-67
HCDR3	ENERHSFFEY	SEQ ID №:145	100-109
LCDR1	RASQSVGHYLA	SEQ ID №:138	24-34
LCDR2	DASNRAI	SEQ ID №:139	50-56
LCDR3	QYYNDWPPLT	SEQ ID №:140	89-99
КОНСЕНСУСНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ КАВАТ FAP # 4 -5			
	KABAT SEQ	X	SEQ ID №:
			Аминокислота #
HCDR1	X ₁ YDMG	X ₁ =N, S	SEQ ID №:694
HCDR2	GIRGRGGSTYYAX ₁ SVKG	X=D, E	SEQ ID №:342
HCDR3	ENX ₁ RHSFFEY	X=N, E	SEQ ID №:343
LCDR1	RASQSVGHYLA		SEQ ID №:138
LCDR2	DASNRAI		SEQ ID №:139
LCDR3	QYYNDWPPLT		SEQ ID №:140

ТАБЛИЦА 3Е. CDR VH/VL FAP #1-5 в соответствии с номенклатурой СНОТНІА:

	FAP (#1)		
	СНОТНІА SEQ	SEQ ID №:	Аминокислота #
HCDR1	GFSMSNF	SEQ ID №:320	26-32
HCDR2	RSGGT	SEQ ID №:321	52-56
HCDR3	TWGTEYFDY	SEQ ID №:109	98-106
LCDR1	RASQPINNYLA	SEQ ID №:111	24-34
LCDR2	SASNRAT	SEQ ID №:112	50-56
LCDR3	QYYDWPPYT	SEQ ID №:113	89-98
FAP (#2)			
HCDR1	GFSMSNF	SEQ ID №:320	26-32
HCDR2	RSGGT	SEQ ID №:321	52-56
HCDR3	TWGTEYFDY	SEQ ID №:109	98-106
LCDR1	RASQPIRSYLA	SEQ ID №:120	24-34
LCDR2	SASNRAT	SEQ ID №:112	50-56
LCDR3	QYYDWPPYT	SEQ ID №:113	89-98
FAP (#3)			
HCDR1	GFSMSNF	SEQ ID №:320	26-32
HCDR2	RSGGT	SEQ ID №:321	52-56

HCDR3	TWGTEYFDY	SEQ ID №:109	98-106
LCDR1	RASQPISSYLA	SEQ ID №:129	24-34
LCDR2	SASNRAT	SEQ ID №:112	50-56
LCDR3	QQYYDWPPYT	SEQ ID №:113	89-98
КОНСЕНСУСНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ СНОТНІА FAP #1 - 3			
	СНОТНІА SEQ	X	SEQ ID №:
			Аминокислота #
HCDR1	GFSMSNF		SEQ ID №:320
HCDR2	RSGGT		SEQ ID №:321
HCDR3	TWGTEYFDY		SEQ ID №:109
LCDR1	RASQPIX ₁ X ₂ YLA	X1=N, R S; X2 = N, S	SEQ ID №:691*
LCDR2	SASNRAT		SEQ ID №:112
LCDR3	QQYYDWPPYT		SEQ ID №:113
FAP #4			
HCDR1	GFTFSNY	SEQ ID №:329	27-33
HCDR2	RGRGGS	SEQ ID №:330	53-58
HCDR3	ENNRHSFFEY	SEQ ID №:136	100-109
LCDR1	RASQSVGHYLA	SEQ ID №:138	24-34
LCDR2	DASNRAI	SEQ ID №:139	50-56
LCDR3	QQYYNDWPPLT	SEQ ID №:140	89-99
FAP #5			
HCDR1	GFTFSSY	SEQ ID №:334	27-33
HCDR2	RGRGGS	SEQ ID №: 330	53-58
HCDR3	ENERHSFFEY	SEQ ID №:145	100-109
LCDR1	RASQSVGHYLA	SEQ ID №:138	24-34
LCDR2	DASNRAI	SEQ ID №:139	50-56
LCDR3	QQYYNDWPPLT	SEQ ID №:140	89-99
КОНСЕНСУСНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ СНОТНІА FAP #4 – 5			
	СНОТНІА SEQ	X	SEQ ID №:
HCDR1	GFTFSX ₁ Y	X1=N, S	SEQ ID №:695
HCDR2	RGRGGS		SEQ ID №:330
HCDR3	ENX1RHSFFEY	X=N, E	SEQ ID №:343
LCDR1	RASQSVGHYLA		SEQ ID №:138
LCDR2	DASNRAI		SEQ ID №:139
LCDR3	QQYYNDWPPLT		SEQ ID №:140

ТАБЛИЦА 3Ж. CDR VH/VL FAP #1-5 в соответствии с номенклатурой CCG:

FAP #1				
	CCG SEQ	SEQ ID №:	Аминокислота #	
HCDR1	GFSMSNFAMT	SEQ ID №:107	26-35	
HCDR2	GIRGSGTTYADSVKG	SEQ ID №:108	50-65	
HCDR3	TWGTEYFDY	SEQ ID №:109	98-106	
LCDR1	RASQPINNYLA	SEQ ID №:111	24-34	
LCDR2	SASNRAT	SEQ ID №:112	50-56	
LCDR3	QYYDWPPYT	SEQ ID №:113	89-98	
FAP (#2)				
HCDR1	GFSMSNFAMT	SEQ ID №:116	26-35	
HCDR2	GIRGSGTTYAESVKG	SEQ ID №:117	50-65	
HCDR3	TWGTEYFDY	SEQ ID №:118	98-106	
LCDR1	RASQPIRSYLA	SEQ ID №:120	24-34	
LCDR2	SASNRAT	SEQ ID №:121	50-56	
LCDR3	QYYDWPPYT	SEQ ID №:122	89-98	
FAP #3				
HCDR1	GFSMSNFAMT	SEQ ID №:125	26-35	
HCDR2	GIRGSGTTYAESVKG	SEQ ID №:126	50-65	
HCDR3	TWGTEYFDY	SEQ ID №:118	98-106	
LCDR1	RASQPISSYLA	SEQ ID №:129	24-34	
LCDR2	SASNRAT	SEQ ID №:130	50-56	
LCDR3	QYYDWPPYT	SEQ ID №:131	89-98	
КОНСЕНСУСНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ CCG FAP #1-3				
	CCG SEQ	X	SEQ ID №:	Аминокислота #
HCDR1	GFSMSNFAMT		SEQ ID №:107	26-35
HCDR2	GIRGSGTTYAX ₁ SVKG	X ₁ = D, E	SEQ ID №:341	50-65
HCDR3	TWGTEYFDY		SEQ ID №:109	98-106
LCDR1	RASQPIX ₁ X ₂ YLA	X ₁ =N, R S; X ₂ = N, S	SEQ ID №:691	24-34
LCDR2	SASNRAT		SEQ ID №:112	50-56
LCDR3	QYYDWPPYT		SEQ ID №:113	89-98
FAP #4				
HCDR1	GFTFSNYDMG	SEQ ID №:134	27-36	
HCDR2	GIRGRGGSTYYADSVKG	SEQ ID №:135	51-67	
HCDR3	ENNRHSFFEY	SEQ ID №:136	100-109	
LCDR1	RASQSVGHYLA	SEQ ID №:138	24-34	
LCDR2	DASNRAI	SEQ ID №:139	50-56	
LCDR3	QYYNDWPPLT	SEQ ID №:140	89-99	

FAP #5				
HCDR1	GFTFSSYDMG	SEQ ID №:143	27-36	
HCDR2	GIRGRGGSTYYAESVKG	SEQ ID №:144	51-67	
HCDR3	ENERHSFFEY	SEQ ID №:145	100-109	
LCDR1	RASQSVGHYLA	SEQ ID №:147	24-34	
LCDR2	DASNRAI	SEQ ID №:148	50-56	
LCDR3	QYYNDWPPLT	SEQ ID №:149	89-99	
КОНСЕНСУСНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ CCG FAP #4-5				
	CCG SEQ	X	SEQ ID №:	Аминокислота #
HCDR1	GFTFSX ₁ YDMG	X1=N, S	SEQ ID №:340	27-35
HCDR2	GIRGRGGSTYYAX ₁ SVKG	X=D, E	SEQ ID №:342	51-67
HCDR3	ENX ₁ RHSFFEY	X=N, E	SEQ ID №:343	100-109
LCDR1	RASQSVGHYLA		SEQ ID №:138	24-34
LCDR2	DASNRAI		SEQ ID №:139	50-56
LCDR3	QYYNDWPPLT		SEQ ID №:140	89-99

ТАБЛИЦА 33. CDR VH/VL FAP #1-5 в соответствии с номенклатурой IMGT:

FAP #1			
	IMGT SEQ	SEQ ID №:	Аминокислота #
HCDR1	GFSMSNFA	SEQ ID №:315	26-33
HCDR2	IRSGTT	SEQ ID №:316	51-57
HCDR3	AKTWGTEYFDY	SEQ ID №:689	96-106
LCDR1	QPINNY	SEQ ID №:317	27-32
LCDR2	SAS	SEQ ID №:693	50-52
LCDR3	QYYDWPPYT	SEQ ID №:113	89-98
FAP #2			
HCDR1	GFSMSNFA	SEQ ID №:315	26-33
HCDR2	IRSGTT	SEQ ID №:316	51-57
HCDR3	AKTWGTEYFDY	SEQ ID №:689	96-106
LCDR1	QPIRSY	SEQ ID №:670	27-32
LCDR2	SAS	SEQ ID №:693	50-52
LCDR3	QYYDWPPYT	SEQ ID №:113	89-98
FAP #3			
HCDR1	GFSMSNFA	SEQ ID №:315	26-33
HCDR2	IRSGTT	SEQ ID №:316	51-57
HCDR3	AKTWGTEYFDY	SEQ ID №:689	96-106
LCDR1	QPISSY	SEQ ID №:323	27-32

LCDR2	SAS	SEQ ID №:693	50-52
LCDR3	QQYYDWPPYT	SEQ ID №:113	89-98
КОНСЕНСУСНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ IMGT FAP #1 -3			
	IMGT SEQ	X	SEQ ID №:
HCDR1	GFSMSNFA		SEQ ID №:315
HCDR2	IRGSGTT		SEQ ID №:316
HCDR3	AKTWGTEYFDY		SEQ ID №:689
LCDR1	QPIX ₁ X ₂ Y	X1=N, R S; X2 = N, S	SEQ ID №:692
LCDR2	SAS		SEQ ID №:693
LCDR3	QQYYDWPPYT		SEQ ID №:113
FAP #4			
HCDR1	GFTFSNYD	SEQ ID №:324	27-34
HCDR2	IRGRGGST	SEQ ID №:325	52-59
HCDR3	AKENNRHSFFEY	SEQ ID №:701	98-109
LCDR1	QSVGHY	SEQ ID №:326	27-32
LCDR2	DAS	SEQ ID №:704	50-52
LCDR3	QQYYNDWPPLT	SEQ ID №:140	89-99
FAP #5			
HCDR1	GFTFSSYD	SEQ ID №:331	27-34
HCDR2	IRGRGGST	SEQ ID №:325	52-59
HCDR3	AKENERHSFFEY	SEQ ID №:702	98-109
LCDR1	QSVGHY	SEQ ID №:326	27-32
LCDR2	DAS	SEQ ID №:704	50-52
LCDR3	QQYYNDWPPLT	SEQ ID №:140	89-99
КОНСЕНСУСНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ IMGT FAP #4-5			
	CCG SEQ	X	SEQ ID №:
HCDR1	GFTFSX ₁ YD	X1=N, S	SEQ ID №:696
HCDR2	IRGRGGST		SEQ ID №:325
HCDR3	AKENX ₁ RHSFFEY	X=N, E	SEQ ID №: 703
LCDR1	QSVGHY		SEQ ID №:326
LCDR2	DAS		SEQ ID №: 704
LCDR3	QQYYNDWPPLT		SEQ ID №:140

При этом предусмотрена модификация(-и) аминокислотной последовательности антител. Например, может быть желательным улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела. Термин “варианты аминокислотной последовательности” включает в себя значимые

варианты, в которых имеются аминокислотные замены в одном или в нескольких остатках гипервариабельного участка родительской антигенсвязывающей молекулы (например, гуманизированного или человеческого антитела). Как правило, полученный(-е) вариант(-ы), выбранные для последующего

5 исследования, будут иметь модификации некоторых биологических свойств, которые подходят для предназначенной функции. Указанные модификации, могут включать, но не ограничиваются ими, “улучшения” некоторых биологических свойств, таких как повышенная аффинность или уменьшенная иммуногенность, по сравнению с родительской антигенсвязывающей молекулой,

10 и/или будут по сути сохранять определенные биологические свойства родительской антигенсвязывающей молекулы. Варианты аминокислотной последовательности могут быть получены посредством введения соответствующих нуклеотидных изменений в нуклеиновую кислоту, кодирующую вариант антитела, или посредством синтеза пептидов. Такие

15 модификации включают, например, делеции и/или инсерции и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях вариантов антител. Любую комбинацию делеции, инсерции, и замены осуществляют для получения конечного конструкта, при условии, что конечный конструкт обладает желательными характеристиками. Аминокислотные изменения также могут

20 изменить посттрансляционный процессинг вариантов антител, например, изменить количество или положение сайта гликозилирования.

Например, 1, 2, 3, 4, 5, или 6 аминокислот могут быть вставлены, заменены или удалены в каждом из CDR (конечно, в зависимости от их длины), в то время как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, или 25

25 аминокислот могут быть вставлены, заменены или удалены в каждом из FR. Предпочтительно, инсерции аминокислотной последовательности в конструкт антитела включают в себя амино- и/или карбоксил-концевые слияния, варьирующиеся по длине от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 остатков до полипептидов, содержащих сто или большее количество остатков, а также

30 внутри-последовательные инсерции одного или нескольких аминокислотных остатков. Кроме того, делеции аминокислотной последовательности из конструкта антитела на амино- и/или карбоксил-концевых участках, которые варьируются по длине от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 остатков, предусмотрены для того, чтобы максимизировать и/или иным образом модифицировать

характеристики, желательные в конструкторе антитела, в дополнение к его способности связывать антиген-мишень.

Сайты, которые представляют наибольший интерес с точки зрения заместительного мутагенеза, включают в себя (но не ограничиваются ими) CDR тяжелой и/или легкой цепи, в частности, гипервариабельные участки, но при этом также предусмотрены FR-изменения в тяжелой и/или легкой цепи. Предпочтительно, замены являются консервативными заменами, которые описаны в этой заявке. Предпочтительно, в CDR может быть заменено 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 аминокислот, в то время как в каркасных участках (FR) может быть заменено 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, или 25 аминокислот, в зависимости от длины CDR или FR. Например, если последовательность CDR включает 6 аминокислот, то предполагается, что одна, две или три из этих аминокислот заменены. Подобным образом, если последовательность CDR включает 15 аминокислот, то предполагается, что одна, две, три, четыре, пять или шесть из этих аминокислот заменены.

Как правило, если аминокислоты заменены в одном или в нескольких или во всех CDR тяжелой и/или легкой цепи, то является предпочтительным, чтобы полученная в результате "замененная" последовательность была по меньшей мере на 60 % или 65 %, более предпочтительно на 70 % или 75 %, даже более предпочтительно на 80 % или 85 %, и в частности, предпочтительно на 90 % или 95 % идентичной "исходной" последовательности CDR. Это означает, что от длины CDR зависит, до какой степени он является идентичным "замененной" последовательности. Например, CDR, имеющий 5 аминокислот, предпочтительно является на 80 % идентичным его замененной последовательности, с тем, чтобы иметь по меньшей мере одну замененную аминокислоту. Соответственно, CDR-участки конструктора антитела могут иметь разные степени идентичности с их замененными последовательностями, например, CDRL1 может иметь 80 %, в то время как CDRL3 может иметь 90 %.

"Fc-часть" антитела не участвует непосредственно в связывании антитела с антигеном, но проявляет различные эффекторные функции. "Fc-часть антитела" является термином, хорошо известным квалифицированному специалисту, и определяется на основе расщепления антител папаином. В зависимости от аминокислотной последовательности константного участка их тяжелых цепей, антитела или иммуноглобулины делятся на классы: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. В

соответствии с константными участками тяжелой цепи, разные классы иммуноглобулинов называют α , δ , ϵ , γ , и μ соответственно. Некоторые из них могут дополнительно делиться на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, и IgG4, IgA1, и IgA2. Fc-часть антитела непосредственно участвует в

5 ADCC (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, *англ.: antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*) и CDC (комплементзависимая цитотоксичность, *англ.: complement-dependent cytotoxicity*), основанных на активации комплемента, связывании C1q и связывании Fc-рецептора. Активация комплемента (CDC) инициируется связыванием фактора комплемента C1q с Fc-частью

10 частью большинства подклассов антитела IgG. В то время как влияние антитела на систему комплемента зависит от определенных условий, связывание с C1q вызывается определенными сайтами связывания в Fc-части. Такие сайты связывания известны в уровне техники и описаны, например, у Boakle и др. Nature 282 (1975) 742-743, Lukas и др. J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560,

15 Brunhouse и Cebra, Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917, Burton и др. Nature 288 (1980) 338-344, Thommesen и др. Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004, Idusogie и др. J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184, Hezareh и др. J. Virology 75 (2001) 12161-12168, Morgan и др. Immunology 86 (1995) 319-324, в EP 0307434. Такими сайтами связывания являются, например, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерация в соответствии с EU-индексом Кэбота). Наиболее важными среди этих остатков в опосредовании связывания рецепторов C1q и Fc-гамма в IgG1 являются L234 и L235 (Hezareh и др. J. Virology 75 (2001) 12161-12168). Антитела подкласса IgG1 и IgG3 обычно демонстрируют активацию комплемента и C1q и C3 связывание, тогда как IgG2 и IgG4 не активируют

20 систему комплемента и не связывают C1q и C3.

В одном варианте осуществления изобретения, связывание с продуктом комплемента C1q или рецептора Fc-гамма посредством связывающей молекулы в соответствии с этим изобретением устраняется за счет использования константного участка IgG1 с направленным мутагенезом от L к A в положениях

30 234 и 235 (соответствующие аминокислотам 117 и 118 SEQ ID №:283 человеческого IgG1, и SEQ ID №:284 человеческого IgG1KO).

В уровне техники были дополнительно разработаны антитела, которые стали универсальными инструментами в медицине и технологии. Таким образом, в контексте настоящего изобретения термины “молекула антитела” или

“антитело” (используемые в этой заявке как синонимы) включают не только антитела, которые могут быть обнаружены в природе, содержащие, например, две легкие цепи и/или две тяжелые цепи, или только две тяжелые цепи, как у видов верблюдовых, но, кроме того, охватывает все молекулы, содержащие по меньшей мере один паратоп со специфичностью связывания с антигеном и структурным сходством с переменным доменом иммуноглобулина.

Таким образом, антитело может представлять собой моноклональное антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, фрагмент антитела, в частности, фрагмент Fv, Fab, Fab', или F(ab')₂, одноцепочечное антитело, в частности, одноцепочечный переменный фрагмент (scFV), малый модульный иммунофармацевтический препарат (SMIP, англ.: Small Modular Immunopharmaceutical), доменное антитело, нанотело, диатело.

Моноклональные антитела (mAb) представляют собой моноспецифические антитела, которые являются идентичными по аминокислотной последовательности. Они могут быть получены с помощью гибридной технологии из гибридной клеточной линии (которую называют гибридомой), представляющей собой клон слияния В-клетки, вырабатывающей специфические антитела, с клеткой миеломы (В-клеточный рак) (Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256:495-7.). В качестве альтернативы, моноклональные антитела могут быть получены посредством рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (Norderhaug L., Olafsen T., Michaelsen T.E., Sandlie I., (май, 1997 г.). "Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells". J. Immunol Methods 204 (1): 77-87; смотри также ниже).

Для применения у человека, часто желательно уменьшать иммуногенность антител, изначально полученных от другого вида, такого как мышь. Это можно сделать посредством конструирования химерных антител, или посредством процесса, называемого “гуманизациям”. В этом контексте, “химерное антитело” понимается как антитело, содержащее часть последовательности (например, переменный домен), полученную от одного вида (например, мыши), слитую с частью последовательности (например, константные домены), полученной от другого вида (например, человека). “Гуманизированное антитело” представляет собой антитело, содержащее переменный домен, изначально полученный от вида, не относящегося к человеку, причем определенные аминокислоты были

мутированы, с тем, чтобы получить общую последовательность этого
 переменного домена более схожей с последовательностью переменного
 домена человека. Способы химеризации и гуманизации антител хорошо
 известны в данной области (Billette R., Lobuglio A.F. "Chimeric antibodies". *Int*
 5 *Rev Immunol.* 1993;10(2-3):165-76; Riechmann L., Clark M., Waldmann H., Winter
 G. (1988). "Reshaping human antibodies for therapy". *Nature*: 332:323).

Кроме того, были разработаны технологии для создания антител на основе
 последовательностей, полученных из генома человека, например, посредством
 фагового дисплея или посредством использования трансгенных животных
 10 (WO 90/05144; D. Marks, H.R Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty,
 A.D. Griffiths и G. Winter (1991) "By-passing immunisation. Human antibodies from
 V-gene libraries displayed on phage." *J. Mol. Biol.* 222, 581-597; Knappik и др.
J. Mol. Biol. 296: 57-86, 2000; S. Carmen и L. Jermutus, "Concepts in antibody
 phage display". *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 2002 1(2):189-203;
 15 Lonberg N., Huszar D. "Human antibodies from transgenic mice". *Int Rev Immunol.*
 1995;13(1):65-93.; Brüggemann M., Taussig M.J. "Production of human antibody
 repertoires in transgenic mice". *Curr Opin Biotechnol.* 1997 Aug;8(4):455-8.). Такие
 антитела представляют собой "человеческие антитела" в контексте настоящего
 изобретения.

20 Антитело также может включать в себя фрагменты иммуноглобулинов,
 которые сохраняют антигенсвязывающие свойства, такие как фрагменты Fab,
 Fab', или F(ab')₂. Такие фрагменты могут быть получены посредством
 фрагментации иммуноглобулинов, например, протеолитическим расщеплением,
 или посредством рекомбинантной экспрессии таких фрагментов. Например,
 25 расщепление иммуноглобулина может быть выполнено с помощью обычных
 методов, например, посредством применения папаина или пепсина
 (WO 94/29348). Расщепление папаином антител обычно дает два идентичных
 антигенсвязывающих фрагмента, так называемых Fab-фрагмента, каждый из
 которых имеет один сайт связывания антигена, и остаточный Fc-фрагмент.
 30 Обработка пепсином обеспечивает F(ab')₂. В молекулах Fab, каждый из
 переменных доменов слиты с константным доменом иммуноглобулина,
 предпочтительно человеческого происхождения. Таким образом, переменный
 домен тяжелой цепи может быть слит с доменом CH1 (так называемый Fd-
 фрагмент), и переменный домен легкой цепи может быть слит с доменом CL.

Молекулы Fab могут быть получены посредством рекомбинантной экспрессии соответствующих нуклеиновых кислот в клетках-хозяевах, смотри ниже.

5 Был разработан ряд технологий для помещения переменных доменов иммуноглобулинов, или молекул, полученных из таких переменных доменов, в другой молекулярный контекст. Указанные молекулы представляют собой “иммуноглобулиноподобные” молекулы в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых случаях, указанные иммуноглобулиноподобные молекулы могут быть меньше по размеру по сравнению с встречающимися в природе иммуноглобулинами, и, например, могут содержать одну цепь 10 аминокислот или несколько цепей аминокислот. Например, одноцепочечный переменный фрагмент (scFV) представляет собой слияние переменных участков тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов, соединенных вместе посредством короткого линкера, обычно серина (S) или глицина (G) (WO 88/01649; WO 91/17271; Huston et al; International Reviews of Immunology, том 10, 1993, 195 - 217). “Однодоменные антитела” или “нанотела” содержат сайт связывания антигена в одном Ig-подобном домене (WO 94/04678; WO 03/050531, Ward и др. Nature. 1989 г, окт. 12;341 (6242):544-6; Revets и др. Expert Opin Biol Ther. 5(1):111-24, 2005). Один или большее количество однодоменных антител со специфичностью связывания в отношении того же или 20 другого антигена могут быть соединены вместе. Диатела представляют собой двухвалентные молекулы антител, состоящих из двух цепей аминокислот, содержащих два переменных домена (WO 94/13804, Holliger и др. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 г., июль 15;90(14):6444-8). Другие примеры антителоподобных молекул представляют собой антитела суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF; Srinivasan и Roeske, Current Protein Pept. Sci. 2005, 6(2): 185-96). Другая концепция приводит к так называемому малому модульному иммунофармацевтическому препарату (SMIP), содержащему домен Fv, соединенный с одноцепочечным шарнирным и эффекторным доменами, не имеющими константного домена CH1 (WO 02/056910).

30 Что касается настоящего изобретения, первый аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, имеющую по меньшей мере один сайт связывания антигена, который специфически связывается с CD137 (4-1BB, TNFRSF9), и по меньшей мере один сайт

связывания антигена, который специфически связывается с белком активации фибробластов (FAP).

В одном аспекте, иммуноглобулиноподобная связывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением связывается с антигенами-мишенями CD137 (4-1BB, TNFRSF9) или белком активации фибробластов (FAP) с аффинностью, определенной, например, посредством анализа поверхностного плазмонного резонанса (Malmqvist M. "Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics.", *Curr Opin Immunol.* 1993 г., апр.;5(2):282-6.), со значением KD в диапазоне от 1 пМ до 100 мкМ, предпочтительно от 1 пМ до 1 мкМ. Аффинность антител также может измеряться посредством применения технологии анализа кинетического исключения (KinExA) (Darling, R.J. и Brault P-A. "Kinetic exclusion assay technology: Characterization of Molecular Interactions." *ASSAY and Drug Development Technologies.* 2004 г., дек. 2(6): 647-657).

Как его используют в этой заявке, термин "связывание" или "специфичное связывание" относится к связыванию антитела и/или иммуноглобулиноподобной молекулы с эпитопом антигена в исследовании *in-vitro*, предпочтительно в исследовании поверхностного плазмонного резонанса (SPR, BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Швеция). Аффинность связывания определяется терминами k_{on} (константа скорости ассоциации антитела из комплекса антитело/антиген), k_{off} (константа диссоциации), и KD (k_{off}/k_{on}). Специфичное связывание обычно относится к образованию комплекса между молекулой рецептора и его лигандами. В контексте связывания антитело-антиген, высокоаффинные антитела обычно связывают их антигены-мишени с аффинностью 10^{-9} М или менее.

“Антитело, которое специфически связывается с CD137” или “иммуноглобулиноподобная связывающая молекула, которая специфически связывается с CD137” или “антитело, которое специфически связывается с FAP” или “иммуноглобулиноподобная связывающая молекула, которая специфически связывается с FAP” относится к молекулам, которые способны связываться с достаточной аффинностью, так, что антитело и/или иммуноглобулиноподобная связывающая молекула является полезным в качестве диагностического и/или терапевтического агента при нацеливании на CD137 или FAP, соответственно. В одном варианте осуществления, степень связывания анти-CD137

антигенсвязывающей молекулы с неродственным, не относящимся к CD137 белком, составляет менее, чем приблизительно 10 % связывания антитела и/или иммуноглобулиноподобной связывающей молекулы с CD137, как установлено, например, посредством радиоиммунологического исследования (RIA) или

5 проточной цитометрии (FAC). В некоторых вариантах осуществления, антитело и/или иммуноглобулиноподобная связывающая молекула, которая связывается с CD137, имеет константу диссоциации (Kd), составляющую ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ, $\leq 0,001$ нМ. Подобным образом, в одном варианте осуществления, степень связывания анти-FAP антитела с

10 неродственным, не относящимся к FAP белком, составляет менее, чем приблизительно 10 % связывания антитела и/или иммуноглобулиноподобной связывающей молекулы с FAP, как установлено, например, посредством радиоиммунологического исследования (RIA) или проточной цитометрии (FAC). В некоторых вариантах осуществления, антитело и/или

15 иммуноглобулиноподобная связывающая молекула, которая связывается с FAP, имеет константу диссоциации (Kd), составляющую ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ, $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-6} М или менее, от 10^{-50} М до 10^{-13} М, например, 10^{-8} М - 10^{-10} М).

Аффинность связывания молекулы антитела может повышаться вследствие

20 процесса, известного как созревание аффинности (Marks и др. 1992, Biotechnology 10:779-783; Barbas, и др. 1994, Proc. Nat. Acad. Sci, США 91:3809-3813; Shier и др. 1995, Gene 169:147-155). Соответственно, антитела с созревшей аффинностью или и/или иммуноглобулиноподобные связывающие молекулы также включены в настоящее изобретение.

25 В дополнительном предпочтительном варианте осуществления, сайт связывания антигена, который специфически связывается с CD137 (4-1BB, TNFRSF9), является частью молекулы иммуноглобулина (Ig), и сайт связывания антигена, который специфически связывается с белком активации фибробластов (FAP), содержит один или большее количество связывающих элементов scFv, scFab, Fab или Fv. Предпочтительно, сайт связывания антигена, который

30 специфически связывается с белком активации фибробластов (FAP), содержит два scFv.

"Одноцепочечный Fv-фрагмент" (scFV) представляет собой полипептид, содержащий переменный домен антитела тяжелой цепи (VH), линкер, и

вариабельный домен антитела легкой цепи (VL), и причем указанные домены антитела и указанный линкер имеют один из следующих порядков в направлении от N-конца до C-конца: а) VH--линкер-VL, б) VL -линкер-VH,; и причем указанный линкер представляет собой полипептид, состоящий из 15 и 25 аминокислот, предпочтительно из 20 аминокислот, в длину.

Кроме того, указанные одноцепочечные молекулы Fab могут быть дополнительно стабилизированы посредством включения дисульфидных связей между доменами VH и VL, в пределах домена VH, или в пределах домена VL, посредством включения цистеиновых остатков. Термин N-конец обозначает первую аминокислоту полипептидной цепи, в то время как термин C-конец обозначает последнюю аминокислоту C-конца полипептидной цепи. Следовательно, вариант осуществления изобретения представляет собой вариант, в котором один или большее количество scFv содержит дополнительные цистеиновые остатки для образования дисульфидных связей.

Как продемонстрировано в приведенных ниже примерах, изобретатели показали, что scFv FAP, имеющий ориентацию VL-VH от N-конца к C-концу, может функционировать в связывающих молекулах в соответствии с изобретением с тем, чтобы индуцировать сшивание CD137 в клетках-мишенях. В то время как scFv FAP, имеющий ориентацию VH-VL от N-конца к C-концу, также может функционировать, в это ориентации активность может уменьшаться. Следовательно, предпочтительный вариант осуществления изобретения представляет собой вариант, в котором порядок представляет собой ориентацию VL-VH от N-конца к C-концу.

Дополнительный предпочтительный вариант осуществления изобретения представляет собой вариант, в котором один или большее количество scFv слиты с молекулой Ig посредством пептидного линкера, предпочтительно пептидного линкера, имеющего длину, составляющую приблизительно 4 - 20 аминокислот. Предпочтительно scFv слит с C-концом тяжелой цепи молекулы Ig. Предпочтительно молекула Ig представляет собой IgG.

Способы соединения молекул scFv с C-концом тяжелой цепи молекулы IgG хорошо известны в данной области. Обычно, применяют небольшую линкерную последовательность аминокислот глицина и серина (которую называют GS-мини-линкер). Количество аминокислот в линкере может варьироваться, от четырех (4) (GGGS) (SEQ ID №:279), шести (6) (GGSGGS) (SEQ ID №:280),

десяти (10) (GGGGSGGGGS) (SEQ ID №:281), двадцати (20) (GGGGSGGGGS) (SEQ ID №:282) или более. На практике, обычно линкер образуется посредством объединения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес IgG (которая в данном случае будет включать в себя нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный домен тяжелой цепи сайта связывания CD137 (4-1BB, TNFRSF9)), с нуклеиновой кислотой, кодирующей желательный scFv (которая в данном случае будет включать в себя нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный домен тяжелой цепи сайта связывания белка активации фибробластов (FAP)), разделенных между собой посредством молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей линкерную последовательность. Затем, как дополнительно поясняется ниже, эту полную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую HC-scFv, помещают в вектор экспрессии и вводят в соответствующие клетки-хозяева таким образом, что образуется полный одиночный полипептид scFv тяжелой цепи IgG.

Предпочтительно GS-линкер представляет собой GGGGSGGGGS (SEQ ID №:282).

Иммуноглобулиноподобная связывающая молекула может быть слита (в виде слитого белка) или иным образом соединена (ковалентными или нековалентными связями) с другими молекулярными соединениями, оказывающими желательное влияние на свойства молекулы антитела. Например, может быть желательным улучшить фармакокинетические свойства молекул антитела, например, стабильность в жидкостях организма, таких как кровь, в частности, в случае одноцепочечных антител или доменных антител. В этом отношении был разработан ряд технологий, в частности, предназначенных для продления периода полувыведения таких молекул антител в кровотоке, таких как пегилирование (WO 98/25971; WO 98/48837; WO 2004081026), слияние или иное ковалентное присоединение молекулы антитела к другой молекуле антитела, обладающей аффинностью к сывороточному белку, такому как альбумин (WO 2004041865; WO 2004003019), или экспрессия молекулы антитела в качестве слитого белка со всем или с частью сывороточного белка, такого как альбумин или трансферрин (WO 2001079258).

Поскольку Fc-участок встречающегося в природе антитела взаимодействует с рядом Fc-рецепторов, что приводит к ряду важных функциональных

возможностей (которые называют “эффекторными функциями”).

Иммуноглобулиноподобная связывающая молекула в соответствии с изобретением содержит часть Fc-участка, который был сконструирован таким образом, чтобы предупредить непредусмотренное сшивание растворимыми Fc-гамма-рецепторами или компонентом C1q. В одном варианте осуществления, такой вариант антитела имеет намного более низкую аффинность к Fc-гамма-рецепторам и компоненту C1q, чем родительское антитело. Следовательно, вариант осуществления изобретения представляет собой вариант, в котором молекула Ig содержит вариант Fc, имеющий пониженную аффинностью к Fc-гамма-рецепторам или к рецепторам компонента, или к обоим, по сравнению с Fc-участком дикого типа.

Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой вариант, в котором связывающая молекула в соответствии с изобретением содержит Fc-участок, или его соответствующую часть, которые были сконструированы для изменения уровней в сыворотке (периода полувыведения) посредством оптимизации его взаимодействия с неонатальным Fc-рецептором (FcRn).

Способы получения сайтов связывания, которые связываются со специфическими антиген-мишенями, хорошо известны в данной области. Специалист в данной области может легко применять указанные способы для создания сайта связывания, обладающего необходимой специфичностью в отношении антиген-мишеней CD137 (4-1BB, TNFRSF9) или белка активации фибробластов (FAP).

Способы получения антитела и фрагментов антител хорошо известны в данной области. Например, антитела могут быть получены любым из нескольких способов, в которых используется индукция получения молекул антител *in vivo*, скрининг библиотек иммуноглобулинов (Orlandi и др., 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:3833-3837; Winter и др. 1991, Nature 349:293-299), или продуцирование молекул моноклональных антител клеточными линиями в культуре. Указанное включает, но не ограничивается ими, метод гибридомы, метод гибридомы В-клеток человека, и метод гибридомы вируса Эпштейна-Барра (EBV) (Kohler и др. 1975. Nature 256:495-497; Kozbor и др. 1985. J. Immunol. Methods 81 :31 -42; Cote и др. 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. США 80:2026-2030; Cole и др. 1984. Mol. Cell. Biol. 62:109-120).

Применяя указанные способы, специалист в данной области будет обычным образом получать антитела, имеющие сайт связывания с необходимой специфичностью в отношении антиген-мишеней CD137 (4-1BB, TNFRSF9) или белка активации фибробластов (FAP). Выделение связывающих доменов из таких антител является обычной практикой, и более того, дополнительные сведения о способах, которые могут при этом применяться, представлены в приведенных ниже примерах.

Настоящие изобретатели получили специфичные к CD137 (4-1BB, TNFRSF9) / белку активации фибробластов (FAP) иммуноглобулиноподобные связывающие молекулы в соответствии с изобретением, перечисленные ниже, применяя типичные сайты связывания антигена в отношении CD137 и FAP, которые обсуждаются в приведенных ниже примерах.

В качестве неограничивающих примеров, биспецифические молекулы были получены посредством применения типичных сайтов связывания антигена, специфичных в отношении CD137 (4-1BB, TNFRSF9), которые представляют собой CD137 #1, CD137 #2, CD137 #3, CD137 #4, CD137 #5, CD137 #6, CD137 #7, CD137 #8, CD137 #9, и CD137 #10.

В качестве неограничивающих примеров, биспецифические молекулы были получены посредством применения типичных сайтов связывания антигена, специфичных в отношении белка активации фибробластов (FAP), названных FAP #1, FAP #2, FAP #3, FAP #4, и FAP #5.

Аминокислотные последовательности специфичных сайтов связывания антигена представлены в описании и в перечне последовательностей.

Ниже представлены подробности предпочтительных вариантов осуществления изобретения, которые содержат специфичные сайты связывания в отношении CD137 (4-1BB, TNFRSF9) или белка активации фибробластов (FAP).

Во избежание сомнений, каждый из конкретных вариантов осуществления, перечисленных ниже для первого аспекта изобретения, также может рассматриваться как независимый аспект изобретения.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат

аминокислотные последовательности SEQ ID №:290 (CDR1), SEQ ID №:8 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и при этом CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:12 (CDR1), SEQ ID №:13 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #1. Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:10, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:15. В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #1.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:18 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:22 (CDR1), SEQ ID №:23 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #2.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:20, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:25. В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #2.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:28 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:32 (CDR1), SEQ ID №:33 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена,

специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #3. Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:30, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:35. В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #3.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:38 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:42 (CDR1), SEQ ID №:43 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #4.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:40, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:45. В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #4. В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:48 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:52 (CDR1), SEQ ID №:53 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #5. Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:50, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную

последовательность SEQ ID №:55. В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #5.

5 В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:58 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные
10 последовательности SEQ ID №:62 (CDR1), SEQ ID №:63 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #6.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий
15 аминокислотную последовательность SEQ ID №:60, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:65. В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #6. В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт
20 связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:68 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:72
25 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #7.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий
30 аминокислотную последовательность SEQ ID №:70, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:75. В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #7.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:78 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:72 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #8.

10 Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:80, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:85. В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #8. В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:88 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93, (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #9. Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:90, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:95. В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #9. В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:98

(CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #10.

5 Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:100, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:105. В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #10.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:108 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:111 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #1. Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:106, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:110. В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #1. В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2. Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении

FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:115, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:119. В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2. В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3. Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:124, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:128. В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3. В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:328 (CDR1), SEQ ID №:135 (CDR2) и SEQ ID №:136 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #4. Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:133, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:137. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #4. В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт

связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:333 (CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:142, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:146. В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:290 (CDR1), SEQ ID №:8 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:12 (CDR1), SEQ ID №:13 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:108 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:111 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #,1 и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #1. Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:10, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:15, и сайт связывания антигена, специфичный в

отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:106, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:110. В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #1, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #1. В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:68 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:72 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:108 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:111 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #7, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #1. Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:70, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:75, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:106, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:110. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #7, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #1.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в

отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:290 (CDR1), SEQ ID №:8 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:12 (CDR1), SEQ ID №:13 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:328 (CDR1), SEQ ID №:135 (CDR2) и SEQ ID №:136 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #1, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #4. Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:10, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:15, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:133, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:137. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #1, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP # 4. В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:68 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:72 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности

SEQ ID №:328 (CDR1), SEQ ID №:135 (CDR2) и SEQ ID №:136 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #7, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #4.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:70, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:75, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:133, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:137. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #7, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #4.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:18 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:22 (CDR1), SEQ ID №:23 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:333 (CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #2, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:20, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:25, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:142, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:146. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #2, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP # 5. В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:18 (CDR2) и SEQ ID №:19 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:22 (CDR1), SEQ ID №:23 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #2, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:20, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:25, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:115, и переменный участок легкой цепи,

содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:119. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #2, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2.

5 В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:18
10 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:22 (CDR1), SEQ ID №:23 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности
15 SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #2, и сайт связывания антигена, специфичный в
20 отношении FAP, представляет собой FAP #3.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:30, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:35, и
25 сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:124, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:128. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении
30 CD137, представляет собой CD137 #2, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP # 3.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и

вариабельный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:28 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:32 (CDR1), SEQ ID №:33 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:333 (CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #3, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

Предпочтительно сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:30, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:35, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:142, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:146. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #3, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:28 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:32 (CDR1), SEQ ID №:33 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности

SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #3, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:30, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:35, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:115, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:119. В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #3, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP # 2.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:28 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:32 (CDR1), SEQ ID №:33 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #3, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:30, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:35. И при этом сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:124, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:128. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #3, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:38 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:42 (CDR1), SEQ ID №:43 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:333 (CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #4, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP # 5.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:40, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:45, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:142, и переменный участок легкой цепи,

содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:146. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #4, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

5 В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:38
10 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:42 (CDR1), SEQ ID №:43 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности
15 SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #4, и сайт связывания антигена, специфичный в
20 отношении FAP, представляет собой FAP #2.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:40, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:45, и
25 сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:115, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:119. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении
30 CD137, представляет собой CD137 #4, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и

вариабельный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:38 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:42 (CDR1), SEQ ID №:43 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #4, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:40, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:45, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:124, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:128. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #4, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:48 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:52 (CDR1), SEQ ID №:53 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности

SEQ ID №:333 (CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #5, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:50, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:55, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:142, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:146. В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #5, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:48 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:52 (CDR1), SEQ ID №:53 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #5, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:50, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:55, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:115, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:119. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #5, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP # 2.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:48 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:52 (CDR1), SEQ ID №:53 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #5, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:50, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:55, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:124, и переменный участок легкой цепи,

содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:128. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #5, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3.

5 В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:58
10 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:62 (CDR1), SEQ ID №:63 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности
15 SEQ ID №:333 (CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #6, и сайт связывания антигена, специфичный в
20 отношении FAP, представляет собой FAP #5.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:60, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:65, и
25 сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:142, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:146. В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении
30 CD137, представляет собой CD137 #6, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и

вариабельный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:58 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:62 (CDR1), SEQ ID №:63 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #6, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:60, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:65, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:115, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:119. В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #6, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:58 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:62 (CDR1), SEQ ID №:63 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности

SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #6, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:60, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:64, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:124, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:128. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 # 6, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:78 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:72 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:333 (CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #8, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:80, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:85, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:142, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:146. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #8, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:78 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:72 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #8, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:80, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:85, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:115, и переменный участок легкой цепи,

содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:119. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #8, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2.

5 В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:78
10 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:72 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности
15 SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #8, и сайт связывания антигена, специфичный в
20 отношении FAP, представляет собой FAP #3.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:80, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:85, и
25 сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:124, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:128. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении
30 CD137, представляет собой CD137 #8, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и

вариабельный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:88 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:333 (CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3). В этом варианте осуществления, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #9, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:90, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:95, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:142, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:146. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #9, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:88 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности

SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #9, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:90, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:95, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:115, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:119. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #9, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:88 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #9, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:90, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:95, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:124, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:128. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #9, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3. В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:98 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:333 (CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #10, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:100, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:105, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:142, и переменный участок легкой цепи,

содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:146. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #10, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

5 В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:98
10 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности
15 SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #10, и сайт связывания антигена, специфичный в
20 отношении FAP, представляет собой FAP #2.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:100, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:105, и
25 сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:115, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:119. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении
30 CD137, представляет собой CD137 #10, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2.

В предпочтительном варианте осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит переменный участок тяжелой цепи и

вариабельный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:98 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3), и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, причем CDR тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3). В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #10, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3.

Предпочтительно, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:100, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:105, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:124, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID №:128. В этом варианте осуществления сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #10, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3. Изложенное выше представляет собой конкретные комбинации сайтов связывания антигена, специфичных в отношении CD137 и FAP, которые могут применяться в связывающей молекуле в соответствии с изобретением.

В каждом из указанных вариантов осуществления, вариабельная тяжелая цепь, содержащая сайт связывания антигена CD137, слита с константным участком тяжелой цепи человека. Например, IgG, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE или IgM. Предпочтительно применяют константный участок тяжелой цепи IgG1 человека.

Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой вариант, в котором вариабельная легкая цепь, содержащая сайт связывания

антигена CD137, слита с константным участком легкой цепи человека каппа или лямбда. Предпочтительно, применяют константный участок легкой цепи человека каппа.

5 Пример последовательностей константного участка тяжелой цепи IgG1 человека дикого типа представлен в SEQ ID №: 283, КО IgG1 представлен в SEQ ID №:284.

Пример последовательности константного участка легкой цепи человека каппа представлен в SEQ ID №:285.

10 Ниже представлены связывающие молекулы в соответствии с изобретением. Каждая из специфичных молекул в соответствии с изобретением содержит модифицированные молекулы иммуноглобулина, в которых тяжелая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность

15 варибельного домена тяжелой цепи, который специфически связывается с CD137, а также scFv, который специфически связывается с FAP, и легкую цепь антитела, которая содержит аминокислотную последовательность варибельного домена легкой цепи, который специфически связывается с CD137.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую

20 аминокислотную последовательность SEQ ID №:151, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:152. В этом аспекте, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #1, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #1.

25 Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:153, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:154. В этом

30 аспекте, сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #7, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #1.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь

иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:155, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:156. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #1, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #4.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:157, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:158. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #7, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #4.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:159, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:160. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #2, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:164, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:165. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #2, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:169, и легкую цепь,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:170. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #2, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3.

5 Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:174, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:175. В этом
10 аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #3, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

 Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь
15 иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:179, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:180. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #3, и сайт связывания антигена, специфичный в
20 отношении FAP, представляет собой FAP #2.

 Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:184, и легкую цепь,
25 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:185. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #3, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3.

 Дополнительный аспект изобретения обеспечивает
30 иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:189, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:190. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137,

представляет собой CD137 #4, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:194, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:195. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #4, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:199, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:200. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #4, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:204, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:205. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #5, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:209, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:210. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #5, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:214, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:215. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #5, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:219, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:220. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #6, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:224, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:225. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #6, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:229, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:230. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #6, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь

иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:234, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:235. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #8, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #5.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:239, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:240. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #8, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:244, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:245. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #8, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:249, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:250. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #9, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой #5.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:254, и легкую цепь,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:255. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #9, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2.

5 Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:259, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:260. В этом
10 аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #9, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3.

 Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь
15 иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:264, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:265. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #10, сайт связывания антигена, специфичный в
20 отношении FAP, представляет собой FAP #5.

 Дополнительный аспект изобретения обеспечивает иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:269, и легкую цепь,
25 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:270. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137, представляет собой CD137 #10, и сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #2.

 Дополнительный аспект изобретения обеспечивает
30 иммуноглобулиноподобную связывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем С-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:274, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:275. В этом аспекте сайт связывания антигена, специфичный в отношении CD137,

представляет собой CD137 #10, сайт связывания антигена, специфичный в отношении FAP, представляет собой FAP #3.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют связывающую молекулу в соответствии с
5 изобретением или вектор экспрессии, содержащий такую молекулу нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления, связывающие молекулы в соответствии с изобретением содержат полипептиды тяжелой цепи и легкой цепи антитела. Как может понять специалист в данной области, могут быть
10 легко получены молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептиды тяжелой цепи, полипептиды легкой цепи, или полипептиды тяжелой цепи и полипептиды легкой цепи.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь, могут быть синтезированы химически и ферментативно посредством
15 полимеразной цепной реакции (ПЦР) посредством применения стандартных методов. Прежде всего, подходящие олигонуклеотиды могут быть синтезированы методами, известными в данной области (например, Gait, 1984), которые могут применяться для получения синтетического гена. Методы получения синтетических генов из олигонуклеотидов известны в данной области
20 (например, Stemmer и др., 1995; Ye и др., 1992; Hayden и Mandecki, 1988; Frank и др., 1987).

Молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением включают, но не ограничиваются ими, молекулы ДНК, кодирующие последовательности полипептидов, показанные в перечне последовательностей. Кроме того,
25 настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, которые гибридизируются до молекул ДНК, кодирующих последовательности полипептидов, показанные в перечне последовательностей, в условиях высокая строгости связывания и промывки, как определено в WO 2007/042309. Предпочтительными молекулами (с точки зрения мРНК) являются те молекулы,
30 которые имеют по меньшей мере 75 % или 80 % (предпочтительно по меньшей мере 85 %, более предпочтительно по меньшей мере 90 %, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95 %) гомологии или идентичности последовательности с одной из молекул ДНК, описанных в этой заявке. В качестве примера, принимая во внимание экспрессию антител в эукариотических

клетках, последовательности ДНК, показанные в перечне последовательностей, были сконструированы для соответствия использованию кодонов в эукариотических клетках. Если желательно экспрессировать антитела в *E. coli*, указанные последовательности можно изменить таким образом, чтобы они соответствовали использованию кодонов *E. coli*. Варианты молекул ДНК в соответствии с изобретением могут быть сконструированы несколькими различными способами, как описано, например, в WO 2007/042309.

Как его используют в этой заявке, термины "идентичные" или "процент идентичности," в контексте двух или большего количества нуклеиновых кислот или последовательностей полипептидов, относятся к двум или большему количеству последовательностей или субпоследовательностей, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании на предмет максимального соответствия. Для определения процента идентичности, последовательности выравниваются для целей оптимального сравнения (например, в первую последовательность аминокислоты или последовательность нуклеиновой кислоты для оптимального выравнивания со второй последовательностью аминокислоты или нуклеиновой кислоты могут вводиться пробелы). Затем сравниваются аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или положениях нуклеотидов. Если положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы в этом положении идентичны. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для этих последовательностей (то есть, % идентичности = количество идентичных положений/общее количество положений (например, совпадающих положений) x100). В некоторых вариантах осуществления, две сравниваемые последовательности имеют одинаковую длину, после того как в последовательности введены пробелы, если это необходимо (например, исключая дополнительную последовательность, выходящую за пределы последовательностей, которые сравнивают). Например, при сравнении последовательностей переменных участков, не учитываются последовательности лидерного и/или константного домена. Для сравнения

последовательностей между двумя последовательностями, "соответствующий" CDR относится к CDR в том же месте в обеих последовательностях (например, CDR-H1 каждой последовательности).

5 Определение процента идентичности или процента сходства между двумя последовательностями может быть выполнено посредством использования математического алгоритма. Предпочтительным, неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Карлина и Альтшуля, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. США 87:2264-2268, модифицированного, как у Karlin and Altschul, 10 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. США 90:5873-5877. Такой алгоритм включен в компьютерные программы NBLAST и XBLAST, как описано у Altschul и др. 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Поиски нуклеотидов BLAST могут быть выполнены посредством применения компьютерной программы NBLAST, оценка=100, длина слова=12, для получения нуклеотидных последовательностей, 15 гомологичных нуклеиновой кислоте, кодирующей представляющий интерес белок. Поиски белков BLAST могут быть выполнены посредством применения компьютерной программы XBLAST, оценка=50, длина слова=3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных представляющему интерес белку. Для получения выравниваний с пробелами для целей сравнения, может 20 применяться компьютерная программа Gapped BLAST, как описано у Altschul и др., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. В качестве альтернативы, для выполнения итерационного поиска, который обнаруживает отдаленные отношения между молекулами (там же), может применяться PSI-Blast. При использовании компьютерных программ BLAST, Gapped BLAST, и PSI-Blast, 25 могут применяться параметры соответствующих компьютерных программ (например, XBLAST и NBLAST) по умолчанию. Другим предпочтительным, неограничивающим примером математического алгоритма, который использовали для сравнения последовательностей, является алгоритм Майерса и Миллера, CABIOS (1989). Такой алгоритм включен в компьютерную программу 30 ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программного обеспечения для выравнивания последовательностей GCG. При использовании для сравнения аминокислотных последовательностей компьютерной программы ALIGN, может применяться таблица весовых остатков PAM 120, штраф за длину пробела, составляющей 12, и штраф за пробел, составляющей 4. В данной области

известны дополнительные алгоритмы для анализа последовательностей, включая ADVANCE и ADAM, как описано у Torellis and Robotti, 1994, *Comput. Appl. Biosci.* 10:3-5; а также FASTA, описанный у Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 85:2444-8. В FASTA, параметр *ktup* является контрольным параметром, который устанавливает чувствительность и скорость поиска. Если *ktup*=2, то подобные участки в двух сравниваемых последовательностях находят с помощью поиска пар выровненных остатков; если *ktup*=1, анализируют одиночные выровненные аминокислоты. Параметр *ktup* может быть установлен на 2 или 1 для последовательностей белка, или от 1 до 6 для последовательностей ДНК. Если *ktup* не определен, то значение по умолчанию составляет 2 для белков и 6 для ДНК. В качестве альтернативы, выравнивание последовательности белков может выполняться, применяя алгоритм CLUSTAL W, как описано у Higgins и др. 1996, *Methods Enzymol.* 266:383-402.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает способ получения связывающей молекулы в соответствии с одним из предыдущих пунктов, который включает:

- (а) культивирование клетки-хозяина в соответствии с изобретением в условиях, обеспечивающих экспрессию молекулы; и,
- (б) выделение молекулы.

Вариант осуществления этого аспекта изобретения представляет собой вариант, в котором способ получения дополнительно включает стадию (в) последующей очистки и/или модифицирования и/или включения связывающей молекулы в соответствии с изобретением в композицию.

Для получения связывающих молекул в соответствии с изобретением, молекулы ДНК, кодирующей полноразмерные легкие и/или тяжелые цепи или их фрагменты, вставляются в вектор экспрессии таким образом, чтобы последовательности функционально соединялись с последовательностями контроля транскрипции и трансляции.

Для получения антител в соответствии с изобретением, квалифицированный специалист может выбирать из большого разнообразия систем экспрессии, хорошо известных в данной области, например, систем экспрессии, которые рассмотрены у Kirgjanov и Le Gall, 2004.

Векторы экспрессии включают плазмиды, ретровирусы, космиды, происходящие из EBV эписомы, и подобные. Вектор экспрессии и

последовательности контроля экспрессии выбраны таким образом, чтобы быть совместимыми с клеткой-хозяином. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела могут вставляться в отдельные векторы. В некоторых вариантах осуществления, обе последовательности ДНК вставляются в один и тот же вектор экспрессии. Подходящими являются векторы, которые кодируют функционально полную последовательность СН или СL иммуноглобулина человека, с соответствующими сайтами рестрикции, сконструированными таким образом, что любая последовательность VH или VL может легко вставляться и экспрессироваться, как описано выше. Обычно, константная цепь является каппа или лямбда цепью в случае легкой цепи антитела, в случае же тяжелой цепи антитела, она может, без ограничения, быть любым изотипом IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) или другим иммуноглобулином, включая аллельные варианты.

Рекомбинантный вектор экспрессии также может кодировать сигнальный пептид, который способствует секреции цепи антитела из клетки-хозяина. ДНК, кодирующая цепь антитела, может клонироваться в вектор таким образом, что сигнальный пептид связан в рамке генетического кода с аминоконцом ДНК цепи зрелого антитела. Сигнальный пептид может быть сигнальным пептидом иммуноглобулина или гетерологическим пептидом не относящегося к иммуноглобулину белка. В качестве альтернативы, последовательность ДНК, кодирующая цепь антитела, может уже содержать последовательность сигнального пептида.

В дополнение к последовательностям ДНК, кодирующим цепи антитела, рекомбинантные векторы экспрессии содержат регулирующие последовательности, включая промоторы, энхансеры, сигналы терминации и полиаденилирования, а также другие элементы контроля экспрессии, которые контролируют экспрессию цепей антитела в клетке-хозяине. Примерами промоторных последовательностей (приведенных в качестве примера в случае экспрессии в клетках млекопитающих) являются промоторы и/или энхансеры, полученные из CMV (*цитомегаловируса*) (такие как CMV Simian Virus 40 (*CMV-обезьяний вирус*) (SV40) (такой как промотор/энхансер SV40), аденовирус, (например, главный поздний промотор аденовируса (AdMLP)), полиома и сильные промоторы млекопитающих, такие как промоторы нативного иммуноглобулина и актина. Примерами сигналов полиаденилирования являются полиА BGH (*бычьего гормона роста*), поздний SV40 или ранний полиА; как

альтернатива, могут применяться 3'UTR (*untranslated regions: нетранслируемые области*) генов иммуноглобулина и т.д.

5 Рекомбинантные векторы экспрессии также могут содержать последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации), а также гены способного к селекции маркера. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть и/или кодирующей легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть молекулы в соответствии с изобретением, а также векторы, содержащие указанные молекулы ДНК, могут вводиться в клетки-10 хозяева, например, бактериальные клетки или высшие эукариотические клетки, например клетки млекопитающих, в соответствии с методами трансфекции, хорошо известными в данной области, включая опосредованную липосомами трансфекцию, опосредованную поликатионами трансфекцию, слияние протопластов, микроинъекции, преципитацию фосфатом кальция,15 электропорацию или перенос вирусными векторами.

Предпочтительно, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь и легкую цепь, присутствуют на двух векторах, которые котрансфицируются в клетку-хозяина, предпочтительно клетку млекопитающего.

20 Следовательно, дополнительный аспект изобретения обеспечивает клетку-хозяина, содержащую вектор экспрессии, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь, и вектор экспрессии, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь.

25 Линии клеток млекопитающих, доступных в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области, и включают, среди прочего, клетки яичника китайского хомячка (CHO, CHO-DG44), NSO, клетки SP2/0, клетки HeLa, клетки почки детеныша хомячка (ВНК), клетки почки обезьяны (COS), клетки карциномы человека (например, Нер G2), клетки A549, клетки 3Т3 или производные/потомства любой такой линии клеток. При этом могут30 применяться другие клетки млекопитающих, включая, но не ограничиваясь ими, линии клеток человека, мыши, крысы, обезьяны и грызунов, или другие эукариотические клетки, включая, но не ограничиваясь ими, клетки дрожжей, насекомых и клетки растений, или прокариотические клетки, такие как бактерии. Связывающую молекулу в соответствии с изобретением получают

посредством культивирования клеток-хозяев на протяжении периода времени, достаточного для обеспечения экспрессии связывающей молекулы в клетках-хозяевах.

Молекулы антитела предпочтительно выделяют из питательной среды в виде секретированного полипептида, или они могут выделяться из лизатов клеток-хозяев, если они, например, экспрессируется без секреторного сигнала. Молекулы антитела необходимо очищать, применяя стандартные методы очистки белков, применяемые для рекомбинантных белков и белков клеток-хозяев, таким образом, чтобы получить по сути гомогенные препараты антитела. В качестве примера, методы очистки в соответствии с уровнем техники, применимые для получения связывающих молекул в соответствии с изобретением, включают, в качестве первой стадии, удаление клеток и/или частиц клеточного дебриса из питательной среды или лизата. Затем антитело очищают от загрязняющих растворимых белков, полипептидов и нуклеиновых кислот, например, посредством фракционирования на иммуноаффинных или ионно-обменных колонках, осаждения этанола, обращенно-фазовой ВЭЖХ, хроматографией на сефадексе, хроматографией на силикагеле или на катионно-обменной смоле. В качестве конечной стадии в процессе получения CD137- и FAP-связывающей молекулы, очищенная молекула антитела может быть высушена, например, лиофилизована, как описано ниже для терапевтических применений.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает связывающую молекулу в соответствии с изобретением, предназначенную для применения в медицине.

В одном аспекте, изобретение относится к связывающей CD137/FAP молекуле, причем связывающая молекула проявляет по меньшей мере одно из следующих свойств:

(а) связывается с CD137 человека со значением K_D , составляющим 1×10^{-8} М или менее;

(б) связывается с CD137 человека и CD137 яванского макака;

(в) связывается с CD137 человека и яванского макака на эпитопе CRD3 или эпитопе CRD2/3

(г) блокирует связывание и/или конкурирует за связывание CD137 человека и яванского макака на эпитопе CRD3 или эпитопе CRD2/3 с любой из описанных в этой заявке антигенсвязывающих молекул;

(г) по сути не опосредует кластеризацию CD137 и активацию Т-клеток в отсутствие связывания FAP;

(д) повышает пролиферацию Т-клеток (в анализе смешанная реакция лимфоцитов (MLR: *mixed lymphocyte reaction*));

5 (е) повышает выработку интерферона гамма в анализе MLR;

(ж) повышает секрецию IL-2 в анализе MLR;

(з) не ингибирует связывание CD137 с CD137L;

(и) стимулирует антиген-специфичные ответы клеток памяти;

(к) стимулирует антитело-опосредованные иммунные ответы;

10 (л) подавляет рост опухолевых клеток *in vivo*; и

(м) не проявляет гепатотоксичности *in vivo*.

Предпочтительно, связывающая молекула в меньшей степени связывается с CD137 человека и яванского макака со значением K_D в диапазоне от 1×10^{-8} М до 1×10^{-10} М, и с белками FAP человека, яванского макака и мыши со значением K_D в диапазоне от 1×10^{-8} М до 1×10^{-10} М.

В еще одном аспекте, изобретение обеспечивает связывающую молекулу CD137/FAP, причем связывающая CD137 часть содержит вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, причем:

(а) вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 91 %, по меньшей мере на 92 %, по меньшей мере на 93 %, по меньшей мере на 94 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 96 %, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98 %, по меньшей мере на 99 % гомологична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №№: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, и 100;

(б) вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 91 %, по меньшей мере на 92 %, по меньшей мере на 93 %, по меньшей мере на 94 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 96 %, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98 %, по меньшей мере на 99 % гомологична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №№: 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95 и 105;

(в) антитело связывается с CD137 человека со значением K_D , составляющим 1×10^{-8} М или менее; и

(г) антитело по сути не опосредует активацию CD137 в отсутствие FAP.

Предпочтительные варианты осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением связываются с CD137 человека со значением K_D , составляющим 10^{-10} М, и с CD137 яванского макака со значением K_D , составляющим 10^{-10} М. Предпочтительные варианты осуществления связывающей молекулы в соответствии с изобретением связываются с FAP человека со значением K_D , составляющим 10^{-10} М, с FAP яванского макака со значением K_D , составляющим 10^{-10} М, и с FAP мыши со значением K_D , составляющим 10^{-9} М.

В еще одном аспекте, изобретение обеспечивает связывающую CD137 молекулу, причем переменный участок тяжелой цепи CD137 содержит аминокислотную последовательность, полученную из последовательности зародышевой линии IGHV3-7*01 человека; предпочтительно при этом связывающая CD137 молекула содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 78 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или на 100 % идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №№: 10, 20, 30, 40, 50, и 60.

В еще одном аспекте, изобретение обеспечивает связывающую CD137 молекулу, причем переменный участок легкой цепи CD137 содержит аминокислотную последовательность, полученную из последовательности зародышевой линии IGKV1-NL1*01 человека; предпочтительно при этом переменный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или на 100 % идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №№: 15, 25, 35, 45, 55, и 65.

В еще одном аспекте, изобретение обеспечивает связывающую FAP молекулу, причем переменный участок тяжелой цепи FAP содержит аминокислотную последовательность, полученную из последовательности зародышевой линии IGHV3-23*04 человека; предпочтительно при этом связывающая FAP молекула содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 78 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или на 100 % идентична

аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №№: 106, 115, 124, 133, или 142.

В еще одном аспекте, изобретение обеспечивает связывающую FAP молекулу, причем вариабельный участок легкой цепи FAP содержит
5 аминокислотную последовательность, полученную из последовательности зародышевой линии IGKV3-11*01 человека; предпочтительно при этом связывающая FAP молекула содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 78 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или на 100 % идентична
10 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №№: 110, 119, 128, 137, или 146.

В еще одном аспекте, изобретение обеспечивает CD137/FAP-связывающую молекулу, причем часть, связывающая FAP, включает в себя вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, причем:

15 (а) вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 91 %, по меньшей мере на 92 %, по меньшей мере на 93 %, по меньшей мере на 94 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 96 %, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98 %, по меньшей мере на 99 % гомологична
20 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №№: 106, 115, 124, 133, и 142;

(б) вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 91 %, по меньшей мере на 92 %, по меньшей мере на 93 %, по меньшей мере на
25 94 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 96 %, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98 %, по меньшей мере на 99 % гомологична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №№: 110, 119, 128, 137, и 146;

(в) антитело (а) и (б) связывается с CD137 человека со значением K_D , составляющим 1×10^{-7} М или менее; и

30 (г) антитело (а)-(в) по сути не связывается с CD137L или CD137 человека в отсутствие сшивания FAP.

В еще одном аспекте, изобретение обеспечивает CD137/FAP-связывающую молекулу, причем часть, связывающая FAP, включает в себя переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, причем:

(а) переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 91 %, по меньшей мере на 92 %, по меньшей мере на 93 %, по меньшей мере на 94 %; по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 96 %, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98 %, по меньшей мере на 99 % гомологична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №№: 106, 115, 124, 133, и 142;

(б) переменный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 91 %, по меньшей мере на 92 %, по меньшей мере на 93 %, по меньшей мере на 94 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 96 %, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98 %, по меньшей мере на 99 % гомологична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №№: 110, 119, 128, 137, и 146;

(в) антитело (а) и (б) связывает эпитоп на CD137 человека во внеклеточном CRD3-домене между аминокислотами 87-118 (SEQ ID №:352); или

(г) антитело (а) и (б) связывает эпитоп на CD137 человека во внеклеточном домене CRD 2-3 между аминокислотами 46-117 (SEQ ID №:356); и

(д) антитело (а)-(в) по сути не опосредует кластеризацию CD137 и активацию Т-клеток в отсутствие связывания FAP.

В предпочтительном варианте осуществления, CD137/FAP-связывающие молекулы, которые описаны выше, дополнительно имеют по меньшей мере одно из следующих свойств:

(а) антитело повышает пролиферацию Т-клеток (в анализе MLR);

(б) антитело повышает выработку интерферона гамма (в анализе MLR); или

(в) антитело повышает секрецию IL-2 (в анализе MLR).

Кроме того, или в качестве альтернативы, CD137/FAP-связывающие молекулы могут иметь одну или несколько других характеристик, перечисленных выше.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает связывающую молекулу в соответствии с изобретением, предназначенную для применения в лечении или

терапии рака. Как их используют в этой заявке, термины "лечение" или "терапия" (и их вариации, такие как "лечить" или "лечение", "терапевтический") относятся к клиническому вмешательству в попытке изменить естественное течение болезни у лица, проходящего лечения, и которое может осуществляться во время течения клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают, но не ограничиваются ими, ограничение распространения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, а также уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастаз, уменьшение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или временное улучшение состояния заболевания, а также ремиссию или улучшенный прогноз. В некоторых вариантах осуществления, молекулы в соответствии с изобретением применяют для задержки развития заболевания или для замедления прогрессирования заболевания. В одном аспекте изобретение применяют для лечения инфильтрованных Т-клетками/FAР-положительных опухолей. Предпочтительно, если рак представляет собой колоректальный рак (CRC) (например, колоректальную аденокарциному), рак желудка (GC) (например, аденокарциному желудка), рак поджелудочной железы (PAC) (например, аденокарциному поджелудочной железы), рак легкого (LC) (например, плоскоклеточную карциному легкого, аденокарциному легкого, немелкоклеточный рак легкого (НМКРК)), рак головы и шеи, уротелиальный рак, или меланому, хотя рассматриваются и другие солидные злокачественные новообразования, которые составляют 90 % всех типов рака, по причине неудовлетворенной клинической потребности в новых методах лечения указанных типов трудных для проникновения опухолей.

Как указано выше, изобретатели установили, что связывающая молекула в соответствии с изобретением является очень полезной для ограниченной FAР + ткань активации CD137 Т-клеток и для уничтожения опухоли и, таким образом, может применяться в терапии рака, который имеет совместно локализованную экспрессию как CD137 (4-1BB, TNFRSF9), так и белка активации фибробластов (FAР). Способы выявления того, имеет ли конкретная опухоль совместно локализованную экспрессию CD137 (4-1BB, TNFRSF9) и белка активации фибробластов (FAР), хорошо известны в данной области. Например, для определения того, экспрессирует ли опухолевая ткань CD137 (4-1BB, TNFRSF9) и белок активации фибробластов (FAР) и, следовательно, будет подходить для

лечения связывающей молекулой в соответствии с изобретением, может применяться иммуногистохимическое исследование.

CRC представляет собой отдельное злокачественные заболевание, включенное в МКБ-10, и являющееся одной из ведущих причин онкологической заболеваемости и смертности во всем мире. Приблизительно у 25 % пациентов, страдающих CRC, обнаруживают явные метастазы, и метастатическое заболевание развивается у 40-50 % впервые диагностированных пациентов. Хотя недавние улучшения в химиотерапии увеличили продолжительность выживания в случае метастатической CRC, большинство пациентов умирают от своего заболевания. Следовательно, существует большая потребность в дополнительных терапевтических агентах для лечения этого заболевания.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения или профилактики рака, причем способ включает введение человеку эффективного количества любой из CD137/FAP-связывающих молекул, которые описаны выше.

Предпочтительным механизмом применения является парентеральное применение, применение путем инфузии или инъекции (внутривенной, внутримышечной, подкожной, внутрибрюшинной, внутрикожной), но при этом также могут применяться другие способы применения, такие как ингаляция, трансдермальный, интраназальный, буккальный, оральный способ применения.

"Терапевтически эффективное количество" молекулы, предназначенной для введения, представляет собой минимальное количество, необходимое для профилактики, облегчения, или лечения клинических симптомов рака, в частности, минимальное количество, эффективное для указанных нарушений.

Диапазон доз антител в соответствии с изобретением, которые могут применяться в сутки, обычно составляет от 1 мкг/кг до 100 мг/кг, предпочтительно от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг.

Фактическое фармацевтически эффективное количество или терапевтическая доза, конечно, будет зависеть от факторов, известных специалистами в данной области, таких как возраст и вес пациента, способ введения и серьезность заболевания. В любом случае, комбинация будет вводиться в таких дозах и таким образом, чтобы позволить доставлять фармацевтически эффективное количество в зависимости от уникального состояния пациента.

Связывающие молекулы в соответствии с изобретением могут применяться сами по себе или в комбинации с другими фармакологически активными ингредиентами, такими как современные или стандартные соединения, применяемые для лечения, такие как, например, цитостатические или цитотоксические вещества, ингибиторы пролиферации клеток, ангиогенные вещества, стероиды, иммуномодуляторы / ингибиторы контрольных точек, и подобные.

Следовательно, дополнительный аспект изобретения обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую связывающую молекулу в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения, вместе с фармацевтически приемлемым носителем и необязательно одним или большим количеством дополнительных действующих веществ.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает связывающую молекулу в соответствии с изобретением, предназначенную для применения в терапии рака, причем указанная терапия содержит одно или большее количество фармакологически активных веществ.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело или антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию в соответствии с одним из вариантов осуществления антител против CD137/FAP, описанных выше, или применение антитела против CD137/FAP или соответствующего антигенсвязывающего фрагмента, предназначенных для применения в лечении заболевания, причем применение предназначено для лечения рака и/или опухолей.

Дополнительный аспект изобретения обеспечивает применение одного или большего количества действующих веществ при изготовлении лекарственного средства для терапии рака и/или опухолей, причем указанное лекарственное средство содержит связывающую молекулу в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения.

Цитостатические и/или цитотоксические активные вещества, которые могут вводиться в комбинации со связывающими молекулами в соответствии с изобретением, включают, не ограничиваясь ими, гормоны, аналоги гормонов и противогормоны, ингибиторы ароматазы, агонисты и антагонисты LHRH (*лютеинизирующего гормона*), ингибиторы факторов роста (например, таких факторов роста, как тромбоцитарный фактор роста (PDGF, англ.: *platelet derived*

growth factor), фактор роста фибробластов (FGF, англ.: *fibroblast growth factor*), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF, англ.: *vascular endothelial growth factor*), эпидермальный фактор роста (EGF, англ.: *epidermal growth factor*), инсулиноподобные факторы роста (IGF, англ.: *insulin-like growth factors*), эпидермальный фактор роста человека (HER, например, HER2, HER3, HER4) и фактор роста гепатоцитов (HGF, англ.: *hepatocyte growth factor*)), при этом ингибиторы представляют собой, например, антитела к ()фактору роста, антитела к рецептору ()фактора роста и ингибиторы тирозинкиназы, такие как, например, цетуксимаб, гефитиниб, афатиниб, нинтеданиб, иматиниб, лапатиниб, бозутиниб и трастузумаб; антиметаболиты (например, антифолаты, такие как метотрексат, ралтитрексед, аналоги пиримидина, такие как 5-фторурацил (5-FU), гемцитабин, иринотекан, доксорубицин, TAS-102, капецитабин и гемцитабин, пурин и аналоги аденозина, такие как меркаптопурин, тиогуанин, кладрибин и пентостатин, цитарабин (ага С), флударабин); противоопухолевые антибиотики (например, антрациклины); производные платины (например, цисплатин, оксаплатин, карбоплатин); агенты алкилирования (например, эстрамустин, меклоретамин, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, дакарбазин, циклофосфамид, ифосфамид, темозоломид, нитрозомочевины, такие как, например, кармустин и ломустин, тиотепа); антимитотические агенты (например, алкалоиды барвинка, например, такие как винбластин, виндесин, винорелбин и винкристин; и таксаны, такие как паклитаксел, доцетаксел); ингибиторы ангиогенеза, включая бевацизумаб, рамуцирумаб и афлиберцепт, ингибиторы тубулина; ингибиторы синтеза ДНК, ингибиторы PARP, ингибиторы топоизомеразы (например, эпиподофиллотоксины, например, такие как этопозид и этопофос, тенипозид, амсакрин, топотекан, иринотекан, митоксантрон), ингибиторы серина/треонинкиназы (например, ингибиторы PDK1, ингибиторы Raf, ингибиторы A-Raf, ингибиторы B-Raf, ингибиторы C-Raf, ингибиторы mTOR, ингибиторы mTORC1/2, ингибиторы PI3K, ингибиторы PI3K α , двойные ингибиторы mTOR/PI3K, ингибиторы STK33, ингибиторы АКТ, ингибиторы PLK1 (такие как воласертиб), ингибиторы CDK, включая ингибиторы CDK9, ингибиторы киназы Auroга), ингибиторы тирозинкиназы (например, ингибиторы PTK2/FAK), ингибиторы взаимодействия белок-белок, ингибиторы MEK, ингибиторы ERK, ингибиторы FLT3, ингибиторы BRD4, ингибиторы IGF-1R, Bcl-XL, ингибиторы Bcl-2, ингибиторы Bcl-2/Bcl-XL, ингибиторы рецепторов

ЕгбВ, ингибиторы BCR-ABL, ингибиторы ABL, ингибиторы Src, аналоги рапамицина (например, эверолимус, темсиролимус, ридафоролимус, сиролимус), ингибиторы синтеза андрогенов, ингибиторы рецепторов андрогенов, ингибиторы DNMT, ингибиторы HDAC, ингибиторы ANG1/2, ингибиторы CYP17, радиоактивные фармацевтические препараты, иммунотерапевтические агенты, такие как ингибиторы иммунных контрольных точек (например, связывающие молекулы / иммуноглобулины CTLA4, PD1, PD-L1, LAG3, и TIM3, такие как ипилимумаб, ниволумаб, пембролизумаб) и различные химиотерапевтические агенты, такие как амифостин, анагрелид, клодронат, филгастин, интерферон, интерферон альфа, лейковорин, ритуксимаб, прокарбазин, левамизол, месна, митотан, памидронат и порфирмер; ингибиторы протеасом, такие как Бортезомиб); миметики Smac и ВН3; агенты, восстанавливающие функциональность p53, включая антагонист mdm2-p53; ингибиторы сигнального пути Wnt/betA-Batenin; и/или ингибиторы циклин-зависимой киназы 9.

Все больше данных свидетельствует о том, что передача сигналов PD-1 является важным механизмом, используемым опухолями с тем, чтобы избежать противоопухолевого иммунного ответа (Dong, и др., 2002, Iwai и др., 2002; Shin and Ribas, 2015). Недавние клинические испытания с использованием моноклональных антител против PD-1 и PD-L1 продемонстрировали клинический отклик у некоторых пациентов с различными видами рака. Указанные ингибиторы иммунных контрольных точек блокируют взаимодействие между PD-1 и PD-L1 для восстановления сигнала стимуляции и поддержания активации Т-клеток, с большим количеством инфильтрующих опухоль Т-клеток (TIL), которые могут вызывать сильные иммунные реакции для элиминации раковых клеток. В такой ситуации, CD137/FAP-связывающие молекулы в соответствии с изобретением могут усиливать элиминацию раковых клеток посредством активации и/или рекрутирования и/или поддержания TIL в микроокружении опухоли. К сожалению, только меньшая часть всех пролеченных пациентов реагируют на современное иммунотерапевтическое лечение. Например, клетки колоректальной карциномы (CRC) экспрессируют меньше PD-L1, и при этом у Valentini и др. (Oncotarget, 2018) сообщили, что экспрессия PD-L1 в MSS CRC (микросателлитных стабильных (MSS) опухолях) в основном ограничивается инфильтрующими опухоль иммунными клетками.

Это может объяснить, почему пациенты, страдающие MSS CRC, не реагируют на анти-PD-1/PD-L1 терапию. Таким образом, первоочередной задачей стала разработка механизмов, которые могут потенциально повышать скорость ответа пациента.

5 Исследования позволяют предположить, что наличие инфильтрующих опухоль лимфоцитов (TIL) (то есть “горячие опухоли”) или отсутствие инфильтрующих опухоль лимфоцитов (TIL) (то есть, “холодные опухоли”) важны для прогнозирования реакции на терапию PD-1, коррелируя наличие TIL с лучшими результатами для пациентов во время различных противоопухолевых
10 терапий (Galon и др. 2006; Hwang и др. 2012; Mahmoud и др. 2011). Таким образом, один аспект этого изобретения относится к комбинации CD137/FAP-биспецифических молекул с механизмами, которые превращают “холодные” опухоли в “горячие”. Например, варианты осуществления изобретения сочетают иммунотерапию, которая может ослаблять ингибирование PDL-1 (и/или иным
15 образом преодолевать устойчивость к блокаде контрольных точек), с терапией CD137/FAP-биспецифическими молекулами, которые специфически нацеливаются на опухоли, экспрессирующие FAP+. С одной стороны, комбинация этих механизмов высвобождает ингибирование, в то же время увеличивая инфильтрацию новых Т-клеток в участок опухоли и/или способствуя
20 удержанию и активации Т-клеток в микроокружении опухоли, с другой стороны; двунаправленный подход. Комбинация таких механизмов приводит к лучшему контролю опухоли, чем любое лечение по отдельности.

Принимая во внимание указанное выше, особенно предпочтительными являются методы лечения связывающими CD137/FAP молекулами в
25 соответствии с изобретением в комбинации с лекарственным средством, выбранным из следующего:

(I) иммунотерапевтические агенты, включая агенты PD-1 и PD-L1, такие как пембролизумаб и ниволумаб, например, для лечения пациентов, страдающих CRC (что обсуждается ниже)

30 (II) антитела к SIRP α (например, любой антагонист SIRP, в частности, антитела, предпочтительно такие, которые раскрыты в WO 2017/178653, которые включены в эту заявку посредством ссылки, а также другие примеры, которые раскрыты в WO 20200068752 и WO 2019023347);

(III) Тс-связывающие молекулы (например, предпочтительно те, которые раскрыты в WO 2019234220 и EP 19201200.3)

(IV) вакцина KISIMA (например, предпочтительно вакцина, которая раскрыта в WO 2016/146260 и WO 2018/055060, и включена в эту заявку посредством ссылки);

(V) Онколитический вирус (например, предпочтительно вирус везикулярного стоматита со специфическим генным грузом или без него, такой как VSV-GP и VSV-CCL21, которые раскрыты в WO 2010/040526 и PCT/EP 2020/051701, соответственно, и которые включены в эту заявку посредством ссылки);

(VI) агонисты STING (например, предпочтительно те, которые раскрыты в WO 2018060323 и US 10 537 590, и включены в эту заявку посредством ссылки); и

(VII) химиотерапевтические препараты, применяемые для лечения CRC (включая 5-фторурацил, иринотекан, доксорубицин и TAS-102).

Ингибитор пути передачи сигналов PD-1 по смыслу этого изобретения и всех его вариантов осуществления представляет собой соединение, которое ингибирует взаимодействие PD-1 с его рецептором(-ами). Ингибитор пути передачи сигналов PD-1 способен нарушать путь передачи сигналов PD-1, предпочтительно опосредованный рецептором PD-1. Ингибитор PD-1 может быть любым ингибитором, направленным против любого члена пути передачи сигналов PD-1, способным противодействовать пути передачи сигналов PD-1. Ингибитор может представлять собой антагонистическое антитело, нацеливающееся на любой член пути передачи сигналов PD-1, предпочтительно направленное против рецептора PD-1, PD-L1 или PD-L2. Кроме того, ингибитор пути передачи сигналов может PD-1 представлять собой фрагмент рецептора PD-1 или рецептор PD-1, блокирующий активность лигандов PD1.

Антагонисты PD-1 хорошо известны в данной области, например, антагонисты, которые рассмотрены у Li и др. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1151 (которые включены в эту заявку посредством ссылки). Любой антагонист PD-1, в частности, антитела, такие как раскрытые у Li и др., а также дополнительные антитела, раскрытые в этой заявке ниже, могут применяться в соответствии с изобретением. Предпочтительно, антагонист PD-1 в соответствии с этим изобретением и все его варианты осуществления выбирают из группы,

состоящей из следующих антител: пембролизумаб (антитело против PD-1); ниволумаб (антитело против PD-1); пидилизумаб (антитело против PD-1); PDR-001 (антитело против PD-1); PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4, и PD1-5, предпочтительно VI-754019, которые раскрыты в этой заявке ниже (антитела против PD-1), атезолизумаб (антитело против PD-L1); авелумаб (антитело против PD-L1); дурвалумаб (антитело против PD-L1).

Пембролизумаб (ранее также известный как ламбролизумаб; торговое название Keytruda; также известный как МК-3475), раскрытый например, у Hamid O. и др. (2013) *New England Journal of Medicine* 369(2):134-44, представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG4, которое связывается с PD-1; он содержит мутацию в С228Р, предназначенную для предотвращения Fc-опосредованной цитотоксичности. Пембролизумаб, например, раскрыт в US 8 354 509 и WO 2009/114335. Он одобрен FDA (*Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов*) для лечения пациентов, страдающих нерезектабельной или метастатической меланомой, и пациентов, страдающих метастатическим НМКРК.

Ниволумаб (регистрационный номер CAS: 946414-94-4; BMS-936558 или MDX1106b) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG4, которое специфически блокирует PD-1, не обладающее при этом обнаруживаемой антитело-зависимой клеточной токсичностью (ADCC). Ниволумаб, например, раскрыт в US 8 008 449 и WO 2006/121168. Он был одобрен FDA для лечения пациентов, страдающих нерезектабельной или метастатической меланомой, метастатическим НМКРК и запущенной карциномой почек.

Пидилизумаб (СТ-011; компания Cige Tech) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG1k, которое связывается с PD-1. Пидилизумаб, например, раскрыт в WO 2009/101611.

PDR-001 или PDR001 представляет собой высокоаффинное, блокирующее лиганд, гуманизированное антитело IgG4 против PD-1, которое блокирует связывание PD-L1 и PD-L2 с PD-1. PDR-001 раскрыт в WO 2015/112900 и WO 2017/019896.

Антитела PD1-1 - PD1-5 представляют собой молекулы антител, определенные последовательностями, как показано в Таблице 4, где HC

обозначает (полноразмерную) тяжелую цепь, и LC обозначает (полноразмерную) легкую цепь:

Таблица 4:

SEQ ID №:	Название последовательности	Аминокислотная последовательность
652	HC PD1-1	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVRQAPGKLEWVAYISGGGGDITYSSSVKTRFTISRДHKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLG
653	LC PD1-1	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNWIYQKPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
654	HC PD1-2	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVRQAPGKLEWVAYISGGGGDITYSSSVKTRFTISRДHKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNPNYYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLG
655	LC PD1-2	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNWIYQKPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
656	HC PD1-3	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVRQAPGKLEWVAYISGGGGDITYSSSVKTRFTISRДHKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLG
657	LC PD1-3	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWIYQKPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
658	HC PD1-4	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVRQAPGKLEWVAYISGGGGDITYSSSVKTRFTISRДHKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLG
659	LC PD1-4	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWIYQKPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
660	HC PD1-5	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVRQAPGKLEWVAYISGGGGDITYSSSVKTRFTISRДHKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLG
661	LC PD1-5	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWIYQKPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

В частности, молекула антитела против PD-1, описанная в этой заявке выше, имеет:

(PD1-1) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:652, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:653; или

(PD1-2) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:654, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №: 655; или

(PD1-3) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:656, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:657; или

(PD1-4) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:658, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:659; или

(PD1-5) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:660, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:661.

Атезолизумаб (Tecentriq, также известный как MPDL3280A) представляет собой полученное из фага моноклональное антитело IgG1k человека, нацеливающееся на PD-L1, и описанное, например, у Deng и др., *mAbs* 2016;8:593-603. Он был одобрен FDA для лечения пациентов, страдающих на уротелиальную карциному.

Авелумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG1 против PD-L1, и описано, например, у Boyerinas и др., *Cancer Immunol. Res.* 2015; 3:1148-1157.

Дурвалумаб (MEDI4736) представляет собой моноклональное антитело IgG1k человека с высокой специфичность к PD-L1, и описано, например, у Stewart и др., *Cancer Immunol. Res.* 2015;3:1052-1062 или у Ibrahim и др., *Semin. Oncol.* 2015; 42:474-483.

В качестве альтернативы или в дополнение к упомянутым выше антагонистам, могут применяться дополнительные антагонисты PD-1, раскрытые у Li и др. (выше), или о которых известно, что они проходят клинические испытания, такие как AMP-224, MEDI0680 (AMP-514), REGN2810, BMS-936559,

JS001-PD-1, SHR-1210, BMS-936559, TSR-042, JNJ-63723283, MEDI4736, MPDL3280A, и MSB0010718C.

Предполагается, что МНН, используемые в этой заявке, также охватывают все биоподобные антитела, имеющие те же, или по сути те же, аминокислотные последовательности, что и исходное антитело, включая, но не ограничиваясь ими, биоподобные антитела, которые разрешены в соответствии с подпунктом (к) §262 главы 42 USC (*свод законов США*) в США и в соответствии с эквивалентными нормами в других юрисдикциях.

Антагонисты PD-1, перечисленные выше, известны в данной области, как и их соответствующее получение, терапевтическое применение и свойства.

В одном варианте осуществления антагонист PD-1 представляет собой пембролизумаб.

В другом варианте осуществления антагонист PD-1 представляет собой ниволумаб.

В другом варианте осуществления антагонист PD-1 представляет собой пидилизумаб.

В другом варианте осуществления антагонист PD-1 представляет собой атезолизумаб.

В другом варианте осуществления антагонист PD-1 представляет собой авелумаб.

В другом варианте осуществления антагонист PD-1 представляет собой дурвалумаб.

В другом варианте осуществления антагонист PD-1 представляет собой PDR-001.

В предпочтительных вариантах осуществления, белок в соответствии с изобретением применяют для лечения рака в комбинации с антагонистом PD-1, выбранным из группы, состоящей из PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4, и PD1-5 например, из CD137 #1/FAP #1, CD137 #7/FAP #1, CD137 #1/FAP #4, CD137 #7/FAP #4, CD137 #2/FAP#5, CD137 #2/FAP#2, CD137 #2/FAP#3, CD137 #3/FAP#5, CD137 #3/FAP#2, CD137 #3/FAP#3, CD137 #4/FAP #5, CD137 #4/FAP #2, CD137 #4/FAP #3, CD137 #5/FAP #5, CD137 #5/FAP #2, CD137 #5/FAP #3, CD137 #6/FAP #5, CD137 #6/FAP #2, CD137 #6/FAP #3, CD137 #8/FAP #5, CD137 #8/FAP #2, CD137 #8/FAP #3, CD137 #9/FAP #5,

CD137 #9/FAP #2, и CD137 #9/FAP #3, CD137 #10/FAP #5, CD137 #10/FAP #2, CD137 #10/FAP #3.

Для применения в терапии, связывающую молекулу в соответствии с изобретением включают в состав фармацевтических композиций, подходящих для облегчения введения животным или людям. Типичные составы молекул антитела могут быть получены посредством смешивания молекулы антитела с физиологически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами, в виде лиофилизированных или иным образом высушенных составов или в виде водных растворов или водных или неводных суспензий. При этом носители, вспомогательные вещества, модификаторы или стабилизаторы являются нетоксическими в применяемых дозах и концентрациях. Они включают в себя системы буферных растворов, такие как фосфат, цитрат, ацетат и другие неорганические или органические кислоты и их соли; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты, такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенольный, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и *m*-крезол; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин, или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон или полиэтиленгликоль (ПЭГ); аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин, или лизин; моносахариды, дисахариды, олигосахариды или полисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу, сахарозу, трегалозу, декстрины или декстраны; хелатирующие агенты такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннитол или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или ионные или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™ (полисорбаты), PLURONICS™ или сложные эфиры жирных кислот, простые эфиры жирных кислот или сложные эфиры сахаров. Также в составе антитела могут содержаться органические растворители, такие как этанол или изопропанол. Вспомогательные вещества также могут иметь модифицирующую высвобождение или модифицирующую абсорбцию функцию.

Далее изобретение описано с помощью следующих неограничивающих примеров.

Пример 1: Конструкция связывающих молекул, распознающих CD137 человека (4-1BB, TNFRSF9) и белок активации фибробластов (FAP) в контексте микроокружения опухоли

Настоящее изобретатели разработали связывающие молекулы, которые связывают CD137 (4-1BB, TNFRSF9) и белок активации фибробластов (FAP), и которые нацелены на активацию Т-клеток посредством CD137 и их рекрутирование к экспрессирующим FAP фибробластам в строме опухоли. Применяемая молекулярная конструкция включает в себя антитело IgG (которое называют “эталонным антителом”), которое обладает специфичностью в отношении одного антигена-мишени, с scFv различной специфичности, связанными с С-концом тяжелой цепи. Схема конструкции показана на ФИГ. 1А. Схема механизма действия показана на ФИГ. 1Б.

Предпочтительно связывающая молекула является биспецифической и четырехвалентной.

Биспецифическая молекула содержит гибкие пептидные последовательности между переменным тяжелым (VH) и переменным легким (VL) доменами scFv, и при этом домены scFv соединены с эталонным антителом IgG посредством дополнительного ряда линкеров. В одной конфигурации, scFv ориентирован таким образом, что домен VL образует “N-концевой” конец scFv и, таким образом слит с С-концом тяжелой цепи эталонного антитела, в то время как VH образует С-конец scFv, и даже весь полипептид тяжелой цепи. Однако, можно понять, что указанная структура “N-VL-VH-C” может быть обратной, то есть “N-VH-VL-C”.

Следующие далее Примеры поясняют способы, применяемые для получения биспецифической молекулы, которая связывает CD137 (4-1BB, TNFRSF9) и белок активации фибробластов (FAP), а также вариации формата и биологической активности этих молекул.

Пример 2: Получение связывающих доменов, которые распознают CD137 (4-1BB, TNFRSF9)

Как можно понять, для получения биспецифических молекул, связывающихся с CD137 человека (4-1BB, TNFRSF9) и белком активации фибробластов (FAP), необходимо получить переменные домены, которые связываются с отдельными антигенами-мишенями.

а. Кампания иммунизации в отношении CD137

Для получения биспецифических молекул, связывающихся с CD137 человека (4-1BB, TNFRSF9), *in vitro* культивировали клональные гибридомы или одиночные В-клетки, полученные из CD137 (4-1BB, TNFRSF9) иммунизированных мышей. Супернатанты подвергали скринингу на реактивность против CD137 человека (4-1BB, TNFRSF9). Затем из идентифицированных положительных клонов амплифицировали гены VH и VL иммуноглобулина (Ig).

Вкратце, мышей CD1 дикого типа иммунизировали белками CD137-Fc_His человека и яванского макака (SEQ ID №№: 349 и 359, соответственно). Полный адъювант Фрейдна применяли в разных точках для усиления ответа антител. Серологию оценивали с помощью ИФА с белком CD137-Fc-His человека и яванского макака в качестве антигенов. Серологически положительным мышам давали конечную бустерную дозу за одну неделю до извлечения В-клеток селезенки. Селезенки мышей собирали и обрабатывали для извлечения всего количества спленоцитов. Все процедуры проводили в соответствии с протоколом, одобренным IACUC (*институциональные комитеты по уходу за животными и их использованию*).

Для выявления связывающих молекул в отношении CD137, выделяли шесть отсортированных селезенок мышей, и извлеченные спленоциты окрашивали в соответствии со стандартной процедурой SBC Antibody Generation. Прежде всего, собранные спленоциты избавляли от Т-клеток, применяя мышинный рап-Т Dynabeads (*препарат для адсорбции и связывания биореактивных молекул*) (Invitrogen 114.43D) в соответствии с инструкциями изготовителя. Препарат обедненных клеток затем инкубировали с 1 нМ CD137 CD137_huTNFRSF9_Hu-His Cleavable_Tag_biotin человека (SEQ ID №335), и 1 нМ MuGIPR-hu.FC-AF647, вместе с конъюгированными флуорохромом антителами против CD3, CD19, IgD, IgM, B220, и Sytox blue, включенными в красящее вещество для облегчения выявления живых В-клеток памяти. Для выявления В-клеток, связывающих биотинилированный CD137 человека, добавляли стрептавидин-PE. Затем В-клетки памяти, положительные в отношении антигена CD137 человека, сортировали по отдельности в 384-луночные планшеты и культивировали на протяжении 7 дней при температуре 37 °C и 5 % CO₂. Супернатанты В-клеток подвергали скринингу на предмет связывания с биотинилированным белком

CD137 человека и яванского макака с помощью AlphaLISA, в соответствии с инструкциями изготовителя.

Для выявления CD137-специфичных связывающих молекул, те антитела, которые вступали в реакции только с Fc человека, удаляли, применяя затравку MuGIPR-hu.FC-AF647, противоположную Fc, а также затравку huTNFRSF9_His-biotin для huCD137; обе из которых показывают хорошее связывание, независимо от В-клеток спленоцитов мышей CD1, FMO1 и FMO2, соответственно. Двойные MuGIPR-hu.FC/huCD137-положительные В-клетки полностью отделяли от Hu CD137-положительных В-клеток в полностью окрашенном образце. Тридцать 384-луночных планшетов (10 560 лунок), содержащих CD137-положительные мышинные В-клетки, извлекали и передавали для первичного скрининга.

Во время первичного скрининга, 554 супернатанта В-клеток были признаны положительными для IgG > 10 нг/мл со специфическим связыванием как с CD137 человека с S/B >2, так и CD137 яванского макака с S/B >2 (Фигура 1). 554 положительных клонов В-клеток разделяли на шесть 96-луночных планшетов для извлечения ДНК и выделения и амплификации мышинных сегментов генов VH и VL. Из 554 клонов, 376 клонов В-клеток, экспрессирующих антитела к CD137, с титрами в диапазоне от 0,6 до 75 мкг/мл, были проанализированы на предмет одноточечного связывания с рекомбинантными клетками CHO, экспрессирующими CD137 человека (CHO-K1). Из 376 клонов В-клеток, 168 клонов В-клеток экспрессировали антитела к CD137 на уровне >2X по сравнению с уровнем техники, с диапазоном 2-57X S/B (данные не показаны).

б. Выявление антител к агонистам CD137

Для выявления агонист-связывающих молекул, применяли систему анализа NF-kB-Luc2/4-1BB Jurkat (компания Promega). В анализе активности NFkB применяют линию репортерных клеток Jurkat, экспрессирующих CD137 человека на поверхности клетки.

Вкратце, супернатанты НТР, содержащие рекомбинантные антитела IgG1 (КО), были проанализированы с помощью проточной цитометрии на предмет связывания с линией клеток Jurkat NF-kB-Luc2/4-1BB. Контрольные антитела к CD137 разбавляли в окрашивающем буферном растворе, включая CD137-положительное контрольное антитело, урелумаб (BMS). Супернатанты, взятые из 168 клонов В-клеток, экспрессирующих антитела к CD137 (50 мкл) (которые

обсуждаются выше), инкубировали с клетками Jurkat на протяжении 30 мин при температуре 4 °С в 96-луночной планшете. Клетки трижды промывали окрашивающим буферным раствором. К клеткам добавляли вторичное козье антитело F(ab')₂ против IgG-Fc человека PE, и планшет инкубировали на протяжении 30 мин при температуре 4 °С. Клетки трижды промывали окрашивающим буферным раствором. После этого клетки суспендировали в 100 мкл холодного окрашивающего буферного раствора и анализировали посредством проточного цитометра. Супернатанты антител к CD137 анализировали на более, чем 2-кратное превышение связывания с клеточными линиями, по сравнению с уровнем техники. Из 168 подвергшихся скринингу супернатантов, содержащих антитела к CD137, десять супернатантов антител к CD137 продемонстрировали агонистическую активность против CD137 в 1,5 раза выше, по сравнению с уровнем техники (1,64-5,21X), с титрами антител в диапазоне от 0,76 до 31 мкг/мл. Сигнал от клона CL-186330 составлял 5,61 S/B (данные не показаны).

в. Выделение V-гена CD137-связывающих молекул

Для последующего анализа отбирали десять клонов В-клеток, идентифицированных как обладающие агонистической активностью выше определенного порогового значения. Прежде всего, собирали лизаты клеток и перераспределяли в 96-луночные планшеты и оставляли при температуре -20 °С, до выделения V-гена. Гены, кодирующие мышинные вариабельные участки тяжелой и легкой цепи, выделяли посредством ОТ-ПЦР (смотри праймеры в Таблице 4), затем клонировали в рамке генетического кода в векторы экспрессии pTT5, кодирующие IgG1 человека (КО), и константные участки к-цепей, соответственно.

Лизаты В-клеток подвергали синтезу кДНК, применяя набор для синтеза кДНК Smarter cDNA (компания Clontech, Mount View, CA). Для облегчения синтеза кДНК, применяли олиго (dT) для затравки обратной транскрипции всех матричных РНК, с последующим “5'-кэпированием” олигонуклеотидом Smarter IIА. Последующую амплификацию фрагментов VH и VL выполняли, применяя 2-стадийную ПЦР-амплификацию, с использованием 5'-праймеров, нацеливающихся на кэп Smarter IIА, и 3'-праймеров, нацеливающихся на консенсусные участки в CH1. Вкратце, каждые 50 мкл ПЦР-реакции состоит из 1 мкл каждого из 20 мкМ праймеров (прямого и обратного, конечная

концентрация 1 мкМ), 25 мкл премикса ДНК-полимеразы PrimeStar® Max (компания Clontech), 2 мкл неочищенной кДНК, и 20 мкл дважды дистиллированной H₂O. Стартует циклическая программа, которая состоит в 35 циклах при температуре 94 °С на протяжении 15 секунд, при температуре 50 °С на протяжении 30 секунд, при температуре 68 °С на протяжении 50 секунд, и заканчивается при температуре 68 °С на протяжении 7 мин. ПЦР второго раунда выполняли с праймерами второго раунда VH и VL, содержащими комплементарные удлинения из 15 bp (*base pair: спаренных оснований, пар нуклеотидов*), которые “перекрывают” соответствующие участки в их соответствующем исходном векторе pTT5 (VH и VL). ПЦР второго раунда проводили по следующей программе: 35 циклов (при температуре 94 °С на протяжении 45 секунд, при температуре 50 °С на протяжении 30 секунд, при температуре 68 °С на протяжении 50 секунд), и завершение при температуре 68 °С на протяжении 7 мин.

Для получения химерного CD137, мышинные участки VH и VL сливали с константными участками тяжелой и легкой цепи IgG1 человека, причем для направленного клонирования гена VL в вектор pTT5 huIgK (ID клона 401064) и гена VH в вектор pTT5 huIgG1KO (ID клона 403776) применяли набор для клонирования In-Fusion® HD Cloning Kit (компания Clontech, США). Для облегчения клонирования In-Fusion® HD Cloning, ПЦР продукты перед клонированием In-Fusion® HD Cloning очищали и обрабатывали продуктом Cloning Enhancer. Клонирование и трансформацию выполняли в соответствии с протоколом изготовителя (компания Clontech, США). Последовательность ДНК субклонированных фрагментов V-гена подтверждалась посредством выделения мини-препаратов ДНК и подтверждения выделенной ДНК двухцепочечному секвенированию по Сэнгеру.

Таблица 5

СТАДИЯ КЛОНИРОВАНИЯ	ПРЯМОЙ ПРАЙМЕР 5' → 3'	ОБРАТНЫЙ ПРАЙМЕР 5' → 3'
Клонирование mu VH в вектор pTT5	СТААТАСГАСТСАСТАТАГГГГААГСАГТ GGTATCAACGCAGAGT (SEQ ID №:364)	GGGGCCAGTGGATAGACAGATGGGGG (SEQ ID №:365)
Клонирование mu VL в вектор pTT5	СТААТАСГАСТСАСТАТАГГГГААГСАГТ GGTATCAACGCAGAGT (SEQ ID №: 366)	СТГСТСАСТГГГАТГГТГГГААГАТГГ (SEQ ID №:367)
2-й раунд VH (pTT5 + 15)	ТТАААСГГАТСТСТАГСГААТТСААГСАГТ GGTATCAACGCAGAGT (SEQ ID №:368)	ТГГАГГАГГГТГСТАГСГГАААГАСА GATGGGCCTTTCGTTGAGGCTGAGGA (SEQ ID №:369)
2-й раунд VL (pTT5 – 15)	ТТАААСГГАТСТСТАГСГААТТСААГСАГТ GGTATCAACGCAGAGT (SEQ ID №:370)	ГТТССАГАТТТСААТТГСТСАТСГГАТ GGTGGGAAGATGAAGACAGATGGTGC AGCAACAGTCCGTTGAT

г. *Механизм CD137, экспрессирующий линии рекомбинантных клеток CHO:*

Внеклеточные домены (ECD) как для CD137 человека, так и для CD137 яванского макака клонировали в вектор pсDNA3.1 для управления конститутивной экспрессией высокого уровня в линиях клеток млекопитающих, таких как CHO-K1. Этот вектор содержит промотор CMV для высокоэффективной экспрессии белков и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH), а также последовательность терминации транскрипции для повышенной стабильности мРНК. Последовательности ДНК, кодирующие эктодомены CD137 человека и яванского макака, соответствуют SEQ ID №№: 1 и 2, соответственно).

Для получения стабильного клона, клетки CHO-K1 высевали в 6-луночный планшет с плотностью, составляющей $0,25 \times 10^6$ клеток на лунку, за 24 часов до трансфекции в полную питательную среду. На следующий день, за 3 ч до трансфекции, питательную среду пополняли 1 мл полной питательной среды. 2,5 мкг ДНК разбавляли в питательной среде DMEM в общем объеме, составляющем 150 мкл, и 7,5 мкл реагента Lipofectamine® 2000 (компания Life Technologies, кат. №11668-019) разбавляли в 143 мкл питательной среды DMEM. Разбавленные ДНК добавляли к разбавленному реагенту Lipofectamine® 2000, и инкубировали на протяжении 15 мин. После инкубации, к клеткам добавляли ДНК-липидные комплексы, и дополнительно инкубировали на протяжении 48 часов. Через час после трансфекции, клетки обрабатывали трипсином, и отбирали в питательную среду, содержащую 1000 мкг/мл G418, (Life Technologies, кат. №10131-027). После одной недели селекции в присутствии G418 для пула выполняли FACS-анализ (*quantitative fluorescence-activated cell sorter: флуоресцентно-активируемая сортировка клеток*). Клоны отбирали на основе связывания с белками человека и яванского макака, и применяли для скрининга гибридом, которые экспрессируют антитела к CD137

д. *Выделение и характеристика химерных IgG к CD137.*

Для целей этого изобретения выражение “гуманизированная форма” антитела, например, антитела, не относящегося к человеку, относится к антителу, которое подверглось гуманизации. “Гуманизированное” антитело

относится к химерному антителу, содержащему аминокислотные остатки из не относящихся к человеку HVR-участков (*англ.: hypervariable regions - гипервариабельные участки*) и аминокислотные остатки из человеческих FR (*каркасных участков*). В некоторых вариантах осуществления, гуманизированное антитело будет содержать по сути все из по меньшей мере одного и, как правило, двух вариабельных доменов, в которых все или по сути все из гипервариабельных участков (например, CDR) соответствуют гипервариабельным участкам антитела, не относящегося к человеку, и все или по сути все из FR соответствуют FR человеческого антитела. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константного участка антитела, полученного из человеческого антитела. “Гуманизированная форма” антитела, например, антитела, не относящегося к человеку, относится к антителу, которое подверглось гуманизации. Другими формами “гуманизированных антител”, охватываемых настоящим изобретением, являются антитела, в которых константный участок был дополнительно модифицирован или изменен по сравнению с константным участком исходного антитела, для получения свойств в соответствии с изобретением, в частности, в отношении связывания C1q и/или связывания Fc-рецептора (FcR).

Химерные, гуманизированные антитела были получены посредством временной трансфекции клеток CHO-E37 с соответствующими плазмидами рТТ5, кодирующими химерные тяжелые и легкие цепи, где мышинные вариабельные участки из родительского антитела к CD137 клонировали в рамке генетического кода с человеческими константными участками, модифицированными таким образом, что Fc-рецептор дополнительно экспрессирует нокаутную мутацию L234A/L235A в части Fc, чтобы блокировать связывание FcR. Положительные контроли связывания с CD137 также клонировали в рамке генетического кода с константными участками IgG человека, где участки VH и VL из урелумаба (VH, SEQ ID №:371; и VL, SEQ ID №:372) и утулиломаба (VH, SEQ ID №:373; и VL, SEQ ID №:374).

30 **Таблица 6**

Название антитела	VH	VL
Урелумаб (№ CAS934823-49-1)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGFSGYYWSWIRQSPEKLEWIG EINHGYYVTYNPSLESVRTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDY GPGNYDWFYFDLWGRGTLTVSS (SEQ ID №: 371)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQS VSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQQRSNWPPALTFCGGTKVEI K (SEQ ID №:372)

Утомилумаб (№ CAS1417318-27-4)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKFS GYSFSTYWISWVRQMPGKGLEWMT KIYPGDSYTNYSFSFQGQVTISADKS ISTAYLQWSSLKASDTAMYCYCARG YGIFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID №:373)	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIG DQYAHWYQQKPGQSPVLYIYQDKNR PSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAM DEADYYCATYTGFGSLAVFG GGTKLTVL (SEQ ID №:374)
-----------------------------------	--	---

Клетки CHO-E трансфицировали с концентрацией 4×10^6 клеток/мл в питательной среде Irvine, с добавлением 4 мМ глутамин, в пробирках биореактора объемом 50 мл (компания Sigma). Для типичного объема трансфекции в 35 мл, предварительно стерилизованную плазмидную ДНК легкой цепи (LC) и плазмидную ДНК тяжелой цепи (HC) (в соотношении 2:1) разбавляли в 1 мл предварительно стерилизованного OptiPRO™ SFM (компания Gibco), содержащего филлерную ДНК. К смеси ДНК+Opti-PRO™ добавляли реагент трансфекции TransIT-PRO® (компания Mirus Bio LLC), и сразу же переносили к полученным клеткам CHO-E, и пробирку биореактора возвращали на шейкер, при температуре 37 °С, с 5 % CO₂, со скоростью вращения 300 об/мин. Через двадцать четыре часа после трансфекции, температуру выставляли на 30 °С. Трансфицированную культуру поддерживали на протяжении 7 дней. Сбор культуры завершали центрифугированием со скоростью 4700 об/мин на протяжении 25 минут.

Очистку молекул химерного антитела IgG к CD137 от супернатантов культур выполняли с помощью аффинной хроматографии, применяя биосенсоры на основе протеина А в приборе ForteBio's Octet® RED96 (компания ForteBio). Для исследования того, способны ли выделенные антитела к CD137 вступать в перекрестные реакции с клетками человека и яванского макака, химерные антитела IgG1(KO) к CD137 человека исследовали таким образом, чтобы получить кривые связывания методом проточной цитометрии, а также значения EC₅₀ по сравнению с клеточными линиями CHO, сверхэкспрессирующими CD137 человека и CD137 яванского макака. Вкратце, химерные антитела IgG к CD137 и положительные контроли IgG разбавляли в окрашивающем буферном растворе таким образом, чтобы получить 12-точечные кривые разбавления. Клетки и антитела инкубировали на протяжении 30 минут при температуре 4 °С в 96-луночной планшете. Клетки три раза промывали окрашивающим буферным раствором. К клеткам добавляли вторичное козье антитело F(ab')₂ против IgG-Fc человека PE, и планшет инкубировали на протяжении 30 мин при температуре 4 °С. Клетки три раза промывали окрашивающим буферным раствором. Затем

клетки суспендировали в 100 мкл холодного окрашивающего буферного раствора и анализировали посредством проточного цитометра. Анализировали кривые связывания, и для антител против CD137 человека рассчитывали EC50.

5 Из первого раунда селекции было выявлено двадцать семь удачных результатов, и дополнительный скрининг дал еще 18 более удачных результатов, которые отмечены буквой “В”, что указывает на другой пул селекции. Смотри Таблицу 7.

Таблица 7:

Антитела	EC50 CD137 человека	EC50 CD137 яванского макака	VH	VL
Урелумаб	0,07185		SEQ ID №:371	SEQ ID №:372
Утомилумаб	0,5884	0,6093	SEQ ID №:373	SEQ ID №:374
CD137 #A1	0,8411	1,543	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTLTNYPMH WVRQAPGQRPEWMΓWSNAGNGNTKYSQEFQDRVT ITRDTSASTAYMELSSLRSEDMAVYYCTREGVTGGFD IWGGQTMVTVSS (SEQ ID №:375)	DIVMTQSPPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLLSIGYN YLDWYLQKPGQSPQLLIFLGSNRASGVDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCMQALQTVTFG QGTRLEIK (SEQ ID №:376)
CD137 #A2	0,9237	1,709	QVQLVQSGADVKKPGASVRVSCASGYTFTSYPIHW VRQAPGHRLEWMΓWSNAGIGNAKYSQEFQGRVTITR DTSASTAYMDLSSLTSEDLAVYYCAREGVAGAFDIW GGQTMVTVSA (SEQ ID №:377)	DIVMTQSPPLSLPVTGPGEASISCRSSQNLHNSNGYN YLDWYLHKPGQSPQLLIYLSIRASGVDRFSGS ESGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQLQIPYTFG QGTKLEIK (SEQ ID №:378)
CD137 #A3	1,757	2,32	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSEFODYGWN WIRQFPGNKVEWMΓYISYSGSTYNPSLKSRSITRD TSKNQFFLQLKSVTTEDATYYCARSDPYYGISWFA YWGQGPLVTVSA (SEQ ID №:379)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNFLN WYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQSHTLPWTFG GGTKLEIK (SEQ ID №:380)
CD137 #A4	1,604	1,826	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSEFODYVWN WIRQFPGNKLEWMΓYISYSGGTRYNPSLKSRSITRD TSENQFFLQLDSVTTEDATFYCARSGNWDWYFDA WGTGTTVTVSS (SEQ ID №:381)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRPSQDISNYL DWYQQKPDGTVKLLIYSTSSLPSGVPSRFSGSGS GSGTDYSLTISNMEQEDIATYFCQQGNTFPPTF GGGKLEIK (SEQ ID №:382)
CD137 #A5	0,5051	0,7689	DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSEFOGFNWH WIRQFPGNKLEWMΓYIHNSGSTNYPFLKRSISITRD TSKNQFFLQLNSVTTEDATYYCARGALGTMDYWG QGTSVTVSS (SEQ ID №:383)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCEASQSLDYD GDSYMHWFQKPGQPPKLLIYVANSLESGIP ARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQQ SNEDPWTFGGGKLEIK (SEQ ID №:384)
CD137 #A6	2,216	2,959	DVQLQESGPGLLKPSQSLSLTCTVTGYSEFODYVWS WIRQFPGNKLEWMΓYINYSGGTSYNPSLKSRSITRD DTSKNQFFLQLNSVTTEDATYYCTRSGNWDWYF DVWGTGTTVTVSS (SEQ ID №:385)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDIRNN LNWFQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGLPFRFS GSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNTL PPTFGGGKLEIK (SEQ ID №:386)
CD137 #A8	0,4958	0,7561	DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSEFOGYNWH WIRQFPGNKLEWMΓYIHYSGSTNYPFLKRSISITRD TSKNQFFLQLNSVTTEDATYYCARGALGAMDYWG QGTSVTVSS (SEQ ID №:387)	DIVLTQSPASLAVSPGQRATISCKASQSDYD GDSYMNWYQKPGQPPKLLIYVANSVESGIP ARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQQ SNEDPWTFGGGKLEIK (SEQ ID №: 388)
CD137 #A12	0,4694	1,941	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSLTCTVSGFSLTSHGVHVV RQSPGKLEWLGVWSGGYTDYNAAFISRLSISTDNS KSHIFFKMNSLQADDTAIYYCARNGASYYYAMDYWG QGTSVTVSS (SEQ ID №:389)	DIVMTQAAFSNPVTLGISASISCRSSKSLLSN GITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDP RFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGYYCAQNL ELPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID №:390)
CD137 #A13	3,722	3,832	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIHW VKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTIYASKFQGKATITAD TSSNTAYMQLSSLTSGDTAVYYCVRLDLLNYWGQ	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIATY LSWFQKPGKSPKTLIYRTNGLLDGVPSRFSG SGSGQDYSLTISSEYEDMIYYCLQYDEFFP

Антитела	EC50 CD137 человека	EC50 CD137 яванского макака	VH	VL
			GTTLTVSS (SEQ ID №:391)	TFGGGKLEIK (SEQ ID №:392)
CD137 #A16	0,8612	0,8407	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNFWIN WVKQRPGQALEWIGNIYPGNDNTNYNGNFKTKATL TVDRSSSTAYMHLSSLTSKDSAVYYCARGQLGLDY WGQGTTLTVSS (SEQ ID №:393)	DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQNIQTIIHW YHQRTNGSPRLLIKFASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDFADYYCQQSNSWPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID №:394)
CD137 #A17	0,2129	0,2661	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNFWIN WVKQRPGQALEWIGNIYPGNDNTNYNGNFKSKAT LTVDRSSSTAYMHLSSLTSKDSAVYYCARGQLGLD YWGQGTTLTVSS (SEQ ID №:395)	DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQNIQTIIHW YHQRTNGSPRLLIKFASESISGIPSRFSGSGSGTDF TLSINSVESEDFADYYCQQSNSWPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID №:396)
CD137 #A19	1,052	1,226	DVQLVESGGDLVQPGGSRKLSAASGFTFSSFGMH WVRQAPERGLEWVAYISSGSSTIYYADTVKIRFIIS RDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCARDWVDYWG QGTSVTVSS (SEQ ID №:397)	DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIIVHGN GNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYQVSNRFGVDPD RFGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGS HVPRTFGGGKLEIK (SEQ ID №:398)
CD137 #A25	3,704	2,758	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFSSFGMH WVRQAPEKLEWVAYISSGSSTIYYADTVKIRFIIS RDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCVRDWDYD YWGQGTTLTVST (SEQ ID №:399)	QIVLTQSPAIMASLGEIITLTCATSSVSYMHW SQQKSGTSPKLLIYTTNLSASGVPSRFSGSGSGTF YSLTISSVEAEDAADYYCHQWTTYPWTFGG GTKLEIK (SEQ ID №:400)
CD137 #A26	1,499	1,916	EVQLQESGPSLVKPSQTLSTCSVTGDSFOGYWNW NRKFPNGKFEYMIYISYSDSAYYNPSLKSRIITRD TADKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCARGLLEG AHTLVTSVA (SEQ ID №:401)	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIDSYL YWFQKPGKSPETLIYHANRLVDGVPSRFSGS GSGQDYSLTISSEYEDMIYYCLQYDEFPYTF GGGKLEIK (SEQ ID №:402)
CD137 #A27	0,9805	1,219	QVQLQQSGAELTRPGASVKLSCKASGYTFTNYWIQ WIKQRPGGLEWIGTIYPENGDRYTRQKFKTKATL TADKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCARGLLEG AHTLVTSVA (SEQ ID №:403)	DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQSIGASIIHW YQRTNGSPRLLIKFSSESISGIPSRFSGSGSGTD FTLINSVESEDIADYYCQQTNSWPATFGGGTK LEMK (SEQ ID №:404)
CD137 #A30	1,181	2,358	QVQLQQPGTEFVKPGASVKLSCKASDYFTSHWMH WVKQRPGGLEWIGIIDPSDSTNYIQKFKTKATL VDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARDGYYGTRY FDVWGAGTTVIVSS (SEQ ID №:405)	DIVMTQSPSSLSVSB03PACTKVTMSCKSGQNLFNS GNQKNYLAWYQKPGQPPRLLIYGASTRESG VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQ NDQSYPPTFGAGTKLEIK (SEQ ID №:406)
CD137 #A39	1,328	1,182	QVQLQQSGAELMKPGSSVKLSCKAPGYKFTDYWIE WVKQRPGHGLDWIGNILPGTINTNSNENFKTKATFT ADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARRSLEYFDY WGQGTTLTVSS (SEQ ID №:407)	DIVVTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVTSR YSYMHWYQKPGQPPRLLINYSNLESGVPA RFGSGSGTDFTLNIHPVEEEDATYYCQHTW EIPWTFGGGKLEIK (SEQ ID №:408)
CD137 #A41	3,507	4,757	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAW IRQPAGKLEWIGRIYTSNTNYNPSLKSRTMSVD TSKNQFSLKLTSTAAADTAVYYCARDGNWNYADA FDIWGQGTMTVTVSS (SEQ ID №:409)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWL AWFQKPGKAPKLLIYTAGLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTNSFPFTFG PGBKVDIK (SEQ ID №:410)
CD137 #A42	0,4829	0,7372	QVQLQQSGPLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAW NWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSNWNNDYAVSVESRI TIKPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDMSGTY LDAFDIWGQGTMTVTVSS (SEQ ID №:411)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGRNL AWYQKPGQTPRLLIYGASTRATGIPAIFSGSG SGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNYWPPFTF AQQTKLEIK (SEQ ID №:412)
CD137 #A44	0,7133	1,187	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTNYPH WVRQAPGQRLEWMIWSNAGNNTKYSPFQDRV TITRDTASAVYMEISSLRSEDMSVYYCAREGVTGA	DIVMTQSPPLSLVTPGEPASISCRSSQSLLSIG YNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLSYRASGVDP RFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQAL

Антитела	EC50 CD137 человека	EC50 CD137 яванского макака	VH	VL
			FDIWGQGTMTVTVSS (SEQ ID №:413)	QTPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID №:414)
CD137 #A45	1,207	2,089	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYIFTNYPMH WVRQAPGQRLEWMIWSNAGIGNTKYSQDFQGRVT ITRDTSAANTSYMELSSLRSEDMAVYYCAREGVTGAF DYWGQGTMTVTVSS (SEQ ID №:415)	DIVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLHSNG FNYLDWYLQKPGQSPQLLIFLGSIRASGVPDFR SGSESGTDFTLKISRVEADDVGIYYCMQPLQIP YTFGQGTKEIK (SEQ ID №: 416)
CD137 #A46	1,023	1,714	QVQLAQSAGAEVKKPGASVKVSCASGYTFSSFPMH WVRQAPGQRLEWMIWSNAGIGNTKYSQEFQGRVT ITRDTSAASTAYMELSSLRSEDMAVYYCAREGLTGAF DYWGQGTMTVTVSS (SEQ ID №: 417)	DIVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLHSNG YNYLGWHLQKPGQSPQLLIYLSYRASGVPDFR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQPLQI PLTFGGGTKVEIK (SEQ ID №: 418)
CD137 #A47	0,5654	1,402	QVQLAQSAGAEVKKPGASVKVSCASGYTFSSFPMH WVRQAPGQRLEWMIWSNAGIGNTKYSQEFQGRVT ITRDTSAASTAYMELSSLRSEDMAVYYCAREGLTGAF DYWGQGTMTVTVSS (SEQ ID №: 419)	DIVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLHSN GYNLWYLYLQKPGQSPQLLIYLSYRASGV DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQ PLQIPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID №: 420)
CD137 #A49	17,07	25,5	QVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVSGGSISSYYWSW IRQPPGKLEWIGYIYSGSTNYNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDQSGGGSFQHW GQGTMTVTVSS (SEQ ID №: 421)	EIVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLYSN GYNHLDWYLQKPGQSPQLLIYLSYRASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QALQTPPTFGGQGTKEIK (SEQ ID №: 422)
CD137 #A50	1,408	1,405	QVTLKESGPGVLVKPTELTCTVSGFSLSNARVGV SWIRQPPGKALESLVHIFSNDEKFFSTLSKSRITISKD TSKSNVLTMTNMPVVDATYYCARNGGFGVHHD AFDIWGQGTMTVTVSS (SEQ ID №: 423)	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASQGISSY LAWYQKPGKAPKLLIFAASLTQNGVPSRF SGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNN YPRTFGQGTKEIK (SEQ ID №:424)
CD137 #A51	505		EVQLLESGLLIQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMR WVRQAPGKLEWVSDISGSGGSTFYADSVKTRFTI SRDNSKNTLFLQMNSLR AEDTAVYYCAKEGGTHY YFFGMDVWGQGTMTVTVSS (SEQ ID №: 425)	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASQGISSY LAWYQKPGKAPKLLIYAASLTQNGVPSRF SGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQFNS YPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID №: 426)
CD137 #A57	1,115	2,02	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTSNFPMH WVRQAPGQRLEWMIWSNAGNGNTKYSQEFQGRVT TLTRDTSAASTAFMELSSLRSEDMAVYYCAREGLTG AFDYWGQGTMTVTVSS (SEQ ID №: 427)	DIVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLHS NGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLSNRSASG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQPLQTPYTFGQGTKEIK (SEQ ID №: 428)
CD137 #B1	0,8	0,9838	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNFWIN WVKQRPGQALEWIGNIYPGNDNTNYNGNFKTKATL TVDRSSSTAYMHLSSLTSKDSAVYYCARGQLGLDY WGQGTMTVTVSS (SEQ ID №: 429)	DILLTQSPAILSVPGERVSVFSCRASQNIQT IHWHYQRTNGSPRLLIKFAESISGIPSRFSG SGSGTDFTLSINSVESEDFADYYCQQSNSW PFTFGSGTKLEIK (SEQ ID №: 430)
CD137 #B2	0,6494	0,9156	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNFWIN WVKQRPGQGLEWIGNIYPGNTGTNYNERFKTKATL TVDISSTAYMRLSSLTSEDSAVYYCARGQLGLDY WGQGTMTVTVSS (SEQ ID №: 431)	DILLTQSPAILSVPGERVSVFSCRASQIIGTT IQWYQRTNGSPRLLIKAYESLSGIPSRFS GSGSGTDFTLSINNVESEDIADYYCQQSHS WPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID №: 432)
CD137 #B3	0,9614	1,243	DVQLVESGGDLVQPGRKLSKAASGFTFSFGMH WVRQAPERGLEWVAYISSGSSTIYADTVKTRFIIS RDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARDWVDY WGQGTMTVTVSS (SEQ ID №: 433)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSVNY IHWYQKPGTSPKLIWYSTSNLASGVPARF SGRSGTSYSLTISRMEAEADATYYCLQG SSYPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID №: 434)
CD137 #B4	0,661	0,9905	DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSEFODYAW NWIRQFPGNRLEWMIYISYSGSTNYNPSLKSRI RDTSKNQFFLQLNSVTEDATYFCARWGYVLDY	DIVMTQSHKFMSTSEGDRVSIKASQDV STAVAWYQKPGQSPKLLIYWASTRHTG VPDRFRGSGSGTDYTLTISSVQAEDLALYF

Антитела	EC50 CD137 человека	EC50 CD137 яванского макака	VH	VL
			WGQGTSVTVSS (SEQ ID №: 435)	CQQHYFTPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID №: 436)
CD137 #B5	1,203	1,154	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWL EWIKQRPFGHGLEWIGEILPGSGVSNYNEKFKTKAT FTANTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARLGLAW FAYWGQGLVTVSA (SEQ ID №: 437)	DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIV HGNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYQVSNR FSGVPRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLG VYYCFQGSHPVPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID №:438)
CD137 #B7	0,4523	0,5996	EVQLQESGPSLVKPSQTLSTLCSVTGDSEI'OGYWN WIRKFPGNKLEFMI'YITYSGSTYYNPSLKSRISTR DTSRNQFYLVQNSVTTEDTATYFCTRYYYGSTY YAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID №: 439)	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRVSESVD SYGNSFMHWFQKPGQSPKLLIYLASNLE SGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAAT YYCQNIEDPPTFGGGGTKLEIK (SEQ ID №:440)
CD137 #B9	0,8907	1,336	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTLTTFNP MHWVRQAPGQRLEWMI'WTNAGNGNTKYSQEL QGRVTMTRDTSASIAYMELSSLRSEDMI'VYYCA REGLTGAFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID №: 441)	DIVMTQSPSLPVPVTPGDPASISCRSSQSLH SNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSRAS SGVPRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGV YYCMQPLQSPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID №: 442)
CD137 #B10	0,5016	0,7838	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTNYP MHWVRQAPGQRLEWMI'WSNAGSGNTKYSQDF QGRVSI'RDTSASTAYMELSSLRSEDMI'VYYCAR EGVAGAFDIWGQGLVTVTVSS (SEQ ID №: 443)	DIVMTQSPSLPVPVTPGEPASISCRSSQRLH SNGFN'YLGWYLQKPGQSPQLLIYLGSHRAS GVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVY YCMQPLQIPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID №: 444)
CD137 #B12	0,4628	0,7299	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTTYPMH WVRQAPGQRLEWMI'WSNAGIGNTKYSQEFQDRIT ISRDTASTVYME'LSLRSEDMI'AVYYCAREGVAGG FDIWGQGTMTVTVSS (SEQ ID №: 445)	DIVMTQSPSLPVPVTPGEPASISCRSSQSLH SNGYNYLNWYLQKPGQSPQLLIYLGSRASG VPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVY YCMQPLQIPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID №: 446)
CD137 #B13	0,5625	0,6321	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNFWIN WVKQRPQGALEWIGNIYPGN'DNTNYNGNFKTKAT LTVDRSSSTAYMHLSSLTSKDSAVYYCARGQLGLD YWGQGTTLTVSS (SEQ ID №: 447)	DILLTQSPAILSVPSPGERVFSFCRASQNI'GTT IH'WYHQRTNGSPRLLIKFA'ESISGIPSRFSG SGSGTDFTLSINSVESEDFADYYCQNSNSW PFTFGSGTKLEIK (SEQ ID №: 448)
CD137 #B17	0,5524	0,9314	EVQLQQSGPELVKPGASVKMCKASGYTFTYYVM HWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKTKA TLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAPGSVDY WGQGTTLTVSS (SEQ ID №: 449)	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNV GTSVAWYQKQSGHSPKLLIYASNRNTGV PDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFC QYYSTYPLTFGSGTKLEIK (SEQ ID №: 450)
CD137 #B19	3,359	5,973	QVQLKQSGPGLVPPSQSLITCTVSGFSLSSYGVHW VRQSPGKILEWLGVIWSSGNTDFNAAFVSRLSISIT EISESQVFRMNSLQADDAIYYCARNGPQYYFAM DYWGQGTSVTVSS (SEQ ID №: 451)	DIVLTQSPASLTVSLGQRATISCRANKSVS TSGYSYMHWHQKPGQPPKLLIYLASNL ESGVPARFSGSGSGTDFTLN'HPVEEEDAA TY'YQHSRELP'LTFGAGTKLEIK (SEQ ID №: 452)
CD137 #B20	0,4371	0,4445	EVKLVSEGGGLVQPGSSMKLSCTASGFTFSDFYMA WVRQVPEKILEWVANIN'YDGSSTYYLDSLKSRFII SRD'HKRNILY'LMSSLSKSEDTATYYCAREGDEGW YFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID №: 453)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQKPGQSPKLLIYASRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAV YYCQQHYSNPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID №: 454)
CD137 #B21	0,329	0,4193	EVKLVSEGGGLVQPGSSMKLSCTASGFTFSDFYMA WVRQVPEKILEWVANIN'YDGSSTYYLDSLKSRFII SRD'HKRNILY'LMSSLSKSEDTATYYCAREGDEGW YFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID №: 455)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQKPGQSPKLLIYASRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAV YYCQQHYSNPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID №: 456)
CD137 #B27	1,65	2,087	QVQLQQSGAELV'RPASVKISCKAFGYTFTNHHIN WVKQRPQGLDWIGYINPYNDYSGYNQKFKTRA	DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSL VHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYIMVS

Антитела	EC50 CD137 человека	EC50 CD137 яванского макака	VH	VL
			TLTVDKSSNTAYMELSSLTSEDSAVYYCATPGTWE GYFFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID №: 457)	NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYYCFQGSHIPLTFGAGTKLELK (SEQ ID №: 458)
CD137 #B28	0,8215	0,9396	QVQLQQSGPQLIRPGASVKISCKASGYSTGYWIH WVKQRPQGQLEWIGMIDPSDSETRLNPKFKDKAT LTVDKSSTTAYMQLSSPTSEDSAVFYCARYRNYG YDGFHAWGQGTTLTVSA (SEQ ID №: 459)	DIVMTQSPSSLTVTBO3PACTKVTMSCKSSQS LLNSGNEKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSV QTEDLAVYHCQNDYSLPLTFGAGTKLELK (SEQ ID №: 460)
CD137 #B30	0,725	0,9285	QVQLQQSGPQLIRPGASVKISCKASGYSTGYWIH WVKQRPQGQLEWIGMIDPSDSETRLNPKFKDKAT LTVDKSSTTAYMQLSSPTSEDSAVFYCARYRNYG YDGFHAWGQGTTLTVSA (SEQ ID №: 461)	DIVMTQSPSSLTVTBO3PACTKVTMSCKSSQS LLNSGNEKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSV QTEDLAVYHCQNDYSLPLTFGAGTKLELK (SEQ ID №:462)
CD137 #B31	0,8772	1,178	QVQLQQSGPQLIRPGASVKISCKASGYSTGYWIH WVKQRPQGQLEWIGMIDPSDSETRLNPKFKDKAT LTVDKSSTTAYMQLSSPTSEDSAVFYCARYRNYG YDGFHAWGQGTTLTVSA (SEQ ID №: 463)	DIVMTQSPSSLTVTBO3PACTKVTMSCKSSQS LLNSGNEKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQTEDLAVYHCQNDYSLPLTFGAGT KLELK (SEQ ID №: 464)

Как показано в Таблице 7 (выше), почти все клоны связывающих молекул антител к CD137 человека, были кросс-реактивными с CD137 яванского макака, экспрессируемым на рекомбинантных клетках СНО, а также связывали линию клеток СНО, экспрессирующую CD137 человека, как продемонстрировано сопоставимыми значениями EC50.

е. Функциональные свойства клонов связывающих молекул химерных антител IgG1 к CD137

CD137 является известным костимулирующим рецептором и улучшает экспансию, выработку цитокинов и функциональные свойства Т-клеток, когда он экспрессируется на активированных Т-клетках. В природе, активация Т-клеток индуцирует активацию CD137 на Т-клетках (Pollok и др. (1993) J. Immunol. 150(3): 771-781) и поддерживает после их взаимодействия иммунную реакцию посредством усиления экспансии и высвобождения цитокинов (Hurtado и др. (1995) J Immunology 155(7), 3360-3367). Ожидается, что сшивание CD137 в контексте активированных Т-клеток усиливает активацию Т-клеток и приводит к экспансии и рекрутированию Т-клеток.

Для оценки агонистического поведения антитела к CD137, для сшивания CD137 на поверхности клетки применяли вторичное антитело. Обоснование состояло в том, чтобы выявлять антитела к CD137, которые были агонистами, только тогда, когда они были сшиты с целью выявления молекул, которые являются агонистическими только в комбинации с биспецифичностью молекул в отношении FAP.

Для этого, 72 нМ каждого из антител к CD137 инкубировали с 2,5-кратным молярным избытком сшивающего антитела (+CL) и без сшивающего антитела (-CL), на протяжении 30 минут при температуре 37 °С. Супернатанты антител к CD137 или фактическое антитело разбавляли приблизительно до 48 нМ посредством добавления 220,5 мкл питательной среды в каждую пробирку. Смесь антител последовательно разбавляли в 80 мкл питательной среды, составляющей 160 мкл (питательной среды RPMI/1 % FBS). 50 мкл (0,8 x 10⁵ клеток) клеток смешивали вместе с 25 мкл разбавленного антитела в плоскодонном 96-луночном планшете (осуществляли 3-кратные разбавления антител для в общей сложности 9 точек данных для каждого). Клетки инкубировали с антителами к CD137 на протяжении 5 часов при температуре 37 °С и в атмосфере 5 % CO₂. Выявление активности достигали посредством

добавления 75 мкл реагента для люциферазного анализа Bio-Glo™ (G7940 Promega), и полученную люминесценцию устанавливали с помощью считывателя планшетов EnVision® (компания Perkin-Elmer).

Зависимое от CD137 взаимодействие и сшивание может индуцировать NFκB-опосредованную активацию люциферазы в линии репортерных клеток Jurkat. Были построены кривые агонистического связывания антител к CD137 и получены значения EC₅₀. Данные в отношении активности связывания были представлены в виде кривой (ФИГ. 3А и 3Б), и данные активности люциферазы (RLU) (ФИГ. 3В и 3Г) были представлены в виде гистограммы. Два положительных контроля на основе известных связывающих CD137 молекул (урелумаб (анти-CD137 антитело компании BMS) и утомилумаб (анти-CD137 антитело компании Pfizer)) сравнивали с новой связывающей CD137 молекулой в соответствии с изобретением. На основе агонистической активности в исследованиях NFκB-Jurkat, для дальнейшей оптимизации отбирали кандидатов CD137 #B21 (которых также называют “CD137#1”, ссылаясь на родительский) и CD137 #A49 (которых также называют “CD137#7”, ссылаясь на родительский).

ж. Получение химерного Fab преимущественных кандидатов антител к CD137 (CD137#1)

Для отображений событий созревания аффинности и гипермутации, которые случайным образом происходят в природе *in vivo*, что улучшает аффинность антитела к антигену, применяют известные методы. Такие модификации включают, например, делеции из остатков, и/или инсерции в остатки и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Может применяться любая комбинация делеции, инсерции, и замены, таким образом, чтобы получить конечный конструктор, при условии, что конечный конструктор обладает желательными характеристиками, например, связыванием антигена. Сайты, представляющие интерес с точки зрения заместительного мутагенеза, включают в себя гипервариабельные участки (CDR) и каркасные участки (FW). Аффинность, avidность, стабильность, растворимость, гликозилирование - это несколько характеристик, которые считаются такими, которые оптимизируют кандидатов связывающих CD137 молекул.

Термин “варианты аминокислотной последовательности” включает в себя значимые варианты, в которых имеются аминокислотные замены в одном или нескольких остатках гипервариабельных участков родительской

антигенсвязывающей молекулы (например, химерного, гуманизированного, или человеческого антитела). Как правило, полученный(-е) вариант(-ы), выбранный(-е) для последующего исследования, будет(-ут) иметь модификации (например, улучшения) некоторых биологических свойств (например, 5 повышенную аффинность, пониженную иммуногенность) по сравнению с родительской антигенсвязывающей молекулой, и/или в значительной степени сохраняют определенные биологические свойства родительской антигенсвязывающей молекулы. Типичный заместительный вариант представляет собой антитело с созревшей аффинностью, которое можно легко 10 получить, например, посредством применения методов созревания аффинности на основе фагового дисплея, таких, которые описаны в этой заявке. Вкратце, один или несколько остатков переменных участков подвергаются мутации, и варианты антигенсвязывающих молекул экспонируются на фаге и подвергаются скринингу в отношении определенной биологической активности (например, 15 аффинности связывания). В некоторых вариантах осуществления, замены, инсерции, или делеции могут происходить в одном или нескольких гипервариабельных участках до тех пор, пока такие изменения по сути не снижают способность антигенсвязывающей молекулы связывать антиген. Например, в гипервариабельных участках могут быть осуществлены 20 консервативные изменения (например, консервативные замены, которые представлены в этой заявке), которые по сути не уменьшают аффинность связывания. Дополнительные замены могут вводиться в положения аминокислот, демонстрирующие функциональную чувствительность к первоначальным заменам. В качестве альтернативы, или дополнительно, а 25 кристаллическая структура антиген-антигенсвязывающей молекулы усложняет выявление точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседствующие остатки могут быть выбраны или удалены в качестве кандидатов на замену. Варианты могут поддаваться скринингу для определения того, обладают ли они желательными свойствами.

30 Антитело “с созревшей аффинностью” относится к антителу с одним или несколькими изменениями в одном или нескольких гипервариабельных участках, по сравнению с родительским антителом, которое не имеет таких изменений, причем такие изменения приводят к улучшению аффинности антитела к антигену.

Аминокислотные замены могут вводиться в представляющую интерес молекулу, а продукты поддаваться скринингу в отношении желательной активности, например, в отношении сохраненного/улучшенного связывания антигена, по сравнению с родительской мышинной молекулой. При этом
5 предусматриваются как консервативные замены, так и неконсервативные замены.

Варианты осуществления изобретения включают в себя варианты аминокислотной последовательности CD137-антигенсвязывающих молекул. Варианты аминокислотной последовательности связывающих CD137 молекул
10 получают посредством введения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулы, или посредством синтеза пептидов.

Используя мышиную последовательность отобранных кандидатов антител, были сконструированы и синтезированы фрагменты генов мышинных VK и VH. Для амплификации участка V применяют биотинилированный прямой праймер,
15 содержащий конкретную последовательность, к мышинному каркасному участку 1, и нависающую последовательность, гибридизированную до конца последовательности Гена III, и обратный праймер от консервативного мышинного каркасного участка 4 вместе с константным участком человека (Ск или СН1)
20 (смотри Таблицу 8).

ПЦР выполняли посредством применения фрагментов генов в качестве матрицы, и продукт ДНК клонировали в вектор M13LE01 (модифицированный вариант вектора M13 mp18 от компании New England Biolabs) посредством
25 применения стандартных внутренних протоколов, и трансформировали в клетки E.coli (Фигура 5). M13 обеспечивает необходимые компоненты для упаковки ДНК в фаговые частицы, которые секретируются через стенку клетки и выделяются в питательную среду, а обширное заражение фагом может вызывать лизис в клетках E.coli. Таким образом, заражение рекомбинантным фагом M13 может создавать бляшки в клетках E. coli при выращивании на планшетах с L-агаром. Отдельные бляшки, представляющие конкретное изменение в
30 представляющей интерес ДНК, собирали и выращивали на протяжении ночи в E.coli, и соответствующие культуры были мини-препарированы для получения последовательности ДНК с помощью анализа секвенирования. Бляшки, несущие корректную последовательность ДНК химерного Fab, применяли для

инфицирования клеток *E. coli*. После соответствующего роста культур, клетки *E. coli* индуцировали 0,5 mM IPTG для экспрессии химерного Fab, который секретируется в питательную среду. Экспрессированный химерный Fab получали из супернатантов культур и/или периплазматических экстрактов инфицированных клеток *E. coli*. Этот химерный Fab в дальнейшем применяли для улучшения исследований связывания с помощью ИФА, и сохраняли в качестве положительного контроля для выявления гуманизированных вариантов, описанных ниже. Последовательность химерного Fab описана ниже.

Таблица 8

Матрица ДНК <i>mu V_k</i>	GACATCGTGATGACCCAGAGCCACAAGTTCATGAGCACCAGCGTGGGCGACCGCGTGAGCATCACCTGCAAGGC CAGCCAGGACGTGAGCACCGCCGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGAGCCCAAAGCTGCTGATCTACA GCGCCAGCTACCGCTACACCGGCGTGCCAGACCGCTTACCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTTACCA TCAGCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTGTA TACTGCCAGCAGCACTACAGCAACCCATGGACCTTCGGCG GCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID №:465)	
Матричная последовательность ДНК <i>mu V_H</i>	GAGGTGAAGCTGGTGGAGAGCGAGGGCGGCCTGGTGCAGCCAGGCAGCAGCATGAAGCTGAGCTGCACCGCCAG CGGCTTACSTTACGCGACTTCTACATGGCCTGGGTGCGCCAGGTGCCAGAGAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCAA CATCAACTACGACGGCAGCAGCACCTACTACCTGGACAGCCTGAAGAGCCGCTTCATCATCAGCCGCGACAACGC CCGCAACATCCTGTACCTGCAGATGAGCAGCCTGAAGAGCGAGGACACCGCCACCTACTACTGCGCCCGCGAGG GCGACGAGGGCTGGTACTTCGACGTGTGGGGCGCCGGCACCCCGTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID №:466)	
Клонирование <i>mu V_H</i> в вектор M13LE01	Прямой bio-hu V _H FW1/ГЕН III) GGTGCCGTTCTATAGCCATAGCGAGGTGAAGCTGGTGG AGAGCGAGGGCG (SEQ ID №:467)	Обратный hu CH1 GGAAGACCGATGGGCCCTGGTGGAGGCGCTGCTC ACGGTCACGGTGGTGC (SEQ ID №:468)
Клонирование <i>mu V_L</i> в вектор M13LE01	Прямой VL GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGACATCGTGATGAC CCAGAGCCAC (SEQ ID №:469)	Обратный CL CAGATGGTGCAGCCACAGTTCGCTTGATCTCCAGC TTGGTGCCGCCCGCCAAG (SEQ ID №:470)

Fab-фрагменты с оптимизированной последовательностью оценивали в исследованиях связывания с помощью ИФА, которые описаны ниже.

з. *Выявление оптимизированных CD137 #1-связывающих молекул:*

Для выявления гуманизированных/оптимизированных анти-CD137-
5 связывающих молекул, было усовершенствовано исследование 2D-сэндвич-
ИФА, посредством применения химерных анти-CD137 Fab-фрагментов, и на
всем протяжении исследования химерный анти-CD137 Fab сохраняли в качестве
положительного контроля для выявления гуманизированных вариантов, которые
имели подобное связывание с мышиными вариabельными участками,
10 присутствующими в химерном Fab. Для улучшения исследований, планшеты
покрывали антителом к FD, которое связывается с участком CH1 в химерном
Fab-фрагменте CD137, присутствующем в супернатантах культур и/или
периплазматических препаратах (клетки E.coli инфицируют фагом, содержащим
химерный Fab-фрагмент CD137, и индуцировали 0,5 mM IPTG, и после 4 часов
15 инкубации применяли супернатанты или клетки подвергали лизису для
получения периплазматических экстрактов).

Связанные Fab-фрагменты CD137 инкубируют в присутствии
биотинилированного антигена huCD137, и связанный биотинилированный
антиген выявляется с помощью меченого стрептавидином флуорохрома. Разные
20 количества антигена (биотинилированный huCD137-6xHis был получен
посредством применения набора Sulfo ChromaLink™ Biotin kit (SoluLink,
каталожный № В-1007; РРВ-16748) (50 нг/мл и 80 нг/мл), и разные разбавления
химерного Fab (Chi Fab)(0,4 мкг/мл, 0 2 мкг/ мл и 0,1 мкг/мл) оценивали в 2D-
анализе. Планшеты покрывали разными количествами антитела к FD. (компания
25 Meridian Life Sciences Inc., овечье антитело к человеческому
Fd # W90075C); 1700 нг/мл антитела к FD для первичного скрининга
(секретируемый Fab) и 900 нг/мл антитела к FD для подтверждающего
скрининга (периплазматический Fab) (смотри ФИГ. 4А).

и. *Получение привитого Fab посредством применения CDR-участки из*
30 *CD137#1* Цель преимущественной оптимизации/гуманизации состоит в
получении молекул с оптимальными аминокислотными последовательностями в
вариabельном домене, как в CDR-участках, так и в каркасном участке,
посредством преобразования как можно большего количества не относящихся к
человеку остатков в человеческую последовательность зародышевой линии, с

тем, чтобы снизить вероятность появления ADA (*антител к лекарствам*), которые могут влиять на эффективность и безопасность лекарственного средства, устранить вероятную подверженность посттрансляционным модификациям (PTM) для улучшения консистенции продукта и срока годности, и усилить другие СМС-свойства. Таким образом, “гуманизированное” антитело относится к антителу, содержащему аминокислотные остатки из не относящегося к человеку гипервариабельного участка и аминокислотные остатки из человеческих каркасных участков (FR). В некоторых вариантах осуществления, гуманизированное антитело будет содержать по сути все из по меньшей мере одного, и обычно двух, переменных доменов, в которых все или по сути все из гипервариабельных участков (например, CDR-участков) соответствуют гипервариабельным участкам не относящегося к человеку антитела, и все или по сути все из FR участков соответствуют FR участкам человеческого антитела.

Для получения гуманизированного антитела, которое не только сохраняет связывание и другие желательные свойства родительской мышиной молекулы, но также обладает характеристиками потенциального лекарственного средства, мы оценивали близко совпадающие зародышевые линии как легких, так и тяжелых цепей, посредством анализа *in silico* (*анализ с помощью вычислительных моделей*) и идентифицировали IGKV1-39*01 и IGHV3-7*01 для легкой цепи и тяжелой цепи, соответственно. CDR-участки мышиного CD137#B21 комбинировали с каркасными участками человеческих зародышевых линий: IGKV1-39*01 для VK и IGHV3-7*01 для VH. KJ2 применяли в качестве J-сегмента в VK; HJ6 применяли в качестве J-сегмента в VH.

CDR-участки из CD137-специфичных клонов прививают к зародышевой линии VK, а фрагменты ДНК зародышевой линии VH амплифицируют с помощью ПЦР, применяя известные методы. В приведенном ниже примере, применяли следующие праймеры, показанные в Таблице 9:

Таблица 9

Матрица ДНК hu Vk	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACCCGCTGACCATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGACGTGAGCACCGCCGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGCTACCGCTACACCGGCGTGCCAAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGCACTACAGCAACCCATGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID №:471)	
Матричная последовательность ДНК hu VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGGCGGCCTGGTGCAGCCAGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCGACTTCTACATGGCCTGGGTGCGCCAGGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCAACATCAACTACGACGGCAGCAGCACCTACTACCTGGACAGCCTGAAGAGCCGCTTCACCATCAGCCGCGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGCGAGGGCGACGAGGGCTGGTACTTCGACGTGTGGGGCCAGGGCACCAACCGTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID №:472)	
Клонирование hu IGHV3-7*01 VH	Прямой bio-hu IGHV3-7*01 GCCGTTSTATAGCCATAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAG (SEQ ID №:473)	Обратный hu CH1 GTGTGGGGACAGGGCACAACCTGTGACAGTGAGCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCATCG (SEQ ID №:474)
Клонирование hu IGKV1-39*01 VL	Прямой hu IGKV1-39*01 GTTCCATTTTACTCCCACTCCGACATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGC (SEQ ID №:475)	Обратный CL CAACCCCTGGACSTTTGGGCAGGGAACCTAAGCTGGAGATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATC (SEQ ID №:476)

Биотинилированный прямой праймер при этом содержит конкретную последовательность к сегменту гена VH или VL CD137 и нависающую последовательность, гибридизированную до конца последовательности гена III, и обратный праймер из консервативного константного участка (Ск или СН1).

5 Продукты ПЦР клонируют в вектор M13LE01 для получения привитого Fab, содержащего те же CDR-участки, что и мышинный Fab, но в человеческом каркасном участке. Привитый Fab сравнивали с родительским химерным Fab при титровании связывания для определения связывания с huCD137 антигеном (Фигура 4Б). Для каждого кандидата, специфичное связывание с huCD137 было
10 устойчивым во всем анализируемом диапазоне концентраций антигена как для молекул химерного, так и привитого Fab. Молекулы привитого Fab имели чуть более низкую степень связывания, как видно на Фигуре 4Б, однако их применяли в качестве основы для дальнейшей оптимизации, поскольку они представляли мышинные CDR-участки на человеческих каркасных участках. Известно, что
15 помимо CDR-участков, важную роль в расположении петель CDR играют некоторые мышинные каркасные остатки, такие как канонические остатки и остатки зоны Вернье.

к. Оптимизация каркасных участков в VK и VH человека

Для выявления критических мышинных остатков, таких как канонические,
20 межфазные остатки и остатки зоны Вернье, которые, как известно, играют важную роль в связывании с антигеном, мы выявили три положения каркасных участков в вариабельном участке легкой цепи и 5 положений каркасных участков в вариабельном участке тяжелой цепи. Этими положениями были T²⁰S, S⁶⁰D, T⁸⁵V в легкой цепи, и 5 положений в тяжелой цепи, которые
25 соответствовали аминокислотам A²³T, T⁶⁹I, N⁷⁷Q, S⁷⁸I, N⁸⁴S или Q. Для выявления человеческого каркасного участка, который сохранил связывание, подобное связыванию мышинового преимущественного кандидата (CD137#B21), мы создали фаговую библиотеку в векторе M13LE01. Мутации/ изменения осуществляли в последовательностях олигонуклеотидов, и их собирали,
30 используя стандартные методы молекулярной биологии.

Первая фаговая библиотека была сконструирована в результате комбинирования каркасных мутаций VK и VH, причем библиотека вариантов VK представляла восемь возможных вариаций, и библиотека вариантов VH представляла 128 возможных вариаций; вместе библиотеки вариантов VK и VH

представляли в общей сложности ~1024 варианта первой комбинированной библиотеки.

Клетки *E.coli* трансформировали посредством ДНК, содержащей различные комбинации, и на следующий день отбирали отдельные бляшки, представляющие один вариант. Приблизительно 2700 вариантов клонов было отобрано и подвергнуто скринингу на предмет связывания с huCD137 с помощью ИФА, как описано ранее. Сначала, клетки *E.coli* были инфицированы каждым из вариантов, с последующей индукцией 0,5 мМ IPTG, и супернатанты среды оценивали на предмет связывания. В этих исследованиях химерный анти-CD137 Fab сохраняли в качестве положительного контроля для исследований ИФА. Отбирали молекулы, которые демонстрировали связывание, подобное связыванию положительного контроля, и снова проверяли в отношении их активности связывания. На второй стадии, бляшки, представляющие отобранные связывающие молекулы, применяли для инфицирования клеток *E.coli* снова, и культуры индуцировали 0,5 мМ IPTG. После необходимых инкубаций, клетки подвергались лизису, и получали периплазматические экстракты. Указанные периплазматических экстракты применяли для подтверждения связывания с антигеном CD137. Как и ранее, мы сохраняли химерный Fab в качестве положительного контроля в наших исследованиях.

На основании результатов связывания, выявленных с помощью ИФА, были определены наилучшие комбинации каркасных последовательностей VK и VH.

Как можно увидеть на ФИГ. 5, клоны B21-55 и B21-49 имели такие же хорошие или слегка улучшенные характеристики связывания, как и химерный родительский Fab. Анализ последовательности этих каркасных участков легкой цепи показал, что аминокислотная мутация T⁸⁵V в FW3 присутствовала в обоих клонах и, таким образом, была признана важным улучшением связывания и, таким образом, должна включаться в оптимизированные молекулы. Что касается VH, аминокислотная мутация S⁷⁸I в FW3 также присутствовала в обоих клонах и, таким образом, была признана важной для оптимизированных молекул.

Таблица 10

КЛОН Fab	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ VH (подчеркнутые мутации)	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ VK
B21. Родительский	EVKLVESEGGLVQPGSSMKLSCTASGFTFSDFYMAWVRQVPEK GLEWVANINYDGSSTYYLDSLKSRFIISRДHKRN <u>IL</u> YLQMSSLKS EDTATYYCAREGDEGWYFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID №:455)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQS PKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLA <u>V</u> YYC QQHYSNPWTFGGGKLEIK (SEQ ID №:456)
B21-55	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMAWVRQAPGK GLEWVANINYDGSSTYYLDSLKSRFTISRДHKKN <u>IL</u> YLQMNSLR AEDTAVYYCAREGDEGWYFDVWGQGTTVTSS (SEQ ID №:477)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA <u>V</u> YYC QQHYSNPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID №:478)
B21-49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMAWVRQAPGK GLEWVANINYDGSSTYYLDSLKSKFTISRДHKKN <u>IL</u> YLQMNSLR AEDTAVYYCAREGDEGWYFDVWGQGTTVTSS (SEQ ID №:479)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA <u>V</u> YYC QQHYSNPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID №:480)
B21-51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMAWVRQAPGK GLEWVANINYDGSSTYYLDSLKSRFIISRДHKKN <u>IL</u> YLQMSSLRA EDTAVYYCAREGDEGWYFDVWGQGTTVTSS (SEQ ID №:481)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA <u>V</u> YYC QQHYSNPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID №:482)
B21-69	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSDFYMAWVRQAPGK GLEWVANINYDGSSTYYLDSLKSRFTISRДHKKN <u>IL</u> YLQMNSLR AEDTAVYYCAREGDEGWYFDVWGQGTTVTSS (SEQ ID №:483)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA <u>V</u> YYC QQHYSNPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID №:484)
B21-68	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMAWVRQAPGK GLEWVANINYDGSSTYYLDSLKSRFTISRДHKKN <u>IL</u> YLQMNSLR AEDTAVYYCAREGDEGWYFDVWGQGTTVTSS (SEQ ID №:485)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA <u>T</u> YYC QQHYSNPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID №:486)
B21-46	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMAWVRQAPGK GLEWVANINYDGSSTYYLDSLKSRFTISRДHKKN <u>SL</u> YLQMNSLR AEDTAVYYCAREGDEGWYFDVWGQGTTVTSS (SEQ ID №:487)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA <u>V</u> YYC QQHYSNPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID №:488)
B21-47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMAWVRQAPGK GLEWVANINYDGSSTYYLDSLKSRFIISRДHKKN <u>IL</u> YLQMNSLR	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA <u>T</u> YYC

КЛОН Fab	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ VH (подчеркнутые мутации)	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ VK
	AEDTAVYYCAREGDEGWYFDVWVGQGTTVTVSS (SEQ ID №:489)	QQHYSNPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID №:490)
B21-61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMAWVRQAPGK ГЛЕWVANIN ^Y DGSSTYYLDSLKSRFTISRДHKKN ^S LYLQMQLR AEDTAVYYCAREGDEGWYFDVWVGQGTTVTVSS (SEQ ID №:491)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQHYSNPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID №:492)
B21-72	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMAWVRQAPGK ГЛЕWVANIN ^Y DGSSTYYLDSLKSRFTISRДHKKNILYLQMSSLR AEDTAVYYCAREGDEGWYFDVWVGQGTTVTVSS (SEQ ID №:493)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQHYSNPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID №:494)
B21-48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMAWVRQAPGK ГЛЕWVANIN ^Y DGSSTYYLDSLKSRFIISRДHKKNILYLQMQLR AEDTAVYYCAREGDEGWYFDVWVGQGTTVTVSS (SEQ ID №:495)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYC QQHYSNPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID №:496)

Представлены последовательности некоторых лучших связывающих молекул из первой библиотеки.

л. *Мутационный анализ CDR-участков L-CDR1, L-CDR2, H-CDR1 и H-CDR2 в химерных VK и химерных VH*

5 Определенные аминокислотные остатки, такие как аспарагин и аспарагиновая кислота в CDR-участках, могут приводить к неоднородности кандидатов в лекарственные средства в результате подвержения посттрансляционной модификации, такой как деамидирование, гликозилирование и изомеризация изоаспартата, которые могут сокращать срок
10 годности лекарственного средства-кандидата. Кроме того, для уменьшения выработки антител к лекарственным средствам, модифицирование на уровне генов зародышевой линии стало новой стратегией изменения некритических мышинных остатков с помощью остатков зародышевой линии человека. Мы оценивали остатки CDR в отношении потенциальных предрасположенностей, и
15 оценивали изменение таких остатков, не влияющее на необходимое связывание/ функцию.

Мутационный анализ выполняли для оценки эффекта точечных мутаций в CDR-участках в легкой цепи, в L-CDR1, L-CDR2, и в H-CDR1 и H-CDR2 тяжелой цепи, и при этом полученный вариант оценивали по сравнению с
20 родительским химерным IgG, который имеет переменный участок мыши и константные участки человека. Десять точечных мутаций вводили по отдельности, одна за другой, в CDR1 и CDR2 легкой цепи (VL), и аналогично 19 точечных мутантов вводили в CDR1 и CDR2 тяжелой цепи (VH) (ФИГ. 6А и 6Б), используя стандартные методы молекулярной биологии.

25 Гены VL и VH получали посредством применения метода, который обсуждался выше, и клонировали в вектор pTT5. Последовательность каждой VL и VH подтверждалась с помощью стандартных методов.

Одноточечные мутанты были получены посредством замены химерных “родительских” остатков (IChi VK Ig) “вариантными” остатками (“выделенный жирным шрифтом” прямоугольник). В Таблице 11 и Таблице 12 представлены
30 одноточечные мутанты для CDR-участков VK в положениях аминокислот 24, 23, 29, 31 и 33 в CDR1, и 50, 53, 54, 55, и 56 в CDR2, что обеспечивает 10 вариантных конструкторов. В Таблице 13 и Таблице 14 представлены одноточечные мутанты для CDR-участков VH в положениях аминокислот 31, 32,

33, и 35 в CDR1, и 52, 53, 54, 55, 57, 58, 61, 62, 63, 64, и 66 в CDR2, что обеспечивает 19 вариантных конструкторов.

Полученные мутанты легкой цепи спаривали с родительской химерной тяжелой цепью, и мутанты тяжелой цепи спаривали с родительской химерной легкой цепью, для анализа экспрессии в клетках CHO-E на протяжении 7 дней. Родительский химерный IgG применяли в качестве положительного контроля.

Через 7 дней, супернатанты, содержащие антитела, собирали и оценивали на предмет связывания с биотинилированным huCD137 в исследовании ИФА. Влияние на CD137-специфичное связывание оценивали на основе мутаций, введенных в участки VH и VL, для каждого из вариантов. Измеряли связывание с CD137, и выражали в единицах OD (*оптической плотности*), которое сравнивали с родительским химерным IgG, для определения вклада отдельных остатков в связывание антитела к CD137 (ФИГ. 6А и 6Б).

Таблица 11: Точечные мутации, осуществленные в VL

Линейная АК №	K-CDR1					K-CDR2				
	24	28	29	31	33	50	53	54	55	56
Chi VK Ig	K	D	V	T	V	S	Y	R	Y	T
Зародышевая линия	R	S	I	S	L	A	S	L	Q	S
K24R	R	D	V	T	V	S	Y	R	Y	T
D28S	K	S	V	T	V	S	Y	R	Y	T
V29I	K	D	I	T	V	S	Y	R	Y	T
T31S	K	D	V	S	V	S	Y	R	Y	T
V33L	K	D	V	T	L	S	Y	R	Y	T
S50A	K	D	V	T	V	A	Y	R	Y	T
Y53S	K	D	V	T	V	S	S	R	Y	T
R54L	K	D	V	T	V	S	Y	L	Y	T
Y55Q	K	D	V	T	V	S	Y	R	Q	T
T56S	K	D	V	T	V	S	Y	R	Y	S

Таблица 12: CDR-участки в вариантах VL

КЛОН CD137#1	CDR-участки ВАРИАНТОВ V _k			CDR-участки РОДИТЕЛЬСКИХ V _H		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
РОДИТЕЛЬСКИЙ	KASQDVSTAVA	SASYRYT	QQHYSNPWT	GFTFSDFYMA	NINYDGSSTYYLDSLK	EGDEGWYFDV
	SEQ ID №:12	SEQ ID №:13	SEQ ID №:14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №: 8	SEQ ID №: 9
V55.A	R ASQDVSTAVA	SASYRYT	QQHYSNPWT	GFTFSDFYMA	NINYDGSSTYYLDSLK	EGDEGWYFDV
	SEQ ID №:497	SEQ ID №:13	SEQ ID №:14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №: 8	SEQ ID №: 9
V55.B	KASQ Q VSTAVA	SASYRYT	QQHYSNPWT	GFTFSDFYMA	NINYDGSSTYYLDSLK	EGDEGWYFDV
	SEQ ID №:498	SEQ ID №:13	SEQ ID №:14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №: 8	SEQ ID №: 9
V55.C	KASQD I VSTAVA	SASYRYT	QQHYSNPWT	GFTFSDFYMA	NINYDGSSTYYLDSLK	EGDEGWYFDV
	SEQ ID №:499	SEQ ID №:13	SEQ ID №:14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №: 8	SEQ ID №: 9
V55.D	KASQDV S AVA	SASYRYT	QQHYSNPWT	GFTFSDFYMA	NINYDGSSTYYLDSLK	EGDEGWYFDV
	SEQ ID №:500	SEQ ID №:13	SEQ ID №:14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №: 8	SEQ ID №: 9
V55.E	KASQDVST A LA	SASYRYT	QQHYSNPWT	GFTFSDFYMA	NINYDGSSTYYLDSLK	EGDEGWYFDV
	SEQ ID №:501	SEQ ID №:13	SEQ ID №:14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №: 8	SEQ ID №: 9
V55.F	KASQDVSTAVA	A ASYRYT	QQHYSNPWT	GFTFSDFYMA	NINYDGSSTYYLDSLK	EGDEGWYFDV
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №:502	SEQ ID №:14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №: 8	SEQ ID №: 9
V55.G	KASQDVSTAVA	SAS S RYT	QQHYSNPWT	GFTFSDFYMA	NINYDGSSTYYLDSLK	EGDEGWYFDV
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №:503	SEQ ID №:14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №: 8	SEQ ID №: 9
V55.H	KASQDVSTAVA	SASY L YT	QQHYSNPWT	GFTFSDFYMA	NINYDGSSTYYLDSLK	EGDEGWYFDV
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №:504	SEQ ID №:14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №: 8	SEQ ID №: 9
V55.I	KASQDVSTAVA	SASYR Q T	QQHYSNPWT	GFTFSDFYMA	NINYDGSSTYYLDSLK	EGDEGWYFDV
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №:505	SEQ ID №:14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №: 8	SEQ ID №: 9
V55.J	KASQDVSTAVA	SASYR S	QQHYSNPWT	GFTFSDFYMA	NINYDGSSTYYLDSLK	EGDEGWYFDV
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №:506	SEQ ID №:14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №: 8	SEQ ID №: 9

Таблица 13: Точечные мутации, осуществленные в V_H

	H-CDR1				H-CDR2															
	31	32	33	35	52	53	54	55	55	55	57	58	61	62	63	63	63	64	66	
Линейная АК №	31	32	33	35	52	53	54	55	55	55	57	58	61	62	63	63	63	64	66	
Chi V _H Ig	D	F	Y	A	N	Y	D	G	G	G	S	T	L	D	S	S	S	L	S	
Зародышевая линия	S	Y	W	S	K	Q	E	I	L	V	E	K	V	E	I	L	V	V	G	
D31S	S	F	Y	A	N	Y	D	G	G	G	S	T	L	D	S	S	S	L	S	
F32Y	D	Y	Y	A	N	Y	D	G	G	G	S	T	L	D	S	S	S	L	S	
Y33W	D	F	W	A	N	Y	D	G	G	G	S	T	L	D	S	S	S	L	S	
A35S	D	F	Y	S	N	Y	D	G	G	G	S	T	L	D	S	S	S	L	S	
N52K	D	F	Y	A	K	Y	D	G	G	G	S	T	L	D	S	S	S	L	S	
Y53Q	D	F	Y	A	N	Q	D	G	G	G	S	T	L	D	S	S	S	L	S	
D54E	D	F	Y	A	N	Y	E	G	G	G	S	T	L	D	S	S	S	L	S	
G55I	D	F	Y	A	N	Y	D	I	G	G	S	T	L	D	S	S	S	L	S	

G55L	D	F	Y	A	N	Y	D	G	L	G	S	T	L	D	S	S	S	L	S
G55V	D	F	Y	A	N	Y	D	G	G	V	S	T	L	D	S	S	S	L	S
S57E	D	F	Y	A	N	Y	D	G	G	G	E	T	L	D	S	S	S	L	S
T58K	D	F	Y	A	N	Y	D	G	G	G	S	K	L	D	S	S	S	L	S
L61V	D	F	Y	A	N	Y	D	G	G	G	S	T	V	D	S	S	S	L	S
D62E	D	F	Y	A	N	Y	D	G	G	G	S	T	L	E	S	S	S	L	S
S63I	D	F	Y	A	N	Y	D	G	G	G	S	T	L	D	I	S	S	L	S
S63L	D	F	Y	A	N	Y	D	G	G	G	S	T	L	D	S	L	S	L	S
S63V	D	F	Y	A	N	Y	D	G	G	G	S	T	L	D	S	S	V	L	S
L64V	D	F	Y	A	N	Y	D	G	G	G	S	T	L	D	S	S	S	V	S
S66G	D	F	Y	A	N	Y	D	G	G	G	S	T	L	D	S	S	S	L	G

Таблица 14: CDR-участки в вариантах VH

Клон CD137 #1	РОДИТЕЛЬСКАЯ Vκ			ВАРИАНТЫ VH		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
РОДИТЕЛЬ -СКИЙ	KASQDVSTAV A	SASYRYT	QQHYSNPW T	GFTFSDFYMA	NIN YDG SST YYL DSL KS	EGDEGWYFD V
	SEQ ID №:12	SEQ ID №:13	SEQ ID №:14	SEQ ID №:7	SEQ ID №:8	SEQ ID №:9
V55.K	KASQDVSTAV A	SASYRYT	QQHYSNPW T	GFTFSSFYMA	NINYDGSSTYYLDSLK S	EGDEGWYFD V
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №: 13	SEQ ID №: 14	SEQ ID №:507	SEQ ID №: 8	SEQ ID №: 9
V55.L	KASQDVSTAV A	SASYRYT	QQHYSNPW T	GFTFSDFYMA	NINYDGSSTYYLDSLK S	EGDEGWYFD V
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №: 13	SEQ ID №: 14	SEQ ID №:508	SEQ ID №: 8	SEQ ID №: 9
V55.M	KASQDVSTAV A	SASYRYT	QQHYSNPW T	GFTFSDFYMA	NINYDGSSTYYLDSLK S	EGDEGWYFD V
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №: 13	SEQ ID №: 14	SEQ ID №:509	SEQ ID №: 8	SEQ ID №: 9
V55.N	KASQDVSTAV A	SASYRYT	QQHYSNPW T	GFTFSDFYMA	NINYDGSSTYYLDSLK S	EGDEGWYFD V
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №: 13	SEQ ID №: 14	SEQ ID №:510	SEQ ID №: 8	SEQ ID №: 9
V55.O	KASQDVSTAV A	SASYRYT	QQHYSNPW T	GFTFSDFYMA	NIKYDGSSTYYLDSLK S	EGDEGWYFD V
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №: 13	SEQ ID №: 14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №:511	SEQ ID №: 9
V55.P	KASQDVSTAV A	SASYRYT	QQHYSNPW T	GFTFSDFYMA	NINQDGSSTYYLDSLK S	EGDEGWYFD V
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №: 13	SEQ ID №: 14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №:512	SEQ ID №: 9
V55.Q	KASQDVSTAV A	SASYRYT	QQHYSNPW T	GFTFSDFYMA	NINYE ^U GSSTYYLDSLK S	EGDEGWYFD V
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №: 13	SEQ ID №: 14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №:513	SEQ ID №: 9
V55.R	KASQDVSTAV A	SASYRYT	QQHYSNPW T	GFTFSDFYMA	NINYDI ^S SSTYYLDSLK S	EGDEGWYFD V
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №: 13	SEQ ID №: 14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №:514	SEQ ID №: 9
V55.S	KASQDVSTAV A	SASYRYT	QQHYSNPW T	GFTFSDFYMA	NINYDI ^S SSTYYLDSLK S	EGDEGWYFD V
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №: 13	SEQ ID №: 14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №:515	SEQ ID №: 9
V55.T	KASQDVSTAV A	SASYRYT	QQHYSNPW T	GFTFSDFYMA	NINYDY ^S SSTYYLDSLK S	EGDEGWYFD V
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №: 13	SEQ ID №: 14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №:516	SEQ ID №: 9
V55.U	KASQDVSTAV A	SASYRYT	QQHYSNPW T	GFTFSDFYMA	NINYDGS ^S KYYLDSLK S	EGDEGWYFD V
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №: 13	SEQ ID №: 14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №:517	SEQ ID №: 9
V55.V	KASQDVSTAV A	SASYRYT	QQHYSNPW T	GFTFSDFYMA	NINYDGSSTYYV ^D DSLK S	EGDEGWYFD V
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №: 13	SEQ ID №: 14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №:518	SEQ ID №: 9
V55.W	KASQDVSTAV A	SASYRYT	QQHYSNPW T	GFTFSDFYMA	NINYDGS ^S SKYYL ^E SLK S	EGDEGWYFD V
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №: 13	SEQ ID №: 14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №:519	SEQ ID №: 9
V55.X	KASQDVSTAV A	SASYRYT	QQHYSNPW T	GFTFSDFYMA	NINYDGSSTYYLD ^I LK S	EGDEGWYFD V
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №: 13	SEQ ID №: 14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №:520	SEQ ID №: 9
V55.Y	KASQDVSTAV A	SASYRYT	QQHYSNPW T	GFTFSDFYMA	NINYDGSSTYYLD ^L LK S	EGDEGWYFD V
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №: 13	SEQ ID №: 14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №:521	SEQ ID №: 9
V55.Z	KASQDVSTAV A	SASYRYT	QQHYSNPW T	GFTFSDFYMA	NINYDGSSTYYLD ^V LK S	EGDEGWYFD V

	SEQ ID №: 12	SEQ ID №: 13	SEQ ID №: 14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №:522	SEQ ID №: 9
V55.AA	KASQDVSTAV A	SASYRYT	QQHYSNPW T	GFTFSDFYMA	NINYDGSSTYYLDS <u>Y</u> K S	EGDEGWYFD V
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №: 13	SEQ ID №: 14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №:523	SEQ ID №: 9
V55.BB	KASQDVSTAV A	SASYRYT	QQHYSNPW T	GFTFSDFYMA	NINYDGSSTYYLDSLK Г	EGDEGWYFD V
	SEQ ID №: 12	SEQ ID №: 13	SEQ ID №: 14	SEQ ID №: 7	SEQ ID №:524	SEQ ID №: 9

Что касается вариантов легкой цепи, точечные мутанты во всех показанных положениях продемонстрировали связывание, подобное связыванию в родительском химерном IgG (ФИГ. 6А). Что касается тяжелой цепи, то связывание, подобное связыванию в родительском химерном IgG (ФИГ. 6Б), продемонстрировали точечные мутанты в положениях A³⁵S, T⁵⁸K, L⁶¹V, L⁶⁴V и S⁶⁶G.

м. Мутационная библиотека VK CD137 человека и VH в B21-55

В соответствии с Таблицей 10 и Фигурой 5, B21-55 был идентифицирован как наилучшим образом гуманизованная каркасная последовательность как варибельного участка легкой цепи, так и варибельного участка тяжелой цепи, сохраняя связывание, как и B21 родительского химерного Fab, и в этот каркасный участок были включены дополнительные изменения CDR. Три библиотеки Fab-фагов были получены в векторе LE01. Первая библиотека (Fab-фагов), L458VK, представляла собой комбинацию химерных человеческих/мышинных легких цепей VK, включая варианты с несколькими точечными мутациями FW и CDR, представляя при этом ~1024 вариантов, которые комбинировали с библиотекой привитых/гуманизованных VH, включая варианты с несколькими точечными мутациями FW и CDR. Вторая библиотека Fab-фагов, L459VH, представляла собой комбинацию привитых человеческих VH, включая CDR с точечными мутациями в комбинации с привитыми человеческими VK, представляя при этом ~512 вариантов VH. Третья библиотека Fab-фагов, L460C, представляла собой комбинацию мутаций FW человеческих VK и человеческих VH. В случае указанных библиотек, VK имели ~1024 возможных вариаций и VH имели ~512 возможных вариаций; в результате чего получили в общей сложности ~524 288 вариантов комбинированной библиотеки, L460C. Мы оценили ~1980 вариантов.

Таблица 15

Vk	VH
-----------	-----------

K24R (CDR1)	A35S (CDR1)
D28S (CDR1)	N52Q
V29I (CDR1)	D54E
T31S (CDR1)	G55A
V33L (CDR1)	T58K
S50A (CDR2)	L61V (CDR 2)
Y53S (CDR2)	D62E (CDR 2)
R54L (CDR2)	L64V (CDR2)
Y55Q (CDR2)	S66G (CDR2)
T56S (CDR2)	

Отдельные клоны вариантов V_κ CD137 #1.V55A-J, имеющих мутации в положениях K²⁴R, D²⁸S, V²⁹I, T³¹S, V³³L, S⁵⁰A, Y⁵³S, R⁵⁴L, Y⁵⁵Q и T⁵⁶S, отбирали для оценки Fab-фага в векторе LE01.

- 5 Отдельные клоны вариантов VH CD137#1 V.55.N, V55.T, V55.V, V55.W, V55.AA, V55.BB, имеющих мутации в положениях A³⁵S, N⁵²Q, D⁵⁴E, G⁵⁵A, T⁵⁸K, L⁶¹V, D⁶²E, L⁶⁴V и S⁶⁶G, отбирали для оценки в векторе LE01. Изменения N⁵²Q в H-CDR2 отбирали для оценки удаления потенциального сайта деамидирования. Изменения D⁵⁴E и D⁶²E в H-CDR2 отбирали для оценки удаления
- 10 потенциального сайта изомеризации.

Варианты сравнивали с химерным родительским CD137, и выполняли анализ 75 вариантов. Из 75 вариантов, 55 вариантов клонов имели подобное или лучшее связывание с химерной молекулой (ФИГ. 7).

- н. *Отобранные кандидаты в отношении CD137 с оптимизированной*
- 15 *последовательностью были отформатированы в виде IgG1-KO и оценены на функциональную активность*

- Из кампании оптимизации последовательности в отношении CD137#B21 были отобраны тридцать девять удачных результатов, и отформатированы в виде IgG1-KO и оценены на предмет агонистических характеристик без сшивания
- 20 вторичным антителом и с сшиванием вторичным антителом, как описано выше в системе анализа клеток NFκB-Jurakat (компания Promega), как показано на ФИГ. 8А и 8Б.

Таблица 16: Варианты B21 CD137

	Клон CD137	VH	VK
P	Родитель-ский	EVKLVESGGLVQPGSSMKLSCTASGFTFSDFYMAWVRQVPEKГLEW VANINYDGSSTYYLDSLKSRFIISRДHKRNILYLQMSSLKSEDТATYYC AREGDEGWYFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID №:455)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQKPGQSPKLL IYSASYRYTGVPDFRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSNP WTFGGGТKLEIK (SEQ ID №:456)
1	B21v1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGКLEW VANINYDASSKYYVESLКSRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTТVTVSS (SEQ ID №:525)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDISSAVAWYQKPGKAPKLLI YSASYLYTGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPEDF AVYYCQQHYSNPW TFGQGTКLEIK (SEQ ID №:526)
2	B21v2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGКLEW VANIQYEGSSKYYVESLКRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTТVTVSS (SEQ ID №:527)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQKPGKAPKLLI YAASYLYSGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPEDF AVYYCQQHYSNPW TFGQGTКLEIK (SEQ ID №:528)
3	B21v3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGКLEW VANINYDASSKYYLESVKSRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTТVTVSS (SEQ ID №:529)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISTAVAWYQKPGKAPKLLI YAASYLQSGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPEDF AVYYCQQHYSNPW TFGQGTКLEIK (SEQ ID №:530)
4	B21v4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGКLEW VANINYEГSSKYYLDSLKSRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTТVTVSS (SEQ ID №:531)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSSAVAWYQKPGKAPKLLI YAASYRQSGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPEDF AVYYCQQHYSNPW TFGQGTКLEIK (SEQ ID №:532)
5	B21v5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGКLEW VANINYDASSKYYVESLКSRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTТVTVSS (SEQ ID №:533)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISTAVAWYQKPGKAPKLLI YAASSRQTGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPEDF AVYYCQQHYSNPW TFGQGTКLEIK (SEQ ID №:534)
6	B21v6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGКLEW VANINYDASSKYYVESLКRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTТVTVSS (SEQ ID №:535)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSTALAWYQKPGKAPKLLI YSASYRYTGVPSKFRSGSGTDFTLTISSLQPEDF AVYYCQQHYSNPW TFGQGTКLEIK (SEQ ID №:536)
7	B21v7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGКLEW VANINYEГSSKYYLESVKRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTТVTVSS (SEQ ID №:537)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTALAWYQKPGKAPKLLI YSASSRQSGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPEDF AVYYCQQHYSNPWT FGQGTКLEIK (SEQ ID №:538)
8	B21v8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGКLEW VANINYDASSTYYVDSLКRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTТVTVSS (SEQ ID №:539)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDISTAVAWYQKPGKAPKLLI YAASYLQТGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPEDF AVYYCQQHYSNPW TFGQGTКLEIK (SEQ ID №:540)
9	B21v9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGКLEW VANINYEГSSKYYVESVKRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTТVTVSS (SEQ ID №:541)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSSALAWYQKPGKAPKLLI YAASYLYTGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPEDF AVYYCQQHYSNPW TFGQGTКLEIK (SEQ ID №:542)
10	B21v10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMAWVRQAPGКLEW VANINYEГSSKYYVDSLКRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTТVTVSS (SEQ ID №:543)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQKPGKAPKLLI YSASSRQSGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPEDF AVYYCQQHYSNPWT FGQGTКLEIK (SEQ ID №:544)
11	B21v11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGКLEW VANINYDASSTYYVDSLКSRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTТVTVSS (SEQ ID №:545)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSSALAWYQKPGKAPKLLI YSASYRYSGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPEDF AVYYCQQHYSNPW TFGQGTКLEIK (SEQ ID №:546)
12	B21v12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGКLEW	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSTAVAWYQKPGKAPKLLI

	Клон CD137	VH	VK
		VANINYEKSSKYYLDSLKRFTISRДНKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQTTVTVSS (SEQ ID №:547)	YSASSLQTGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPWT FGQGTKLEIK (SEQ ID №:548)
13	B21v13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANINYEKSSKYYLDSLKRFTISRДНKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQTTVTVSS (SEQ ID №:549)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDISTALAWYQQKPGKAPKLLI YSASYLYTGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPW TFGQGTKLEIK (SEQ ID №:550)
14	B21v14	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANINYDASSTYYVDSLKRFTISRДНKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQTTVTVSS (SEQ ID №:551)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSSAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASYLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPW TFGQGTKLEIK (SEQ ID №:552)
15	B21v15	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANINYDASSTYYLDSLKTRFTISRДНKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQTTVTVSS (SEQ ID №:553)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDISTALAWYQQKPGKAPKLLI YAASYLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPW TFGQGTKLEIK (SEQ ID №:554)
16	B21v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANINYEKSSKYYVESVKTRFTISRДНKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQTTVTVSS (SEQ ID №:555)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDISSAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASSRYTGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPW TFGQGTKLEIK (SEQ ID №:556)
17	B21v17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANINYEKSSKYYVDSVKTRFTISRДНKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQTTVTVSS (SEQ ID №:557)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASYRYTGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPW TFGQGTKLEIK (SEQ ID №:558)
18	B21v18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANINYEKSSKYYVDSLKTRFTISRДНKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQTTVTVSS (SEQ ID №:559)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSTALAWYQQKPGKAPKLLI YAASSRYSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPW TFGQGTKLEIK (SEQ ID №:560)
19	B21v19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANINYEKSSKYYLESVKSRFTISRДНKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQTTVTVSS (SEQ ID №:561)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASYLYSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPW TFGQGTKLEIK (SEQ ID №:562)
20	B21v20	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANIQYEGSSKYYLDSLKTRFTISRДНKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQTTVTVSS (SEQ ID №:563)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSALAWYQQKPGKAPKLLI YAASYRQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPW TFGQGTKLEIK (SEQ ID №:564)
21	B21v22	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANINYEASSKYYVDSLKTRFTISRДНKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQTTVTVSS (SEQ ID №:565)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSALAWYQQKPGKAPKLLI YAASYRQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPW TFGQGTKLEIK (SEQ ID №:566)
22	B21v23	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANIQYEGSSKYYVESLKTRFTISRДНKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQTTVTVSS (SEQ ID №:567)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSALAWYQQKPGKAPKLLI YAASYRQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPW TFGQGTKLEIK (SEQ ID №:568)
23	B21v24	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANIQYEGSSKYYVESLKTRFTISRДНKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQTTVTVSS (SEQ ID №:569)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISTALAWYQQKPGKAPKLLI YSASYRQTGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPW TFGQGTKLEIK (SEQ ID №:570)

	Клон CD137	VH	VK
24	B21v25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANIQYEGSSKYYVESLKGFRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID №:571)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISTAVAWYQQKPGKAPKLLIY AASYLYSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPWT FGQGTKLEIK (SEQ ID №:572)
25	B21v26	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANIQYEGSSKYYVESLKGFRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID №:573)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVSTAVAWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPW TFGQGTKLEIK (SEQ ID №:574)
26	B21v27	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANIQYEGSSKYYVESLKGFRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID №:575)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPWT FGQGTKLEIK (SEQ ID №:576)
27	B21v28	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANIQYEGSSKYYVESLKGFRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID №:577)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSISTAVAWYQQKPGKAPKLLI YAASSRQTGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPW TFGQGTKLEIK (SEQ ID №:578)
28	B21v29	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANIQYEGSSKYYVESLKGFRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID №:579)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISTALAWYQQKPGKAPKLLIY AASYRYSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPWT FGQGTKLEIK (SEQ ID №:580)
29	B21v30	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANIQYEGSSKYYVESLKGFRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID №:581)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDISTALAWYQQKPGKAPKLLI YAASYLYSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPW TFGQGTKLEIK (SEQ ID №:582)
30	B21v31	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANIQYEGSSKYYVESLKGFRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID №:583)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISTALAWYQQKPGKAPKLLIY SASSLQTVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPWTF GQGTKLEIK (S(SEQ ID №:584))
31	B21v32	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANIQYEGSSKYYVESLKGFRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTTVTVSS (S(SEQ ID №:585))	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISTALAWYQQKPGKAPKLLI YSASYLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPW TFGQGTKLEIK (S(SEQ ID №:586))
32	B21v33	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANIQYEGSSKYYVESLKGFRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTTVTVSS (S(SEQ ID №:587))	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSISTALAWYQQKPGKAPKLLIY SASYLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPWTF GQGTKLEIK (S(SEQ ID №:588))
33	B21v34	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANIQYEGSSKYYVESLKGFRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTTVTVSS (S(SEQ ID №:589))	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISTAVAWYQQKPGKAPKLLI YAASYLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPW TFGQGTKLEIK (S(SEQ ID №:590))
34	B21v35	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANINYEKSSKYYVESVKGFRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTTVTVSS (S(SEQ ID №:591))	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSVSSALAWYQQKPGKAPKLLI YAASYRQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPW TFGQGTKLEIK (S(SEQ ID №:592))
35	B21v36	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANINYEKSSKYYVESVKGFRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQGTTVTVSS (S(SEQ ID №:593))	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISTAVAWYQQKPGKAPKLLIY AASYLYSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPWT FGQGTKLEIK (S(SEQ ID №:594))
36	B21v37	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANINYEKSSKYYVESVKGFRFTISRДHKKNILYLQMNSLRAEDTAVYY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISTALAWYQQKPGKAPKLLIY AASYRYSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPWT

	Клон CD137	VH	VK
		CAREGDEGWYFDVWGQTTVTVSS (S(SEQ ID №:595))	FGQGTKLEIK (S(SEQ ID №:596))
37	B21v38	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANINIEGSSKYYLESVKSRFTISRДHKKNILYLMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQTTVTVSS (S(SEQ ID №:597))	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSTALAWYQQKPGKAPKLLI YAASYLYTGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPW TFGQGTKLEIK (S(SEQ ID №:598))
38	B21v39	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMSWVRQAPGKLEW VANINIEGSSSTYYVESVKГRFTISRДHKKNILYLMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQTTVTVSS (S(SEQ ID №:599))	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISTALAWYQQKPGKAPKLLI YSASYLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPW TFGQGTKLEIK (S(SEQ ID №:600))
39	B21v40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMAWVRQAPGKLEW VANINIEGSSKYYLESKГRFTISRДHKKNILYLMNSLRAEDTAVYY CAREGDEGWYFDVWGQTTVTVSS (S(SEQ ID №:601))	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQISTALAWYQQKPGKAPKLLIY SASYLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSNPWF GQGTKLEIK (S(SEQ ID №:602))

Из указанных тридцати девяти IgG отбирали пять типичных кандидатов и форматировали в виде биспецифических молекул “DoppelmaB” в комбинации с молекулами FAP с оптимизированной последовательностью.

5 *о. Оптимизация последовательности клона кандидата в отношении CD137 CD137 #7 (A49)*

10 Оценивали дополнительную молекулу-кандидата, полученную из гуманизированной мыши AlivamaB. Для того чтобы оптимизировать последовательность кандидата, были мутированы потенциальные предрасположенности деамидирования NG до QG в легкой цепи и NY до QY в переменном участке тяжелой цепи. Кроме того, склонные к агрегации участки в обеих цепях были мутированы либо до L до G/A, либо I до M.

Было получено восемь оптимизированных мутантных конструкций, и их оценивали на предмет связывания с CD137 в системе анализа клеток NFkB-Jurkat (компания Promega), как описано ранее (смотри выше).

Таблица 17: Варианты A49 CD137

ВА-РИАНТ	КЛОИ А49 CD137 #	VH	VK
P	Родитель-ский А49	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKFL EWIGYIYYSGSTNYPNPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARDQSGGGSFQHWGQGLTVTVSS (SEQ ID №:421)	EIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISICRSSQSLLYSNGYNHLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSNRASGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFGQ GTKLEIK (SEQ ID №:422)
40	A49v41	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKFL EWIGYIYYSGSTNYPNPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARDQSGGGSFQHWGQGLTVTVSS (SEQ ID №:603)	EIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISICRSSQSLLYSNAYNHLDWYLQKPGQSPQLLI YAGSNRASGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFG QGTKLEIK (SEQ ID №:604)
41	A49v42	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKFL EWIGYIYYSGSTNYPNPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARDQSGGGSFQHWGQGLTVTVSS (SEQ ID №:605)	EIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISICRSSQSLLYSQGYNHLDWYLQKPGQSPQLLI YGGSNRASGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFG QGTKLEIK (SEQ ID №:606)
42	A49v43	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKFL EWMFYIYYSGSTNINPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARDQSGGGSFQHWGQGLTVTVSS (SEQ ID №:607)	EIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISICRSSQSLLYSNGYNHLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSNRASGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFGQ GTKLEIK (SEQ ID №:608)
43	A49v44	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKFL EWMFYIYYSGSTQYNPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARDQSGGGSFQHWGQGLTVTVSS (SEQ ID №:609)	EIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISICRSSQSLLYSNAYNHLDWYLQKPGQSPQLLI YAGSNRASGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFG QGTKLEIK (SEQ ID №:610)
44	A49v45	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKFL EWMFYIYYSGSTNINPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARDQSGGGSFQHWGQGLTVTVSS (SEQ ID №:611)	EIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISICRSSQSLLYSNAYNHLDWYLQKPGQSPQLLI YAGSNRASGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFG QGTKLEIK (SEQ ID №:612)
45	A49v46	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKFL EWMFYIYYSGSTQYNPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARDQSGGGSFQHWGQGLTVTVSS (SEQ ID №:613)	EIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISICRSSQSLLYSNGYNHLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSNRASGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFGQ GTKLEIK (SEQ ID №:614)
46	A49v47	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKFL EWMFYIYYSGSTNINPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARDQSGGGSFQHWGQGLTVTVSS (SEQ ID №:615)	EIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISICRSSQSLLYSQGYNHLDWYLQKPGQSPQLLI YGGSNRASGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFG QGTKLEIK (SEQ ID №:616)
47	A49v48	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKFL EWMFYIYYSGSTQYNPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARDQSGGGSFQHWGQGLTVTVSS (SEQ ID №:617)	EIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISICRSSQSLLYSQGYNHLDWYLQKPGQSPQLLI YGGSNRASGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFG QGTKLEIK (SEQ ID №:618)

Активность связывания выражали в виде активности люциферазы (RLU) и представляли в виде гистограммы. Два положительных контроля, на основе известных связывающих CD137 молекул (урелумаб (антитело к CD137, компания BMS) и утомилумаб (антитело к CD137, компания Pfizer)) сравнивали с восемью связывающими CD137 молекулами, выделенными выше, а также сравнивали с другими оптимизированными кандидатами.

Пример 3: Данные картирования эпитопов кандидатов связывания с антителом к CD137:

CD137 состоит из четырех богатых на цистеин доменов (CRD), которые называют CRD1, CRD2, CRD3 и CRD4, которые расположены расстоянии от дальнего до близкого к мембране клетки, соответственно. CRD1 относится к аминокислотам 24-45 последовательности Q07011 в Uniprot. CRD2 образуется аминокислотами 47-86, CRD3 образуется аминокислотами 87-118, и CRD4 образуется аминокислотами 119-159. Клетки Jurkat, экспрессирующие химерные белки CD137 мыши и человека, были получены посредством замены CDR человека с соответствующую мышиными аналогами. Антитела к CD137 инкубировали с этими рекомбинантными клеточными линиями и, при добавлении афлуоресцентно-меченного вторичного антитела, посредством проточной цитометрии определяли связывание. Все антитела были способны связываться с полноразмерным CD137 человека, который экспрессирует линия клеток Jurkat, но связывание было потеряно, когда различные CDR человека заменяли мышиными. Этот подход позволил изобретателям объяснить значение CRD, где различные антитела к CD137 связываются в белке CD137 человека (смотри ФИГ. 9).

С помощью картирования доменов, мы определили, что CD137-связывающие молекулы в соответствии с изобретением связываются с CRD3 или местом соединения CRD2/3. CD137 #1 и его варианты связываются с CRD3. CD137#7 и его варианты связываются с местом соединения CRD2/3. Напротив, природный лиганд CD137, CD137L, связывается с CRD2.

Для того чтобы выяснить, меняется ли связывание природного лиганда CD137 посредством изобретения, мы создали клетки HEK293, экспрессирующие лиганд CD137 человека (CD137-L), которые культивировали вместе с клетками Jurkat, экспрессирующими CD137 человека. Активацию пути передачи сигналов NFkB на указанные клетки Jurkat устанавливали посредством активности

люциферазы. Молекулы изобретения не конкурируют с функциональной активацией, индуцируемой посредством CD137L, в то время как другие существующие молекулы урелумаб (компания BMS) и утолимумаб (компания Pfizer) и клон 2.11 FAP-направленной антиген-связывающей молекулы Fc-слитого расщепленного тримерного лиганда 4-1BB (относится к конструкту 2.11 молекулы расщепленного тримерного 4-1BBL (71-248)/FAP(28H1) компании Roche, описанному в WO 2017194438 как SEQ ID №№:113, 114, и 116, и соответствующие SEQ ID №№: 663, 664, 665, и 666, которые содержатся в этой заявке) блокируют активацию, индуцируемую посредством CD137-L (ФИГ. 10А и 10Б).

а. Конструирование химер человек-мышь

Клетки Jurkat, экспрессирующие химерный вариант CD137, были созданы таким образом, что каждый из участков CDR человека был впоследствии заменен эквивалентным участком CRD мыши. Вкратце, клетки Jurkat, экспрессирующие химерный вариант CD137, были созданы таким образом, что каждый из участков CDR человека был впоследствии заменен эквивалентным участком CRD мыши.

Для этой цели, после трансфекции клеток 293FT плазмидами, содержащими различные модификации кДНК CD137 человека, были получены лентивирусные супернатанты. В этих модифицированных последовательностях CD137 человека, аминокислоты между цистеинами в человеческом CDR1 или CRD2 или CRD3 или CRD4 были заменены мышинным аналогом. В частности, в одном конструкте, SEQ ID №:350, соответствующую аминокислотам 23-45 CRD1 человека, заменяли мышинным CRD1, соответствующим SEQ ID №:360. В другом конструкте, SEQ ID №:351, соответствующую аминокислотам 46-86 CRD2 человека, заменяли мышинным CRD2, соответствующим SEQ ID №:361. В третьем конструкте, SEQ ID №:352, соответствующую аминокислотам 87-118 CRD3 человека, заменяли мышинным CRD3, соответствующим SEQ ID №:362. В четвертом конструкте, SEQ ID №:353, соответствующую аминокислотам 119-159 CRD4 человека, заменяли мышинным CRD4, соответствующим SEQ ID №:363.

Плазмиды также содержали ген устойчивости к пурамицину, обеспечивающий селекцию клеток, в которых экспрессируется конструкт. В 12-луночный планшет, высевали $2,5 \times 10^5$ клеток 293FT на лунку в 1,5 мл полной DMEM-среды. На следующий день, готовили смесь для трансфекции

посредством смешивания 75 микролитров буферного раствора для трансфекции JetPRIME[®] (компания Polyplus Transfection), 0,5 мкг ДНК (плазмиды CD137) и 1 микролитр смеси для упаковки (psPAX2, pMD2.G). После встряхивания с перемешиванием, добавляли 2 мкл реагента JetPRIME[®], и смесь встряхивали с перемешиванием снова. По истечении 15 минут при комнатной температуре, смесь для трансфекции выливали на клетки (при 70-80 % слияния). По истечении 4 часов при температуре 37 °С, питательную среду заменяли свежей питательной средой. На следующий день, супернатант вируса собирали и, после добавления сульфата протамина, затем применяли для трансдукции клеток Jurkat. Положительно заряженный поликатионный сульфат протамина уменьшает силы отталкивания между клеткой и вирусом, что приводит к более высокой эффективности трансдукции. Клетки Jurkat инкубировали с содержащими лентивирус супернатантами, и культивировали на протяжении 48 часов при температуре 37 °С в CO₂-инкубаторе. После этого, добавляли пуромицин (конечная концентрация 1 мкг/мл) для селекции трансдуцированных клеток. После двух последовательных циклов удаления вируса, клетки применяли для определения доменов, с которыми различные CD137-нацеливающиеся антитела связываются с белком CD137 человека.

б. Связывание CD137-кандидатов с разными эпитопами:

2 x 10⁵ клеток Jurkat, экспрессирующих указанные варианты CD137, в 50 мкл буферного раствора, инкубировали с 50 мкл связывающих молекул антител к CD137 на протяжении 20 минут при температуре 4 °С. После этого, клетки промывали дважды для удаления несвязанных антител, и образцы дополнительно инкубировали с меченым R-Phycoerythrin AffiniPure F(ab')₂ ослиным фрагментом антитела против IgG (H+L) человека. После дополнительных 20 минут инкубации при температуре 4 °С в темноте, образцы промывали дважды и измеряли флуоресценцию в проточном цитометре (FACSCanto™ II Analyzer, компания BD Biosciences). Уменьшение или отсутствие связывания с конкретной модификацией CD137 отображает отсутствие связывания антитела к CD137, когда CDR человека был заменен мышиным аналогом.

Таблица 18

Эпитоп	№№ аминокислот SEQ ID № эпитопа:	Клоны CD137, которые связывают эпитоп (VH/VL)
--------	----------------------------------	---

Эпитоп	№№ аминокислот	SEQ ID № эпитопа:	Клоны CD137, которые связывают эпитоп (VH/VL)
CRD1	24-45	SEQ ID №:350	A1 (SEQ ID №:375, 376), A2 (SEQ ID №:377, 378), A4 (SEQ ID №:381, 382), A12 (SEQ ID №:389, 390), A30 (SEQ ID №:405, 406), A41 (SEQ ID №:409, 410), A44 (SEQ ID №:413, 414), A45 (SEQ ID №:415, 416), A46 (SEQ ID №:417, 418), A47 (SEQ ID №:419, 420), B3 (SEQ ID №:433, 434), B9 (SEQ ID №:441, 442), B10 (SEQ ID №:443, 444), B12 (SEQ ID №:445, 446), B30 (SEQ ID №:461, 462), B31 (SEQ ID №:463, 464), урелумаб (SEQ ID №:371, 372) (BMS)
CRD1-2	23-86	SEQ ID №:355	A3 (SEQ ID №:379, 380), A25 (SEQ ID №:399, 400), A57 (SEQ ID №:427, 428), B5 (SEQ ID №:437, 438)
CRD2	47-86	SEQ ID №:351	A16 (SEQ ID №:393, 394), A17 (SEQ ID №:395, 396), A26 (SEQ ID №:401, 402), A27 (SEQ ID №:403, 404), A39 (SEQ ID №:407, 408), B1 (SEQ ID №:429, 430), B2 (SEQ ID №:431, 432), B7 (SEQ ID №:439, 440), B13 (SEQ ID №:447, 448)
CRD2-CRD3	46-117	SEQ ID №:356	A49 (SEQ ID №:421, 422)
CRD3	87-118	SEQ ID №:352	B20 (SEQ ID №:453, 454), B21 (SEQ ID №:455, 456)
CRD3-4	88-158	SEQ ID №:357	(утомилумаб (Pfizer) (SEQ ID №:373, 374)
CRD4	119-159	SEQ ID №:353	нет
CRD2/CRD3/CRD4		SEQ ID №:358	A42 (SEQ ID №:411, 412), B4 (SEQ ID №:435, 436)
участки CRD внеклеточного домена (ECD)		SEQ ID №:1	A19 (SEQ ID №:298, 399), B27 (SEQ ID №:457, 458)

в. *Получение клеток, экспрессирующих лиганд CD137:*

В 12-луночный планшет высевали $2,5 \times 10^5$ клеток 293FT на лунку в 1,5 мл полной DMEM-среды. На следующий день, готовили смесь для трансфекции посредством смешивания 75 мкл буферного раствора JetPRIME[®], 0,5 мкг ДНК (плазмиды CD137) и 1 мкл смеси для упаковки (psPAX2, pMD2.G). После встряхивания с перемешиванием, добавляли 2 мкл реагента JetPRIME[®], и смесь

снова встряхивали с перемешиванием. После 15 минут при комнатной температуре, смесь для трансфекции выливали на клетки (при 70-80 % слияния). По истечении 4 часов при температуре 37 °С, питательную среду заменяли свежей питательной средой. На следующий день, супернатант вируса собирали и, после добавления сульфата протамина (конечная концентрация 4 мкг/мл), впоследствии применяли для трансдукции клеток 293FT. Положительно заряженный поликатионный сульфат протамина уменьшает силы отталкивания между клеткой и вирусом, что приводит к более высокой эффективности трансдукции. Клетки 293FT ($0,5 \times 10^5$ клеток в 1,5 мл питательной среды) инкубировали с содержащими лентивирус супернатантами, и культивировали на протяжении 48 часов при температуре 37 °С в CO₂-инкубаторе. После этого, добавляли пуромицин (конечная концентрация 1 мкг/мл) для селекции трансдуцированных клеток. После двух последовательных циклов удаления вируса, экспрессия CD137-L подтверждалась с помощью проточной цитометрии в FACSCanto[®] II Analyzer (компания BD Biosciences).

г. *Определение блокады связывания лиганда CD137:*

$0,2 \times 10^5$ клеток НЕК293, экспрессирующих CD137-L человека, высевали в 96-луночный планшет. После 30 минут инкубации при температуре 37 °С в инкубаторе с 5 % CO₂, к экспрессирующим CD137-L клеткам добавляли 12,5 мкл серийного разбавления различных связывающих CD137 молекул. После 30 минут инкубации при температуре 37 °С в инкубаторе с 5 % CO₂, добавляли клетки Jurkat, экспрессирующие CD137 человека, а также кДНК люциферазы под промотором NFκB (компания Promega) ($0,2 \times 10^5$ клеток на лунку). После 5 часов инкубации, планшеты помещали при комнатной температуре на протяжении 10 минут, и в каждую лунку добавляли 75 мкл реагента Bio-Glo[™] (компания Promega). Люминесценцию, как измерение активации клеток Jurkat, опосредованной взаимодействием CD137L-CD137, обнаруживали с помощью считывателя планшетов EnVision[®] (компания Perkin-Elmer).

Пример 4: Получение связывающих доменов, которые распознают белок активации фибробластов (FAP):

Антитела к FAP были получены посредством применения платформы OmniAb[®] (компания Crystal Biosciences), причем трансгенные куры или OminChicken[®] сконструированы с помощью генной инженерии для экспрессии геномных локусов тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина, содержащих

вариабельные участки зародышевой линии человека, гены IgHV3-23*04/IgKV3-11*01 VH и VL, соответственно, по существу, как описано в US 9 404 125.

Десять OmniChicken[®] иммунизировали внутримышечно 100 мкг FAP человека с полным адьювантом Фрейдна. Двумя неделями позже, пять из десяти птиц
 5 получали 100 мкг FAP человека с неполным адьювантом, и пять из десяти птиц получали 100 мкг FAP мыши с неполным адьювантом. Последующие бустерные дозы осуществляли каждые две недели, причем пять из десяти птиц при этом получали только FAP человека, а пять из десяти птиц при этом получали чередующиеся FAP человека и мыши. FAP яванского макака не был включен в
 10 программу иммунизации, по причине почти 100 % гомологии между FAP человека и яванского макака.

Таблица 19

Антигенные домены, которые применяли для иммунизации			Процент гомологии с FAP человека (%)
SEQ ID №:4	FAP ЧЕЛОВЕКА	NCBI: NP_004451 и Uniprot: Q12884	100
	FAP ЯВАНСКОГО МАКАКА	XP_005573377 Ген ID : 102134935	99
SEQ ID №:5	FAP МЫШИ	NCBI: NP_032012.1 и UniProt: P97321	89

В качестве альтернативы видам млекопитающих, птицы (и в частности, куры) являются хорошим выбором, поскольку они филогенетически далеки от человека, вырабатывают антитела с высокой аффинностью и специфичностью, которые могут распознавать уникальные эпитопы, недоступные у мышей. Расширенный охват эпитопов в этом случае является преимуществом, поскольку
 15 повышает шанс доступа к функционально различным участкам мишени.

После иммунизации, извлекали сыворотку крови иммунизированных трансгенных животных. Титры сывороток антител, специфичных к FAP, определяли каждую неделю с помощью ИФА. Когда был достигнут достаточный титр, внутривенно, без адьюванта, вводили конечную бустерную дозу, которая составляла либо 100 мкг FAP человека, ли по 50 мкг FAP человека и мыши.
 20

Для получения моноклональных антител, специфичных в отношении FAP, через 4 дня после последней бустерной дозы, из семи иммунизированных трансгенных птиц извлекали клетки селезенки, вырабатывающие антитела. кДНК, кодирующие FAP-специфичные антитела, клонировали с помощью
 25

стандартных методов молекулярной биологии, и экспрессировали в трансфицированных клетках. Получение *in vitro* моноклональных антител из клонированных кДНК молекул было описано у Andris-Widhopf и др., J. Immunol Methods 242:159 (2000), и у Burton, Immunotechnology 1:87 (1995), описания которых включены в эту заявку посредством ссылки.

а. *Улучшение кросс-реактивности клонов относительно разных видов с помощью стратегий иммунизации и скрининга:*

Сначала проводили скрининги инкапсулированного в гель микроокружения (GEM: *gel encapsulated microenvironment*) (компания Crystal Biosciences), со спленоцитами, извлеченными из шести птиц, используя репортерные гранулы; с целью селекции на кросс-реактивность, одну репортерную гранулу покрывали FAP человека, а другую репортерную гранулу покрывали FAP мыши. Поскольку белки человека и яванского макака гомологичны на 99 %, скринингов яванского макака не проводили.

б. *Получение клеточных линий, стабилизирующих экспрессию FAP человека и мыши:*

FAP в высокой степени экспрессируется на поверхности клеток ассоциированных с раком фибробластов (CAF), которые являются ключевым компонентом микроокружения опухоли многих видов рака. HT1080 представляет собой линию клеток фибросаркомы, которую широко применяют в качестве модели определения потенциальной роли FAP в микроокружении опухоли. Клетки HT1080 трансфицировали для экспрессии высоких уровней FAP человека. Меланома В16 представляет собой линию опухолевых клеток мышей, которую применяют для изучения метастазирования и образования солидных опухолей. Клетки В16 трансфицировали для экспрессии высоких уровней FAP мыши.

С этой целью, получали супернатанты лентивируса, в результате трансфекции клеток 293FT плазмидами, содержащими разные виды кДНК FAP. Плазмиды также содержали ген устойчивости к пурамицину, для того чтобы обеспечивать селекцию клеток, в которых экспрессируется конструктор. На 10 см культурального планшета, высевали 5×10^6 клеток 293FT в 10 мл полной ДМЕМ-среды. На следующий день, получали смесь для трансфекции посредством смешивания 500 мкл буферного раствора JetPRIME[®], 8 мкг ДНК (плазмиды FAP) и 20 мкл смеси для упаковки (psPAX2, pMD2.G). После

встряхивания с перемешиванием, добавляли 36 мкл реагента JetPRIME[®], и смесь встряхивали с перемешиванием снова. После 15 минут при комнатной температуре, смесь для трансфекции выливали на клетки (при 70-80 % слияния). После 4 часов при температуре 37 °С питательную среду заменяли свежей

5 питательной средой. На следующий день, супернатант вируса собирали и, после добавления сульфата протамина, впоследствии применяли для трансдукции клеток HT-1080 или В16. Положительно заряженный поликатионный сульфат протамина уменьшает силы отталкивания между клеткой и вирусом, что приводит к более высокой эффективности трансдукции. Клетки HT-1080 или

10 В16 при 30 % слияния в Т25-колбах (4 мл полной питательной среды) инкубировали с содержащими лентивирус супернатантами, и культивировали на протяжении ночи при температуре 37 °С в СО₂-инкубаторе. На следующий день, клетки промывали PBS (*фосфатно-солевой буферный раствор*), и повторно суспендировали в полной среде, содержащей пуромицин (конечная

15 концентрация 1 мкг/мл), с тем, чтобы обеспечить селекцию трансдуцированных клеток. После двух последовательных циклов удаления вируса, экспрессия FAP подтверждалась с помощью проточной цитометрии, посредством применения FACSCanto[®] II analyzer (компания BD Biosciences).

в. Переформатирование антител к FAP в ScFv-Fc

20 Как их используют в этой заявке, термины "одноцепочечный Fv", "одноцепочечное антитело," и "scFv" относятся к фрагменту антитела, состоящего из одной цепи полипептида, который содержит переменные участки как тяжелой, так и легкой цепи, но не содержит константных участков. Как правило, одноцепочечное антитело дополнительно содержит пептидный

25 линкер, соединяющий домены VH и VL, что позволяет образовывать желательную структуру для связывания с антигеном.

Одноцепочечные антитела подробно описаны у Pluckthun в The Pharmacology of Monoclonal Antibodies. т. 113, изд. Rosenberg and Moore eds. Известны разные способы получения одноцепочечных антител, например, как

30 описано в US 4 946 778 и US 5 260 203; в публикации международной заявки на получение патента № WO 88/01649; Bird (1988) Science 242:423- 442; Huston и др. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. США 85:5879-5883; Ward и др. (1989) Nature 5 334:54454; Skerra и др. (1988) Science 242:1038-1041. В некоторых

вариантах осуществления, по меньшей мере один, а предпочтительно два фрагмента антитела scFv связаны с Fc-участком антитела.

5 Была выявлена выборка клонов, связывающих FAP, их форматировали в виде ScFv-Fc, и молекулы очищали посредством применения аффинной хроматографии на белке А, и проверяли на связывание со стабильными клеточными линиями, экспрессирующими FAP человека и мыши (ФИГ. 9А, 9Б, и 9В).

10 Для конструирования сегмента гена, кодирующего scFv белка активации фибробластов (FAP), пары генов VL и VH, кодирующие переменные домены, связывающие белок активации фибробластов (FAP), соединяли сегментом гена, кодирующим гибкий линкер пептидной последовательности GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID №:282). Полученные сегменты генов, кодирующие scFv, в свою очередь, клонировали в рамке генетического кода к 3'-концу гена, кодирующего тяжелую цепь антитела IgG человека. Указанные 15 кодирующие сегменты синтезировали с помощью методов перекрывающейся ПЦР, и клонировали в вектор экспрессии рТТ5.

г. Рекомбинантные белки FAP, связывающиеся с клетками, экспрессирующими FAP человека и мыши.

20 Клетки HT-1080 и В16, не экспрессирующие FAP, сохраняли в качестве контроля. Было выявлено 149 антител к FAP, и затем их сортировали на основе % содержания мономера (> 85 %) после первой стадии очистки, определения температуры (>60 °С), и элюирования из аналитической колонки гидрофобного взаимодействия, степени гидрофобности различных белков (менее 9 минут). Из 149 кандидатов отбирали следующие 11 антител для получения 25 биспецифических антител в комбинации с отобранными анти-CD137 связывающими молекулами.

Таблица 20: FAP-специфичные клоны, связывающиеся с FAP человека и мыши

Клон	VH	VL	MFI связывания FAP человека	MFI связывания FAP мыши
FAP.65.F1	DVQLVESGGGLVHPGGSLRLSCAASFTTFANYIMSWVRQAPGKFLWVSGITGSSTNTYYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLEMNSLRAEDTAVYYCAKHQLYPYYAMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID №:619)	EIVLTQSPGSLSLSPGERATLSCRASQPIDSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATDIPDRFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQYYDWPPVTFGGGTKVEIK (SEQ ID №:620)	35592	1840
FAP.63.C10	DVQLVESGGGVVVRPAGESLTLSCAASGFTFSSYDMFWVRQAPGEGLEWVSGIRGSGGSTYYADSVKGRFTISRDSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKENNRHSFFEYWGLGTLVTVSS (SEQ ID №:621)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRASGISDRFSGSGSGTEFTLTISRLEPEDFAVYYCQYYNWPPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID №:622)	49714	879
FAP.63.G3	DVQLVESGGGVVVRPAGESLTLSCAASGFTFSSNYDMFWVRQAPGEGLEWVSGIRGRGGSTYYADSVKGRFTISRDSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKENNRHSFFEYWGLGTLVTVSS (SEQ ID №:623)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGHYLAWEYQQKPGQAPRLLIYDASNRADIPDRFSGSGSGTEFTLTISRLEPEDFAVYYCQYYNWPPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID №:624)	72776	1406
FAP.63.D7	DVQLVESGGGVVVRPAGESLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPGEGLEWVSFISSGGAYTHYTDVSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKEKEIWNAFFDYWGLGTLVTVSS (SEQ ID №:625)	EIVLTQSPATLNLSPGDRATLTCRASQTVGSKLAWYQQTSQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTEFTLTISLLEPEDFAVYYCQYYDWPPVTFGGGTKVEIK (SEQ ID №:626)	49103	3356
FAP.63.H3	DVQLVESGGGVVVRPAGESLRLSCAASGFTFSSYDMFWVRQAPGEGLEWVSGIRVSGGSTYYADSVKGRFTISRDSNNTLYLQMNLSLRAEDTALYYCAKENDRHSFFEYWGLGTLVTVSS (SEQ ID №:627)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASDRATAIPDRFSGSGSGTEFTLTISRLEPEDFAVYYCQYYNWPPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID №:628)	75000	2834
FAP.84.A11	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMSNFAMTWVRQAPGEGLEWVSGIRSGTYYADSVKGRFTVSRDNSKNTLYLQMNLSLRAEDTAIYYCAKTWGTVEYFDYWGLGTLVTVSS (SEQ ID №:629)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQPINNYLAWYQQKPGQAPRLIFASNRATGIPDRFSGSGSGTEFTLTISLLEPEDFAVYYCQYYDWPPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID №:630)	27337	1406
FAP.84.B2	DVQLVESGGGVVVRPAGESLRLSCAASGFSSYAMNWVRQAPGKFLWVSAISGGGGTFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAIYYCAKDPFGYGFDDSWGLGTLVTVSS (SEQ ID №:631)	EIVMTQSPATLSVSPGDRATLSCRASQTVGSKLAWYQQKPGQAPRLLIYAASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQYYNWPVAFGGGTKVEIK (SEQ ID №:632)	17267	2255
FAP.84.B7	DVQLVESGGGVVVRPAGESLRLSCAASGFIFRNYAMTWVRQAPGEGLEWVSTIRSSGSGRTDTYYADSVKGRFTISRDSNNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKSGTFWDTFFDYWGLGTLVTVSS (SEQ ID №:633)	EIVLTQNPGLNLSLSPGERATLTCRASQSAGRNLAWYQQKPGQTPRLLIYDVNTRATGIPDRFSGSGSGTEFTLTISLQNEIDFAVYYCQYYNWPPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID №:634)	24025	1606
FAP.84.B8	DVQLVESGGSVVVRPAGESLRLSCAASGFPFSSYPMTWVRQAPGEGLEWVSSIRGSGDRIHYADSVKGRFTISKDSSNNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCATGNFFDYWGLGTLVTVSS	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQTVATYLAWEYQQKPGQAPRLLIYAISRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDSAVYYCQYKDWPPVTFGGGTKVEIK (SEQ ID №:636)	24251	1492

	(SEQ ID №:635)			
FAP.84.A9	DVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFPFSSYPMTW VRQAPGEGLEWVSSIRPIGDRIHYADSVKTRFTISRDS SNNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATGWNFFDYWGL GTLVTVSS (SEQ ID №:637)	EIVLTQSPGTLSPGERATLTCRASQTVATYLAWYQQKP GQAPRLLIYAAISRATGIPDRFIGSGSGTDFTLINRLEPED FAVYYCQQYKDWPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID №:638)	25383	1304
FAP.84.C1 1	DVQLVESGGGVVVRPGESLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGEGLEWVAISGSGDRIHYA <u>DS</u> VKTRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLRYYS ¹ SGSPV FDYWGLGTLVTVSS (SEQ ID №:639)	EIVLTQSPGTLSPGERAILS ¹ CRASQTVGSRLAWYQQKPG QAPRLLIYAASSRATGIPDRFIGSGSGTEFTLTISLQSEDF AVYYCQQYYDWPPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID №:640)	27001	1427

Пример 5: Получение биспецифических конструкторов, нацеливающихся на CD137 и белок активации фибробластов (FAP)

Затем, пары генов VL и VH, кодирующих (4-1BB, TNFRSF9)-антитело к CD137 урелумаб, как обсуждалось выше, форматировали в виде биспецифического формата, описанного в Примере 1. При этом гены VH клонировали в вектор экспрессии рТТ5 в виде слияния в рамке генетического кода на 5'-конце гена, кодирующего I γ человека. Одиннадцать FAP-кандидатов (Таблица 20) были выбраны и отформатированы в виде биспецифических молекул, причем ген, кодирующий scFv, связывающий белок активации фибробластов (FAP), клонировали в рамке генетического на 3'-конце того же сегмента, кодирующего I γ . Подобным образом, гены VL клонировали в вектор экспрессии рТТ5 в рамке генетического кода в виде слияния с геном, кодирующим легкую каппа цепь IgG человека. Мутации Leu234Ala и Leu235Ala вводили в константные участки тяжелой цепи для отмены связывания с Fc-гамма рецепторами (смотри WO 2012/130831). Схема полученных биспецифических, двухвалентных конструкторов показана на ФИГ. 1А.

а. Селекция FAP-клонов:

Таблица ниже показывает аминокислотные последовательности зрелых биспецифических, двухвалентных антител к CD137(урелумаб)/FAP, которые применяли для скрининга активности в отношении FAP.

Таблица 21: Биспецифические клоны в отношении FAP-Урелумаб

Биспецифический клон	VH-ЛИНКЕР-VL FAP	CD137 VH + CD137 (УРЕЛУМАБ) VL
FAP.65.F1	EIVLTQSPGSLSLSPGERATLSCRASQPIDSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA STRATDIPDRFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYYDWPVTFGGG TKVEIKTGGGSGGGSGGGSGGGSDVQLVESGGGLVHPGGSRLS ASTFTFANYIMSWVRQAPGKLEWVSGITGSSTNTYYTDSVKTRFTISR NSKNTLYLEMNSLRAEDTAVYYCAKHQLYPYAMDVWGQTTVTVSS (SEQ ID №:641)	SEQ ID №№.: 371, 372
FAP.63.C10	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGYLAWYQQKPGQAPRLIYD ASNRASGISDRFSGSGSGTEFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYYNWPPLTFG GGTKVEIKTGGGSGGGSGGGSGGGSDVQLVESGGGVVVRPAGESLTL CAASGFTFSSYDMFWVRQAPGEGLEWVSGIRGSGGSTYYADSVKTRFTI RDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKENNRHSFFFEYWGLGTLVTVSS (SEQ ID №:642)	SEQ ID №№.: 371, 372
FAP.63.C3	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGHYLAWYQQKPGQAPRLIYD ASNRAIDIPDRFSGSGSGTEFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYYNWPPLTFG GGTKVEIKTGGGSGGGSGGGSGGGSDVQLVESGGGVVVRPAGESLTL CAASGFTFSSYDMFWVRQAPGEGLEWVSGIRGRGGSTYYADSVKTRFTI SRDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKENNRHSFFFEYWGLGTLVTVSS (SEQ ID №:643)	SEQ ID №№.: 371, 372
FAP.63.D7	EIVLTQSPATLNLSPGDRATLTCRASQTVGSKLAWYQQTSGQAPRLIYD ASSRATGIPDRFSGSGSGTEFTLTISLLEPEDFAVYYCQQYYDWPPLTFGG GTKVEIKTGGGSGGGSGGGSGGGSDVQLVESGGGVVVRPAGESLRLS AASGFTFSSYAMSWVRQTPGEGLEWVSFISGGAYTHYTDSVKTRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEKEIWN AFFDYWGLGTLVTVSS (SEQ ID №:644)	SEQ ID №№.: 371, 372
FAP.63.H3	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGYLAWYQQKPGQAPRLIYD ASDRATAIPDRFSGSGSGTEFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYYNWPPLTFG GGTKVEIKTGGGSGGGSGGGSGGGSDVQLVESGGGVVVRPAGESLRLS CAASGFTFSSYDMFWVRQAPGEGLEWVSGIRVSGGSTYYADSVKTRFTI RDSSNNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKENDRHSFFFEYWGLGTLVTVSS (SEQ ID №:645)	SEQ ID №№.: 371, 372
FAP.84.A11	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQPINNYLAWYQQKPGQAPRLIFSA SNRATGIPDRFSGSGSGTEFTLTISLLEPEDFAVYYCQQYYDWPVTFGGG TKVEIKTGGGSGGGSGGGSGGGSDVQLVESGGGLVQPGGSRLS ASGFSMSNFAMTWVRQAPGEGLEWVSGIRGSGTYYADSVKTRFTVSRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCAKTWGTEYFDYWGLGTLVTVSS (SEQ ID №:646)	SEQ ID №№.: 371, 372
FAP.84.B2	EIVMTQSPATLSVSPGDRATLSCRASQTVGSKLAWYQQKPGQAPRLIYA ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQYYNWPVAFGG GTKVEIKTGGGSGGGSGGGSGGGSDVQLVESGGGVVVRPAGESLRLS	SEQ ID №№.: 371, 372

Биспецифический клон	VH-ЛИНКЕР-VL FAP	CD137 VH + CD137 (УРЕЛУМАБ) VL
	AASGFSFSSYAMNWVRQAPGKLEWVSAISGSGGGTFYADSVKTRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCAKDPFGYGFDSWGLGTLTVSS (SEQ ID №:647)	
FAP.84.B7	EIVLTQNPGLNLSPPERATLTCRASQSAGRNLAWYQQKPGQTPRLLIYD VNTRATGIPDRFSGSGSGTEFNLTISLQNEFAVYYCQYNNWPPLTFG GGTKVEIKFGGGSGGGSGGGSGGGSDVQLVESGGGVVVRPAGESLRLS CAASGFIFRNYAMTWVRQAPGEGLEWVSTIRSSGSGRTDTYYADSVKTR FTISRDNNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSGTFWDTFFDYWGLGTLV TVSS (SEQ ID №:648)	SEQ ID №№.: 371, 372
FAP.84. B8	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQTVATYLAWYQQKPGQAPRLLIYA AISRATGIPDRFSGSGSDFTLTITRLEPEDSAVYYCQYKDWPLTFGG GTKVEIKFGGGSGGGSGGGSGGGSDVQLVESGGSVVVRPAGESLRLSC AASGFPFSSYPMTWVRQAPGEGLEWVSSIRGSGDRIHYADSVKTRFTISK DSSNNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATGWNFFDYWGLGTLTVSS (SEQ ID №:649)	SEQ ID №№.: 371, 372
FAP.84.A9	EIVLTQSPGTLSPGERATLTCRASQTVATYLAWYQQKPGQAPRLLIYA AISRATGIPDRFIGSGSGDFTLTINRLEPEDFAVYYCQYKDWPLTFGG GTKVEIKFGGGSGGGSGGGSGGGSDVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSC AASGFPFSSYPMTWVRQAPGEGLEWVSSIRPIGDRIHYADSVKTRFTISR SSNNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATGWNFFDYWGLGTLTVSS (SEQ ID №:650)	SEQ ID №№.: 371, 372
FAP84.C11	EIVLTQSPGTLSPGERAILS CRASQTVGSRLAWYQQKPGQAPRLLIYAA SSRATGIPDRFSGSGSGTEFTLTISLQSEFAVYYCQYYDWPPLTFGGG TKVEIKFGGGSGGGSGGGSGGGSDVQLVESGGGVVVRPAGESLRLSCA ASGFTFSSYDMSWVRQAPGEGLEWVSAISGSGDRIHYADSVKTRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLRYYSVGFVFDYWGLGTLTVSS (SEQ ID №:651)	SEQ ID №№.: 371, 372

В указанной выше процедуре, для направленного клонирования генов VH и VL применяли набор для клонирования In-Fusion® HD Cloning Kit (компания Clonotech, США). Синтезировали ПЦР-праймеры для VL/VH с удлинением из 15 bp, комплементарных концам линейизованного вектора. ПЦР выполняли в соответствии со стандартным протоколом изготовителя, и ампликоны очищали или обрабатывали с использованием реагента для увеличения эффективности Cloning Enhancer, затем клонировали в соответствующий вектор. Затем *E. coli* трансформировали в соответствии с инструкциями изготовителя (компания Clonotech, США). Мини-препараты ДНК секвенировали.

Каждый вектор экспрессии содержит эукариотические промоторные элементы гена, кодирующего цепь, гена, кодирующего сигнальную последовательность, а также тяжелую или легкую цепь, кассету экспрессии для гена маркера для селекции прокариотических клеток, такого как ампициллин, и точку начала репликации. Указанные плазмиды ДНК размножали в устойчивых к ампициллину колониях *E. Coli*, и очищали.

б. Экспрессия и очистка биспецифических, четырехвалентных молекул, распознающих CD137 человека (4-1BB, TNFRSF9) и белок активации фибробластов (FAP) человека

Векторы экспрессии, которые получали в соответствии с описанным выше примером, трансфицировали в клетки CHO-E. Трансфицированные клетки CHO-E, выращиваемые в суспензии в безсывороточной питательной среде, культивировали во встряхиваемых колбах в условиях перемешивания со скоростью 140 об/мин, при температуре 37 °C и 5 % CO₂, и содержали в условиях экспоненциального роста. В день трансфекции, клетки химически трансфицировали 1 мг плазмиды легкой цепи и 0,5 мг плазмиды тяжелой цепи. Затем их высевали с концентрацией 1 - 2 x 10⁶ клеток/мл в 1 л экспрессионной среды Gibco® FreeStyle™ CHO (LifeTechnologies, Нью-Йорк, США). Затем клетки инкубировали в условиях орбитального встряхивания на протяжении 10 - 12 дней с однократным введением 150 мл доступного на рынке питательного раствора, чтобы обеспечить экспрессию белков. Титры антител в супернатантах клеточных культур определяли посредством применения прибора Octet® (компания Pall ForteBio, Калифорния, США) и биосенсоров на основе протеина A, в соответствии с инструкциями изготовителя.

Рекомбинантные антитела очищали от супернатанта культуры с помощью аффинной хроматографии на белке А посредством применения MabSelect™ (компания Amersham Biosciences) и оставляли в 60 мМ NaOAc буферного раствора (рН 5,0). Чистоту и степень неоднородности образцов оценивали посредством масс-спектрометрии и аналитического ультрацентрифугирования. Перед функциональным исследованием было подтверждено, что все образцы имеют содержание мономера $\geq 90\%$ и содержат $< 10\%$ примесей.

в. Функциональная активность биспецифических антител к CD137/FAP.

Анализ совместного культивирования Т-клеток и фибробластов применяли для того, чтобы продемонстрировать активацию Т-клеток, специфичную для FAP-опосредованного сшивания CD137.

Вкратце, родительские клетки FAP+ HT1080 и HT1080 высевали в культуральную среду (RPMI 1640/Glutamax, Gibco 61870-010; плюс 10 % FCS, Gibco 26140). После оставления на протяжении ночи при температуре 37 °С и 5 % CO₂, клетки инкубировали с CD137+ клетками Jurkat на протяжении 24 ч с 50 мкл различных разбавлений антител в желательных концентрациях. NFκB-активность репортерного гена оценивали посредством применения тест определения жизнеспособности люминесцентных клеток CellTiter-Glo® (Promega G7571) в соответствии с инструкциями, предоставленными изготовителем. Наконец, люминесценцию регистрировали с помощью многофункционального считывателя планшетов VICTOR™ X4 2030 от компании Perkin Elmer.

Используя систему люциферазного репортерного анализа, изобретатели подтвердили, что CD137/FA- биспецифические молекулы в соответствии с изобретением активируют клетки Jurkat только в присутствии FAP-положительных клеток, но не в присутствии FAP-отрицательных клеток (ФИГ. 12А-В). Указанное отличалось от урелумаба, который активирует клетки Jurkat в одинаковой степени в присутствии FAP-положительных и FAP-отрицательных клеток (ФИГ. 12Б). В указанной системе анализа, утомилумаб не проявлял никакой активности (ФИГ. 12В).

На основании активности в анализах NFκB-Jurkat, три клона FAP84.A11 (VH, VL SEQ ID №№.:629, 630, соответственно), FAP84.B8 (VH, VL SEQ ID №№.:635, 636, соответственно), и FAP 63.C3 (VH, VL SEQ ID №№.:623,

624, соответственно) были идентифицированы в качестве оптимизированных FAP-кандидатов. Из них, две FAP-молекулы были получены в виде молекул doppelmaб с клонами-кандидатами CD137 #B21 и CD137 #A49, что привело к получению четырех различных родительских биспецифических конструкторов.

- 5 Последовательности, соответствующие четырем родительским биспецифическим конструкторам, представлены в Таблице 24, строки 1-4. Предварительную оценку в отношении возможности разработки выполняли для четырех исходных белков (смотри Таблицу 22).

Таблица 22:

		B21+A11	A49+A11	B21+C3	A49 + C3
Клон CD137 / клон FAP		CD137#1/ FAP #1 Строка 1, Таблица 23	CD137 #7/ FAP #1 Строка 2, Таблица 23	CD137 #1 /FAP#2 Строка 3, Таблица 23	CD137 #7 /FAP #2 Строка 4, Таблица 23
Свойство	Анализ				
Возможность изготовления	Титр::Выход (%)	66	69	50	69
Качество/Чистота	Аналитическая эксклюзивная хроматография (основной %)	99	100	99	100
	Аналитическая хроматография гидрофобного взаимодействия (основной %)	98	100	96	100
	Гидродинамический радиус (R _n нм) и полидисперсность (% PD)	6, 16	6, 18	6, 14	6, 11
Конформационная стабильность	Анализ термической стабильности (TSA) (T, °C)	66; 85	67; 85	68; 85	67; 85
Колоидальные взаимодействия	Обратимая самоассоциация	DSB: Fav Phys: удовл.	DSB: удовл. Phys: удовл.	DSB: Excpt Phys: Excpt	DSB: Fav Phys: Excpt
	Температура начала агрегации (Tagg; °C и размер)	56; mod	58; небольшие	61; mod	60; небольшие

10

Пример 6: Подробности в отношении полученных биспецифических молекул, распознающих CD137 человека (4-1BB, TNFRSF9) и белок активации фибробластов (FAP) человека

В следующих далее примерах был получен ряд различных биспецифических молекул антител к CD137 (4-1BB, TNFRSF9) / белку активации фибробластов (FAP) в соответствии с изобретением. Во избежание путаницы, ниже приведены характеристики и последовательности этих молекул.

5 а. *Оптимизация последовательности FAP*

Для оптимизаций последовательностей родительских вариантов FAP84.A11 (“FAP #1”) и FAP63.C3 (“FAP #4”), в сайтах потенциальной предрасположенности осуществляли точечные мутации в каркасных участках человека. Ниже описаны последовательности FAP-кандидатов.

10 **Таблица 23: Значения связывания с белками FAP человека и мыши.**

Молекула	Описание		KD на FAP человека (нМ)	KD на FAP мыши	Оценка EpiVax
FAP-A11 родительский	FAP-A11SCFV(WT)		1040	< 20 пМ	-38,45
FAP-A11 VK1-VH13	FAP-A11VK1VH13 (ST, QQQ)		2880	< 20 пМ	-26,65
FAP-A11 VK3-VH1	FAP-A11VK3VH1 (RS, NNN)		199	< 20 пМ	-37,95
FAP-A11 VK3-VH13 (FAP #2)	FAP-A11VK3VH13 (RS, QQQ)		538	< 20 пМ	-25,46
FAP-A11 VK7-VH1 (FAP #3)	FAP-A11VK7VH1 (SS, NNN)		1500	< 20 пМ	-40,05
FAP-C3 родительский	FAP-C3SCFVWT		36	33 нМ	-52,72
FAP-C3 VK1-VH14 (FAP #5)	FAP-C3VK1VH14 (ND, SY, ES, ES, ER)		24	4,6 нМ	-55,22
FAP-C3 VK1-VH15	FAP-C3VK1VH15 (ND, SY, ES, DS, ER)		25	5,3 нМ	-59,95

На основании активности в функциональных исследованиях, было выявлено 3 анти-FAP кандидата: FAP-A11-VK3-VH13 или “FAP #2”, FAP-A11-VK7-VH1 или “FAP #3” и FAP-C3-VK1-VH4 или “FAP #5”, и отформатировано с 8 анти-CD137 связывающими молекулами с оптимизированной последовательностью (варианты B21 V.16 (“CD137 #2), V.22 (“CD137 #3”), V.25 (“CD137 #4”), V.29 (“CD137 #5”), V.37 (“CD137 #6”), и варианты A49 V.43 (“CD137 #8”), V.47 (“CD137 #9”), и V.48 (“CD137 #10”)), как описано в

Таблице 24 ниже), в результате чего получают 24 CD137-FAP-биспецифических молекул.

Таблица 24: Подробности биспецифических в отношении к CD137 (4-1BB, TNFRSF9) / белку активации фибробластов (FAP) молекул в соответствии с изобретением

	Название	Связывающий домен в отношении CD137 (4-1BB, TNFRSF9) (VH/VL)	Связывающий домен в отношении белка активации фибробластов (FAP) (VH/VL)	(CD137 VH-Fc)-L1-(VL-L2-VH FAP-ScFV)	LC/FAB CD137	FAP scFV ориентация и последовательность VL-L2-VH
1	CD137 #1 (B21 РОДИТЕЛЬСКИХ) + FAP #1 (A.11 РОДИТЕЛЬСКИХ)	SEQ ID №№:10, 15 (SEQ ID №:455, 456 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№:106,110	SEQ ID №:151	SEQ ID №:152	VL-L2-VH SEQ ID №:114
2	CD137 #7 (A49 РОДИТЕЛЬСКИХ) + FAP #1 (A.11 РОДИТЕЛЬСКИХ)	SEQ ID №№:70, 75 (SEQ ID №:421, 422 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№:106, 110	SEQ ID №:153	SEQ ID №:154	VL-L2-VH SEQ ID №:114
3	CD137 #1 (B21 РОДИТЕЛЬСКИХ) + FAP #4 (C3 РОДИТЕЛЬСКИХ)	SEQ ID №№:10, 15 (SEQ ID №:455, 456 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№:133, 137	SEQ ID №:155	SEQ ID №:156	VL-L2-VH SEQ ID №:141
4	CD137 #7 (A49) + FAP #4 (C3 РОДИТЕЛЬСКИХ)	SEQ ID №№:70, 75 (SEQ ID №:421, 422 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№:133,137	SEQ ID №:157	SEQ ID №:158	VL-L2-VH SEQ ID №:141
5	CD137 #2 (B21.V16) + FAP #5 (C3 VK1/VH4)	SEQ ID №№:20, 25 (SEQ ID №:555, 556 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 142, 146	SEQ ID №:159	SEQ ID №:160	VL-L2-VH SEQ ID №: 163
6	CD137 #2 (B21.V16) + FAP #2 (A11 VK3/VH3)	SEQ ID №№: 20, 25 (SEQ ID №:555, 556 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 115, 119	SEQ ID №:164	SEQ ID №:165	VL-L2-VH SEQ ID №: 168
7	CD137 #2 (B21.V16) + FAP #3 (A11 VK7/VH1)	SEQ ID №№:20,25 (SEQ ID №:555, 556 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 124, 128	SEQ ID №:169	SEQ ID №:171	VL-L2-VH SEQ ID №: 173
8	CD137 #3 (B21.V22) + FAP #5 (C3 VK1/VH4)	SEQ ID №№:30, 35 (SEQ ID №:565, 566 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 142, 146	SEQ ID №: 174	SEQ ID №:175	VL-L2-VH SEQ ID №: 178
9	CD137 #3 (B21.V22) + FAP #2 (A11 VK3/VH3)	SEQ ID №№:30, 35 (SEQ ID №: 565, 566 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 115, 119	SEQ ID №:179	SEQ ID №:180	VL-L2-VH SEQ ID №: 183
10	CD137 #3 (B21.V22) + FAP #3(A11 VK7/VH1)	SEQ ID №№: 30, 35 (SEQ ID №: 565, 566 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 124, 128	SEQ ID №: 184	SEQ ID №:185	VL-L2-VH SEQ ID №: 188
11	CD137 #4 (B21.V25)+ FAP #5 (C3 VK1/VH4)	SEQ ID №№: 40, 45 (SEQ ID №:571, 572 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 142, 146	SEQ ID №:189	SEQ ID №:190	VL-L2-VH SEQ ID №: 193
12	CD137 #4 (B21.V25) + FAP #2 (A11 VK3/VH3)	SEQ ID №№:40, 45 (SEQ ID №: 571, 572 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 115, 119	SEQ ID №: 194	SEQ ID №: 195	VL-L2-VH SEQ ID №198
13	CD137 #4 (B21.V25) + FAP #3 (A11 VK7/VH1)	SEQ ID №№: 40, 45 (SEQ ID №: 571, 572	SEQ ID №№: 124, 128	SEQ ID №: 199	SEQ ID №: 200	VL-L2-VH SEQ ID №203

	Название	Связывающий домен в отношении CD137 (4-1ВВ, TNFRSF9) (VH/VL)	Связывающий домен в отношении белка активации фибробластов (FAP) (VH/VL)	(CD137 VH-Fc)-L1-(VL-L2-VH FAP-ScFV)	LC/FAB CD137	FAP scFV ориентация и последовательность VL-L2-VH
		ТАБЛИЦА 16)				
14	CD137 # 5 (B21.V29) + FAP #5 (C3 VK1/VH4)	SEQ ID №№:50, 55 (SEQ ID №:579, 580 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 142, 146	SEQ ID №: 204	SEQ ID №: 205	VL-L2-VH SEQ ID №208
15	CD137 #5 (B21.V29) + FAP #2 (A11 VK3/VH3)	SEQ ID №№:50, 55 (SEQ ID №: 579, 580 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 115, 119	SEQ ID №: 209	SEQ ID №: 210	VL-L2-VH SEQ ID №213
16	CD137 #5 (B21.V29) + FAP #3 (A11 VK7/VH1)	SEQ ID №№:50, 55 (SEQ ID №: 579, 580 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 124, 128	SEQ ID №: 214	SEQ ID №: 215	VL-L2-VH SEQ ID №218
17	CD137 #6 (B21.V37)+ FAP #5 (C3 VK1/VH4)	SEQ ID №№:60, 65 (SEQ ID №:595, 596 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 142, 146	SEQ ID №: 219	SEQ ID №: 220	VL-L2-VH SEQ ID №223
18	CD137 # 6 (B21.V37) + FAP #2 (A11 VK3/VH3)	SEQ ID №№: 60, 65 (SEQ ID №: 595, 596 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 115, 119	SEQ ID №: 224	SEQ ID №: 225	VL-L2--VH SEQ ID №228
19	CD137 #6 (B21.V37) + FAP #3 (A11 VK7/VH1)	SEQ ID №№:60, 65 (SEQ ID №: 595, 596 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 124, 128	SEQ ID №: 229	SEQ ID №: 230	VL-L2-VH SEQ ID №233
20	CD137 #8 (A49.V43) + FAP #5 (C3 VK1/VH4)	SEQ ID №№: 80, 85 (SEQ ID №:607, 608 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 142, 146	SEQ ID №: 234	SEQ ID №: 230	VL-L2-VH SEQ ID №228
21	CD137 # 8 (A49.V43) + FAP #2 (A11 VK3/VH3)	SEQ ID №№:80, 85 (SEQ ID №:607, 608 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 115, 119	SEQ ID №: 239	SEQ ID №: 240	VL-L2-VH SEQ ID №243
22	CD137 #8 (A49.V43) + FAP #3 (A11 VK7/VH1)	SEQ ID №№: 80, 85 (SEQ ID №:607, 608 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 124, 128	SEQ ID №: 244	SEQ ID №: 245	VL-L2-VH SEQ ID №248
23	CD137 #9 (A49.V47) + FAP #5 (C3 VK1/VH4)	SEQ ID №№: 90, 95 (SEQ ID №:615, 616 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 142, 146	SEQ ID №: 249	SEQ ID №: 250	VL-L2-VH SEQ ID №253
24	CD137 #9 (A49.V47) + FAP #2 (A11 VK3/VH3)	SEQ ID №№: 90, 95 (SEQ ID №:615, 616 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 115, 119	SEQ ID №: 254	SEQ ID №:255	VL-L2-VH SEQ ID №258
25	CD137 #9 (A49.V47) + FAP #3 (A11 VK7/VH1)	SEQ ID №№:90, 95 (SEQ ID №:615, 616 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 124, 128	SEQ ID №: 259	SEQ ID №: 260	VL-L2-VH SEQ ID №263
26	CD137 #10 (A49.V48) + FAP #5 (C3 VK1/VH4)	SEQ ID №:100, 105 (SEQ ID №:617, 618 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 142, 146	SEQ ID №: 264	SEQ ID №: 265	VL-L2-VH SEQ ID №268
27	CD137 #10 (A49.V48) + FAP #2 (A11 VK3/VH3)	SEQ ID №:100, 105 (SEQ ID №:617, 618 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 115, 119	SEQ ID №: 269	SEQ ID №: 270	VL-L2-VH SEQ ID №273

	Название	Связывающий домен в отношении CD137 (4-1BB, TNFRSF9) (VH/VL)	Связывающий домен в отношении белка активации фибробластов (FAP) (VH/VL)	(CD137 VH-Fc)-L1-(VL-L2-VH FAP-ScFV)	LC/FAB CD137	FAP scFV ориентация и последовательность VL-L2-VH
28	CD137 #10 (A49.V48) + FAP #3 (A11 VK7/VH1)	SEQ ID №:100, 105 SEQ ID №:617, 618 ТАБЛИЦА 16)	SEQ ID №№: 124, 128	SEQ ID №: 274	SEQ ID №: 275	VL-L2-VH SEQ ID №278

Пример 7: исследования *in vitro* - биологическая активность нацеливающихся на CD137-FAP связывающих молекул; FAP-зависимое сшивание CD137 в клетках Jurkat

Анализ совместного культивирования Т-клеток и фибробластов применяли для того, чтобы продемонстрировать активацию Т-клеток, специфичную для FAP-опосредованного сшивания CD137. Для этого, полученные за счет внутренних источников родительские клетки FAP+ HT1080 или FAP- HT1080 добавляли к культурам клеток Jurkat-CD137 с репортерной системой NFκB-люцифераза (Promega #CS196004). Активацию Jurkat-CD137 измеряют с помощью NFκB-управляемого репортера люциферазы. Клетки культивировали в присутствии молекул CD137/FAP, для выявления FAP-селективных агонистов CD137. Значения EC90/IC90 показаны в Таблице 25 и Таблице 26.

Таблица 25. FAP-зависимая активность клонов B21 и A49 CD137, как установлено посредством сшивания на клетках, экспрессирующих HT1080-FAP

CD137/FAP-кандидат	Общая AUC [x 10 ⁶]	IC ₉₀	EC ₉₀
B21.V16 (CD137 #2)/ FAP#5	3,6	74,3	0,87
B21.V22 (CD137 #3)/FAP #3	1,9	143,8	2,41
B21.V37 (CD137#6)/FAP #3	3,5	257,8	2,34
B21.V16 (CD137 #2)/FAP #2	3,3	126,8	3,14
B21.V25 (CD137 #4)/FAP #3	2,5	492,2	2,55
B21.V29 (CD135 #5)/ FAP #3	2,9	51,85	0,52
B21.V25 (CD137 #4)/ FAP #2	3,3	46,85	0,65
B21.V29 (CD137 #5)/ FAP #2	2,9	62,80	0,78
B21.V22 (CD137 #3)/ FAP #2	2,4	69,62	1,42
B21.V25 (CD137 #4)/ FAP#5	3,0	77,77	1,38
B21.V22 (CD137 #3)/ FAP#5	2,3	87,81	2,18
B21.V37 (CD137 #6)/ FAP#2	4,0	53,61	0,55
B21.V29 (CD137#5)/ FAP#5	3,2	35,70	0,80
B21.V37 (CD137#6)/ FAP#5	3,6	13,79	0,47
A49.V48 (CD137#7)/ FAP #3	12,6	86,7	1,91
A49.V47 (CD137 #9)/FAP #3	9,5	1,07	1,65
A49.V43 (CD137#8)/FAP #3	31,5	60,75	0,96
A49.V48 (CD137 #7)/FAP #5	11,3	700,5	6,24
A49.V48 (CD137 #7)/FAP #2	11,3	136,8	2,57
A49.V47 (CD137 #9)/ FAP #5	7,8	742,3	4,23
A49.V47 (CD135#9)/ FAP #2	7,6	93,84	3,01
A49.V43 (CD137#8)/ FAP #2	25,0	467,2	5,04
A49.V43 (CD137#8)/ FAP #5	31,8	54,01	0,98

Для репрезентативных клонов вычисляли значения EC_{50} (*EC: effective concentration - эффективная концентрация*), IC_{50} (*IC: inhibition concentration - концентрация ингибирования*), EC_{90} , и IC_{90} а также соотношения IC_{50}/EC_{50} , и IC_{90}/EC_{90} , и сравнивали их в Таблице 26. Все клоны продемонстрировали относительно сопоставимое поведение. В частности, молекулы продемонстрировали колоколообразный ответ, что было уникальным для этого анализа. Такой ответ был устойчивым среди молекул, для которых вычисляли соотношения IC_{50}/EC_{50} и IC_{90}/EC_{90} , которые были статистически сходными

Таблица 26: CD137/FAP-клоны имеют сопоставимые значения EC_{50}/IC_{50}

CD137/FAP КАНДИДАТ	Средняя EC_{50} [нМ]	Средняя IC_{50} [нМ]	Соотношени е IC_{50}/ EC_{50}	Средняя EC_{90} [нМ]	Средняя IC_{90} [нМ]	Соотношени е IC_{90}/ EC_{90}
B21.V16 (#2)/ FAP#5	0,233	538,333	2304,462	2,235	110,370	49,383
B21.V16 (#2)/ FAP#2	0,165	846,567	5131,433	1,470	87,810	59,741
B21.V16 (#2)/ FAP#3	0,082	361,200	4379,509	0,613	48,440	79,066
B21.V22 (#4)/ FAP#5	0,175	558,750	3187,393	1,249	98,635	78,971
B21.V22 (#4)/ FAP#2	0,273	888,500	3257,761	0,738	83,970	113,819
B21.V22 (#4)/ FAP#3	0,248	746,700	3014,534	1,514	79,215	52,335
B21.V25 (#5)/ FAP#5	0,115	319,350	2787,014	0,644	69,150	107,301
B21.V25 (#5)/ FAP#2	0,160	443,900	2779,587	0,883	86,650	98,092
B21.V25 (#5)/ FAP#3	0,090	347,250	3843,387	0,671	52,775	78,645
B21.V25 (#6)/ FAP#5	0,054	191,400	3518,059	0,315	13,790	43,847
B21.V25 (#6)/ FAP#2	0,153	314,050	2058,872	1,069	104,805	98,059
B21.V25 (#6)/ FAP#3	0,141	755,500	5372,253	1,425	164,530	115,447
A49.V43 (#8)/ FAP#5	0,166	624,500	3750,826	1,425	84,623	59,385
A49.V43 (#8)/ FAP#2	0,327	957,900	2928,164	2,591	210,477	81,244
A49.V43 (#8)/ FAP#3	0,170	361,500	2125,845	1,013	58,285	57,565
В среднем	0,17	550,36	3362,87	1,19	90,24	78,19
SEM (\pm)	0,02	62,36	257,93	0,29	0,16	0,16

Используя систему люциферазного репортерного анализа, изобретатели подтвердили, что CD137/FA-биспецифические молекулы в соответствии с изобретением активируют клетки Jurkat-CD137 только в присутствии FAP-положительных клеток, но не в присутствии FAP-отрицательных клеток. Данные показывает, что набор молекул CD137-вариантов демонстрирует различные уровни активности, а также то, что все CD137-взаимодействие и, таким образом, активность ограничивалась только присутствием клеток, экспрессирующих FAP (ФИГ. 13А-Г).

10 **Пример 8: Влияние биспецифических в отношении CD137 (4-1BB, TNFRSF9) / белка активации фибробластов (FAP) молекул на активацию Т-клеток**

Биспецифические в отношении CD137/FAP молекулы в соответствии с изобретением имеют высокую степень специфичности и являются эффективными молекулами, которые активируют Т-клетки с помощью CD137-рецептора и в зависимости от FAP. Для оценки способности CD137/FAP-специфичных молекул в соответствии с изобретением задействовать и активировать первичные Т-клетки человека, применяли анализ активации РВМС человека, измеряя секрецию IFN- γ . Этот анализ выполняли, применяя CD137/FAP-специфичные молекулы, отобранные из скринингового анализа Jurkat-NF κ B, как описано в Примере 7 выше.

Для того чтобы продемонстрировать активацию и симитировать микроокружение опухоли, планшеты покрывали анти-CD3 (клон ОКТ3) в концентрации 0,5 мкг/мл. Затем, к обработанным митомицином С НТ1080-FAP-положительным клеткам добавляли клетки РВМС человека. Активацию Т-клеток устанавливали через 24 часа посредством количественного определения уровней hIFN- γ посредством MSD-анализа (Meso Scale Discovery). Значения EC₅₀ для каждого клона показаны на ФИГ. 14А-14З. Стимуляция только одним CD3 приводит к секреции IFN- γ , однако, клетки РВМС, совместно культивированные с FAP-положительными клетками НТ1080 в присутствии CD137/FAP-специфичных молекул, повышает уровень секреции IFN- γ на 50 %, по сравнению с уровнем в случае одного только CD3. Это увеличение IFN- γ может быть связано с совместно стимулированной активностью, обеспечиваемой CD137/FAP-специфичными молекулами.

Кроме того, первичные клетки РВМС человека от восьми здоровых доноров также показали FAP-зависимую выработку IFN- γ продуцирование при культивировании с повышающимися уровнями CD137/FAP-биспецифических молекул в соответствии с изобретением в присутствии клеток фибросаркомы HT1080-FAP+ve.

ФИГ. 15А и 15Б показывают секрецию hIFN- γ отдельными донорскими клетками РВМС с повышающимися концентрациями примерной молекулы B21 CD137/FAP (ФИГ. 15Б). Этот образец продемонстрировал идеальные свойства для этой серии молекул, что было эффективной реакцией IFN- γ , устойчивой для целого ряда донорских клеток РВМС в присутствии клеток, экспрессирующих FAP. Кроме того, эта реакция утрачивалась при отсутствии клеток, экспрессирующих FAP.

Пример 9: Ферментативная активность FAP *in vitro* не ингибируется связыванием CD137/FAP

FAP представляет собой локализуемый на поверхности гликопротеин с эндопептидазной активностью. Хотя экспрессия FAP является низкой в большинстве тканей, она повышается в активированных фибробластах в местах активного ремоделирования ткани и при раке. Сообщается, что FAP расщепляет некоторые субстраты, однако физиологическое значение этого действия изучено недостаточно. С этой целью, для определения, препятствуют ли нацеленные на FAP антитела в соответствии с изобретением ферментативной активности FAP, проводили ферментативной анализ FAP.

Для того чтобы продемонстрировать это, применяли анализ флуорогенной активности FAP (BPS Bioscience #80210). Этот анализ выполняли посредством применения мезилата талабостата в качестве положительного контроля в отношении ингибирования FAP, где ингибирование зависит от концентрации (ФИГ. 16Б). ФИГ. 16А демонстрирует, что примерные молекулы в соответствии с изобретением, CD137-B21/FAP-C3 и мышиный B21 CD137/FAP-A11, не препятствуют ферментативной активности белка FAP и, таким образом, по-видимому, не влияют на физиологическую активность FAP.

Пример 10: Эффективность биспецифических молекул *in vivo* на моделях ксенотрансплантата CRC

Изобретатели также исследовали *in vivo* эффективность связывающих молекул, распознающих CD137 (4-1BB, TNFRSF9) и белок активации фибробластов (FAP). Для этой цели, была разработана модель опухоли человека.

Исследования эффективности выполняли на подкожной сингенной модели колоректального рака MC38 у мышей CD137 KI HuGEMM™. В этой модели, опухолевые клетки, а также клетки стромы опухоли имеют мышинное происхождение, Т-клетки также имеют мышинное происхождение, но экспрессируют на поверхности клеток антиген CD137 человека. Вкратце, опухолевые клетки MC38 мыши инокулировали подкожно в правую заднюю боковую область с концентрацией примерно 1×10^6 опухолевых клеток/мышь, для развития опухоли. Лечение начинали через 7 дней, когда опухоли имели средний объем, составляющий $63,6 \text{ мм}^3$, мышиную кросс-реактивную CD137/FAP, оптимизированную суррогатную мышиную молекулу (VH и VL, SEQ ID №№:169, 170, соответственно) или буферный растворитель (50 mM NaOAc, 100 mM NaCl, pH 5,0) вводили по схеме применения q7d (*раз в 7 дней*) посредством внутрибрюшинной инъекции (*i.p.*), при этом мышиное антитело к PD-1 (мышинное антитело к PD-1 происходит из клона RMP1-14, как описано у Chen, S. Lee, L-F. Fisher, T.S, и др. февр. 2015 г, DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0118, и включено в эту заявку посредством ссылки) вводили *i.p.* дважды в неделю.

Рост опухоли контролировали посредством измерений с помощью внешнего штангенциркуля, и объемы опухоли рассчитывали, применяя стандартную формулу полуэллипсоида. Животных, достигших гуманной конечной точки, подвергали эвтаназии как можно раньше во время исследований по этическим соображениям. Опухоли конечной точки собирали для иммуногистохимического исследования – изобретатели выявили повышенную инфильтрацию CD8⁺ Т-клетки в опухоль, по сравнению с одним только растворителем.

Схема, показанная на ФИГ. 17, представляет схему применения молекул на подкожной сингенной модели колоректального рака MC38 у мышей CD137 KI HuGEMM™.

В первом исследовании *in vivo*, мышей лечили либо оптимизированными молекулами CD137-B21/FAP-C3 человека, либо CD137-B21/FAP-A11 мыши, которые вводили *i.p.* в дозе, составляющей 10 мг/кг, по схеме применения q7d. Обе молекулы показали слабую противоопухолевую активность, где показатель TGI (*tumor growth inhibition - подавление роста опухоли*) составлял 43 % и 46 % на 22-й день, соответственно (ФИГ. 18Б).

На ФИГ. 18А-Г показана *in vivo* эффективность монотерапии CD137-B21/FAP-C3 человека и CD137-B21/FAP-A11 мыши на подкожной сингенной модели колоректального рака MC38 у мышей CD137 KI NuGEMM. На ФИГ. 18А показана кривая среднего роста опухоли после лечения CD137-B21/FAP-C3 человека, и на ФИГ. 18Б показана кривая отдельного роста опухоли после лечения CD137-B21/FAP-C3 человека. Кроме того, на ФИГ. 18В показана кривая среднего роста опухоли после лечения CD137-B21/FAP-A11 мыши, и на ФИГ. 18Г показана кривая отдельного роста опухоли после лечения CD137-B21/FAP-A11 мыши.

Данные, представленные на ФИГ. 18А-Г, демонстрируют, что связывающие молекулы в соответствии с изобретением способны вызывать уменьшение объема опухоли при сравнении с контрольной группой, и эффект зависит от дозы.

Данные, представленные на ФИГ. 19А и 19Б, демонстрирует, что связывающие молекулы CD137-B21/FAP-C3 человека и CD137-B21/FAP-A11 мыши в соответствии с изобретением способны вызывать увеличение CD3⁺ или CD8⁺ Т-клеточных инфильтратов в микроокружении опухоли при сравнении с контрольной группой.

Пример 11: Синергетические действия в результате применения антитела к PD-1 и связывающих CD137/FAP молекул.

Изобретатели исследовали потенциал комбинации связывающих CD137/FAP молекул, вводимых в дозе 10 мг/кг по схеме применения q7d, мышинным антителом к PD-1 (мышинное антитело к PD-1 происходит из клона RMP1-14, как описано у Chen, S. Lee, L-F. Fisher, T.S, и др., февр. 2015 г, DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0118, и включено в эту заявку посредством ссылки) в дозе 10 мг/кг по схеме применения q3d/q4d.

В этом исследовании, лечение CD137-B21/FAP-A11 мыши в виде монотерапии приводило к подобной противоопухолевой активности, где

показатель TGI составлял 44 %. Однако, в этом примере, CD137-B21/FAP-A11 человека не проявляет противоопухолевой активности в виде монотерапии, что можно объяснить типичной вариативностью биологических моделей в сочетании с примерно в 130 раз более слабой аффинностью к FAP человека по сравнению с CD137-B21/FAP-A11 мыши.

Данные, представленные на ФИГ. 20Б-Д, демонстрируют, что связывающие молекулы в соответствии с изобретением способны вызывать уменьшение объема опухоли в комбинации с МАb-антагонистом к PD-1, по сравнению с контрольной группой, и при этом эффект зависит от дозы.

Комбинированная терапия антителом к PD-1 мыши и CD137-B21/FAP-A11 человека (ФИГ. 20Б и 20Г) или мышинным CD137-B21/FAP-A11 (ФИГ. 20В и 20Д) приводила к сильному и статистически значимому ($p < 0,0001$) повышению противоопухолевой активности, где показатель TGI составлял 92 % и 94 % на 24-й день, соответственно, что свидетельствует о синергетическом действии комбинации CD137-B21/FAP-A11 человека и антитела к PD-1.

Комбинированная терапия антителом к PD-1 мыши и CD137-B21/FAP-A11 человека или мышинным CD137-B21/FAP-A11 также приводила к значительному количеству регрессий опухолей (что определяется как объем опухоли менее 100 мм^3), с 50 % и 37,5 %, соответственно, что свидетельствует о синергетическом действии комбинации связывающих CD137/FAP молекул и антитела к PD-1 (Таблица 27). При этом эффект зависит от дозы, с потерей регрессии опухоли при 1 мг/кг CD137-B21/FAP-A11 мыши (Таблица 27).

Таблица 27: Регрессия опухоли и подавление роста опухоли

Лечение	Регрессии ¹	TGI
Растворитель	0/8	0 %
антитело к PD-1 мыши 10 мг/кг	0/8	58 %
huCD137-B21/FAP-A11 10 мг/кг	0/8	-6 %
muCD137-B21/FAP-A11 10 мг/кг	0/8	43 %
PD-1 + huCD137-B21/FAP-A11 10 мг/кг	4/8	88 %
PD-1 + muCD137-B21/FAP-A11 10 мг/кг	3/8	91 %
PD-1 + muCD137-B21/FAP-A11 3 мг/кг	3/8	77 %
PD-1 + muCD137-B21/FAP-A11 1 мг/кг	0/8	78 %

¹ определяют как объем опухоли менее 100 мм^3

Данные, представленные в Таблице 27, демонстрируют, что связывающие молекулы в соответствии с изобретением способны вызывать регрессии опухолей при комбинировании с PD-1 агонистом, по сравнению с контрольными группами, и при этом эффект зависит от дозы.

5 Комбинированная терапия антителом к PD-1 мыши и CD137-B21/FAP-A11 человека приводила к сильному и статистически значимому уменьшению площади жизнеспособной опухоли и к увеличению опухолевых инфильтратов как CD4+, так и CD8+ Т-клеток, что свидетельствует о синергетическом
10 действии комбинации CD137-B21/FAP-A11 человека и антитела к PD-1 (ФИГ. 21А-Ж). Указанное увеличение инфильтрации CD8+ (ФИГ. 21В) положительно коррелировало с уменьшением площади жизнеспособной опухоли (ФИГ. 21Ж).

Данные, представленные на Фигуре 21А-Ж, демонстрируют, что связывающие молекулы в соответствии с изобретением способны вызывать
15 инфильтрацию как CD4+, так и CD8+ Т-клеток при комбинировании с агонистом PD-1, по сравнению с контрольными группами. Данные также демонстрируют, что увеличение инфильтрации CD8+ Т-клеток положительно коррелирует с потерей площади жизнеспособной опухоли.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическая и четырехвалентная связывающая молекула, имеющая два сайта связывания антигена, которые специфически связываются с CD137 (рецептор лиганда 4-1BB, 4-1BB), и два сайта связывания антигена, которые специфически связываются с белком активации фибробластов (FAP), причем сайт связывания антигена, который специфически связывается с CD137 (рецептор лиганда 4-1BB), является частью молекулы иммуноглобулина, а сайты связывания антигена, которые специфически связываются с белком активации фибробластов (FAP), содержат два scFv.

2. Связывающая молекула по пункту 1, причем два или большее количество scFv имеют ориентацию VL-VH от N-конца к С-концу.

3. Связывающая молекула по пункту 1, причем каждый из двух scFv слит с С-концом тяжелой цепи молекулы Ig.

4. Связывающая молекула по пункту 1, причем молекула Ig представляет собой IgG.

5. Связывающая молекула по пункту 1, причем два scFv слиты с молекулой Ig посредством пептидного линкера, имеющего длину в диапазоне от 4 до 20 аминокислоты.

6. Связывающая молекула по одному из предыдущих пунктов, причем сайт связывания антигена, который специфически связывается с CD137 (4-1BB), является частью молекулы иммуноглобулина, выбранной из группы, содержащей переменные участки тяжелой цепи и легкой цепи, которые включают в себя:

I) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:290 (CDR1), SEQ ID №:8 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:12 (CDR1), SEQ ID №:13 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); или II) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1),

SEQ ID №:18 (CDR2) и SEQ ID №: 9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:22 (CDR1), SEQ ID №:23 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); или III) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:28 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:32 (CDR1), SEQ ID №:33 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); или IV) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:38 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:42 (CDR1), SEQ ID №:43 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); или V) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:48 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:52 (CDR1), SEQ ID №:53 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); или VI) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:295 (CDR1), SEQ ID №:58 (CDR2) и SEQ ID №:9 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:62 (CDR1), SEQ ID №:63 (CDR2) и SEQ ID №:14 (CDR3); или

VII) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:68 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:72 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); или VIII) CDR тяжелой цепи, содержащие SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:78 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:72 (CDR1), SEQ ID №:73 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); или IX) CDR тяжелой цепи, содержащие SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:88 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3); или X) CDR тяжелой цепи, содержащие SEQ ID №:308 (CDR1), SEQ ID №:98 (CDR2) и SEQ ID №:69 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:92 (CDR1), SEQ ID №:93 (CDR2) и SEQ ID №:74 (CDR3).

7. Связывающая молекула по одному из предыдущих пунктов, причем сайт связывания антигена, который специфически связывается с CD137 (4-1BB), является частью молекулы иммуноглобулина (Ig), выбранной из группы, которая включает в себя:

- 5 I) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:10, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:15; или
- 10 II) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:20, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:25; или
- III) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:30, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:35; или
- 15 IV) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:40, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:45; или
- V) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:50, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:55; или
- 20 VI) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:60, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:65; или VII) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:70, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность
- 25 SEQ ID №:75; или
- VIII) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:80, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:85; или
- IX) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:90, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:95; или
- 30 X) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:100, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:105.

8. Связывающая молекула по одному из предыдущих пунктов, причем сайт связывания антигена, который специфически связывается с белком активации фибробластов (FAP), выбирают из группы scFv, которые включают в себя:

5 I) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:108 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:111 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

10 II) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:117 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:120 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

15 III) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:319 (CDR1), SEQ ID №:126 (CDR2) и SEQ ID №:109 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:129 (CDR1), SEQ ID №:112 (CDR2) и SEQ ID №:113 (CDR3); или

20 IV) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:328 (CDR1), SEQ ID №:135 (CDR2) и SEQ ID №:136 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3); или

25 V) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:333 (CDR1), SEQ ID №:144 (CDR2) и SEQ ID №:145 (CDR3), и CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID №:138 (CDR1), SEQ ID №:139 (CDR2) и SEQ ID №:140 (CDR3).

9. Связывающая молекула по одному из предыдущих пунктов, причем сайт связывания антигена, который специфически связывается с белком активации фибробластов (FAP), выбирают из группы, которая включает в себя:

30 I) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:106, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:110; или

II) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:115, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:119; или

III) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:124, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:128; или

5 IV) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:133, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:137; или

V) вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:142, и вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:146.

10

10. Иммуноглобулиноподобная связывающая молекула, содержащая

(I) тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем C-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:159, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:160; или

15 (II) тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем C-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:164, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:165; или

(III) тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем C-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:169, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:170; или

20 (IV) тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем C-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:174, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:175; или

25 (V) тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем C-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:179, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:180; или

(VI) тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем C-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:184, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:185; или

30 (VII) тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем C-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:189, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:190; или

(XIX) тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем C-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:249; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:250; или

5 (XX) тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем C-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:254; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:255; или

(XXI) тяжелую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv на своем C-конце, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:259; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №:260.

10 11. Связывающая CD137/FAP молекула, причем связывающая CD137 часть включает в себя вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, причем:

(I) вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 15 91 %, по меньшей мере на 92 %, по меньшей мере на 93 %, по меньшей мере на 94 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 96 %, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98 %, или по меньшей мере на 99 % гомологична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №№: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, и 100; или

20 (II) вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 91 %, по меньшей мере на 92 %, по меньшей мере на 93 %, по меньшей мере на 94 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 96 %, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98 %, или по меньшей мере на 99 % гомологична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из 25 SEQ ID №№: 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95 и 105; или

(III) полученная молекула связывается с CD137 человека со значением K_D , составляющим $1 \times 10^{-7} M$ или менее; или

30 (IV) полученная молекула по сути не опосредует кластеризацию CD137 и активацию Т-клеток в отсутствие связывания FAP; или

(V) полученная молекула связывает эпитоп на CD137 во внеклеточном CRD3-домене между аминокислотами 87-118 (SEQ ID №:352) и блокирует связывание и/или конкурирует за связывание с любой из указанных выше антигенсвязывающих молекул (I)-(IV); или

(VI) полученная молекула связывает эпитоп на CD137 во внеклеточном CRD2/CRD3-домене между аминокислотами 46-117 (SEQ ID №:356) и блокирует связывание и/или конкурирует за связывание с любой из указанных выше антигенсвязывающих молекул (I)-(IV).

5

12. Связывающая CD137/FAP молекула по пункту 11, причем часть, связывающая FAP, включает в себя вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, причем:

(I) вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 91 %, по меньшей мере на 92 %, по меньшей мере на 93 %, по меньшей мере на 94 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 96 %, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98 %, по меньшей мере на 99 % гомологична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №№: 106, 115, 124, 133, и 142; и

15

(II) вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 91 %, по меньшей мере на 92 %, по меньшей мере на 93 %, по меньшей мере на 94 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 96 %, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98 %, по меньшей мере на 99 % гомологична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №№: 110, 119, 128, 137, и 146.

20

13. Молекула нуклеиновой кислоты или несколько молекул нуклеиновой кислоты, кодирующие связывающую молекулу по одному из предыдущих пунктов, или вектор экспрессии или векторы экспрессии, содержащие такую молекулу нуклеиновой кислоты или молекулы нуклеиновой кислоты.

25

14. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по пункту 13.

30

15. Способ получения связывающей молекулы по одному из предыдущих пунктов, который включает:

(I) культивирование клетки-хозяина по пункту 14 в условиях, обеспечивающих экспрессию молекулы; и,

(II) выделение молекулы.

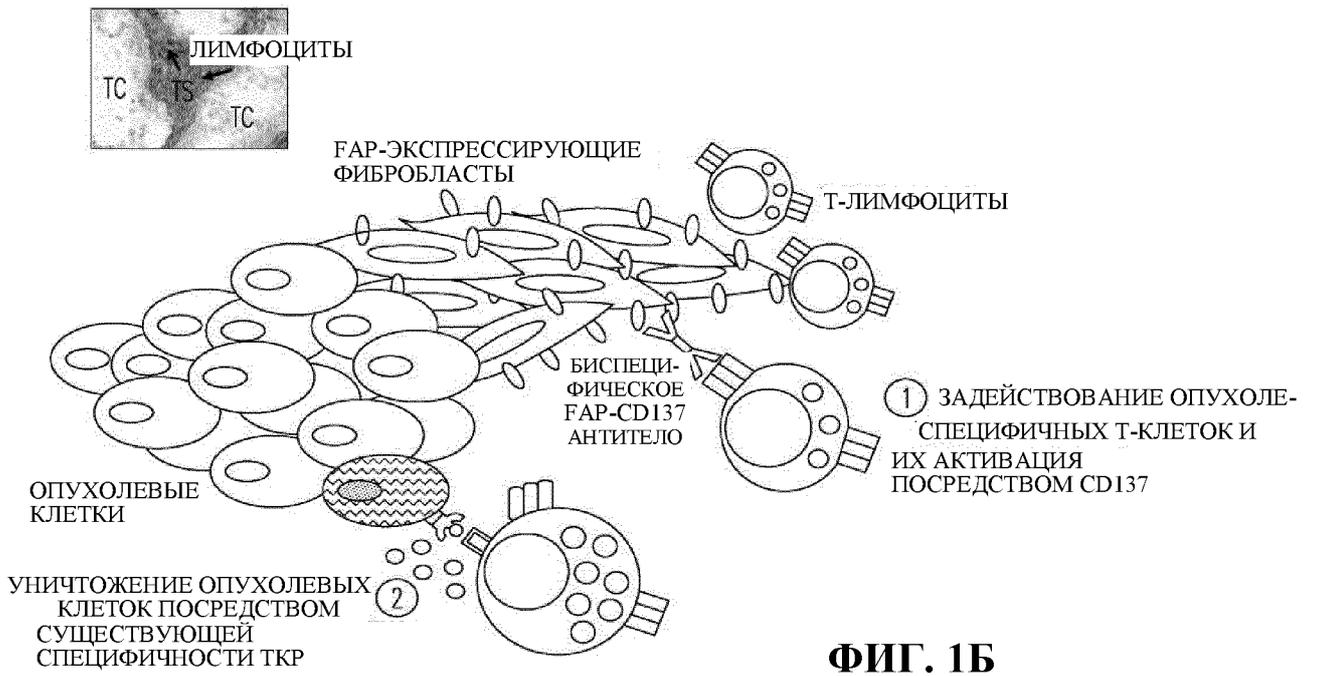
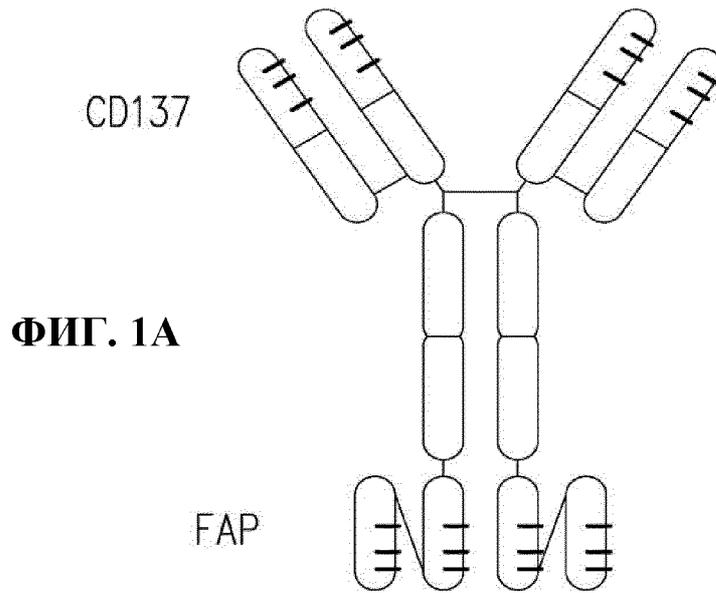
5 16. Связывающая молекула по одному из предыдущих пунктов, предназначенная для применения в медицине.

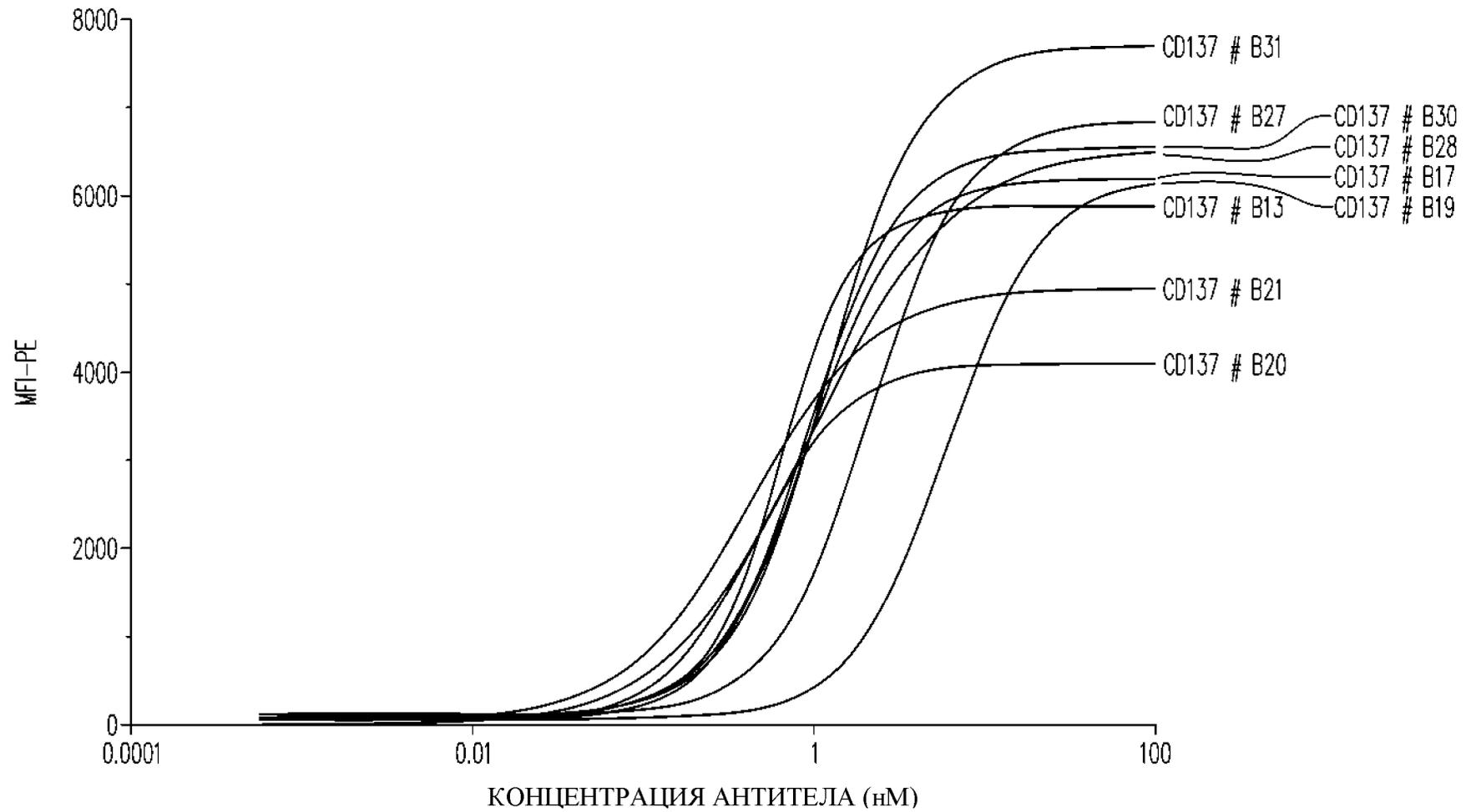
10 17. Связывающая молекула по одному из предыдущих пунктов, предназначенная для применения в терапии рака, предпочтительно колоректального рака (CRC) (например, колоректальной аденокарциномы), рака желудка (GC) (например, аденокарциномы желудка), рака поджелудочной железы (PAC) (например, аденокарциномы поджелудочной железы), и рака легкого (LC) (например, плоскоклеточной карциномы легкого, аденокарциномы легкого).

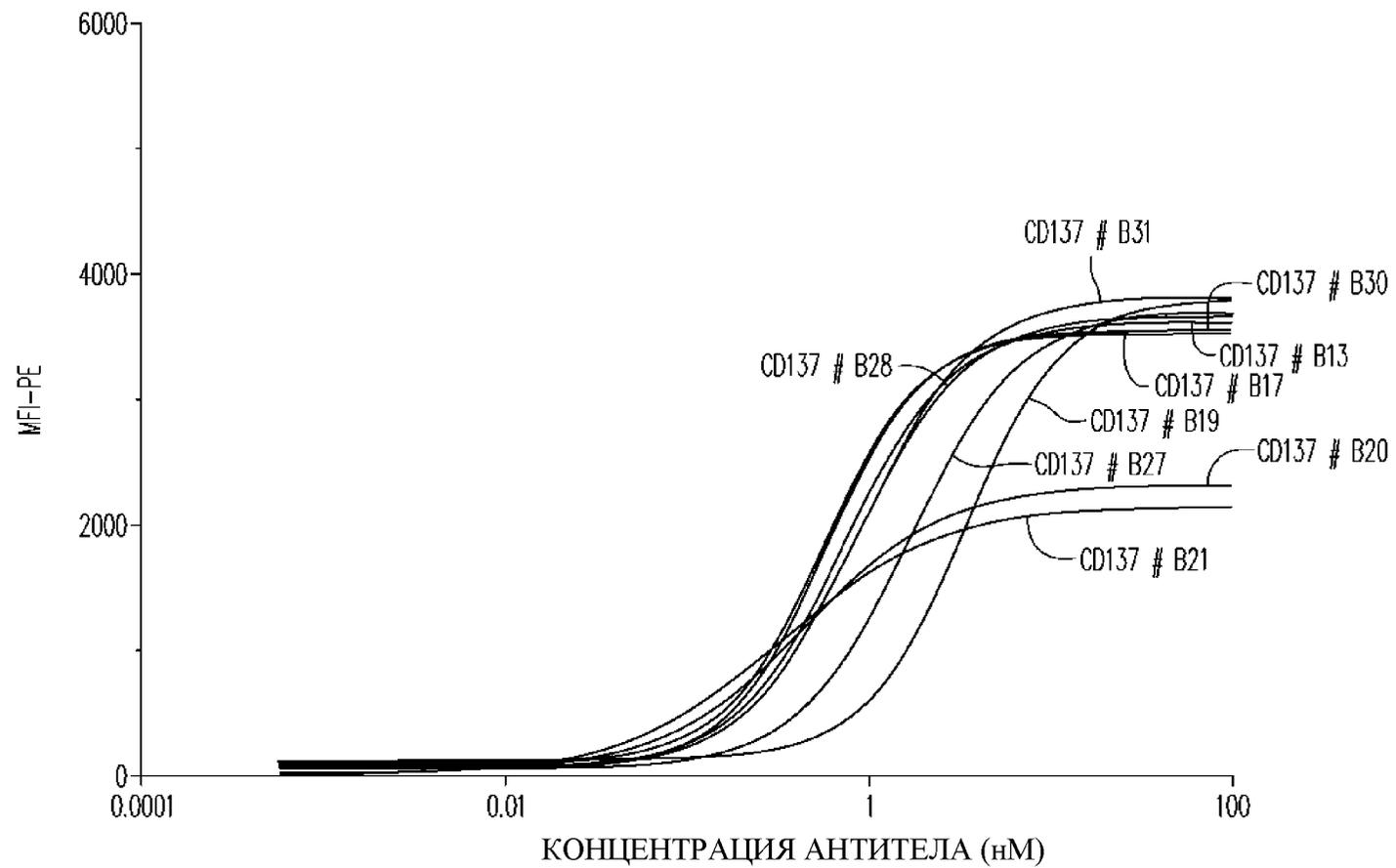
15 18. Фармацевтическая композиция, содержащая связывающую молекулу по одному из предыдущих пунктов вместе с фармацевтически приемлемым носителем и необязательно одним или большим количеством дополнительных действующих веществ.

20 19. Способ лечения рака, который включает введение эффективного количества связывающей молекулы по одному из предыдущих пунктов пациенту, который нуждается в этом.

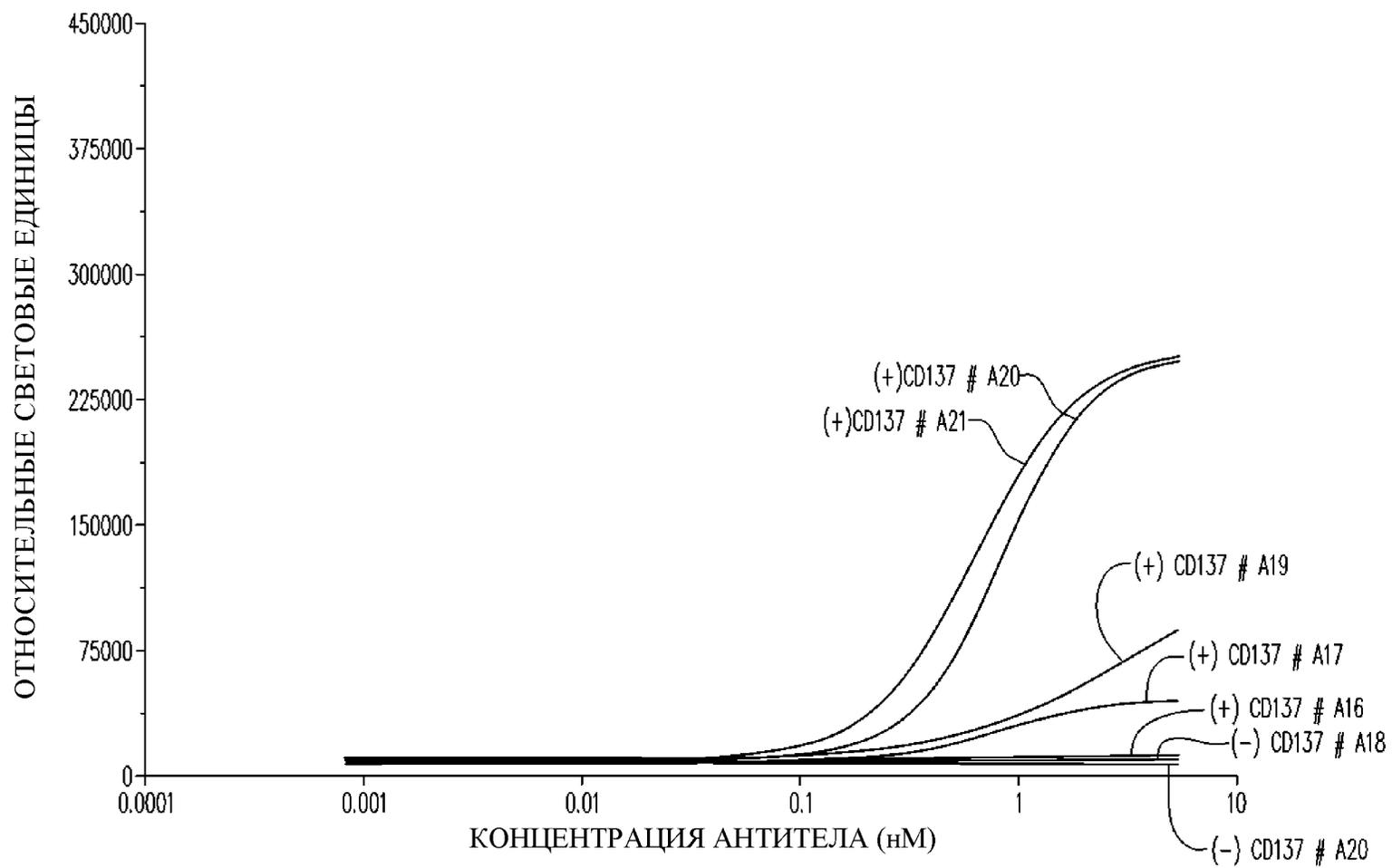
25 20. Способ по пункту 19, причем указанный способ включает введение пациенту, который нуждается в этом, полипептида, способного специфически связываться с CD137 и FAP, в комбинации с антителом к PD-1.



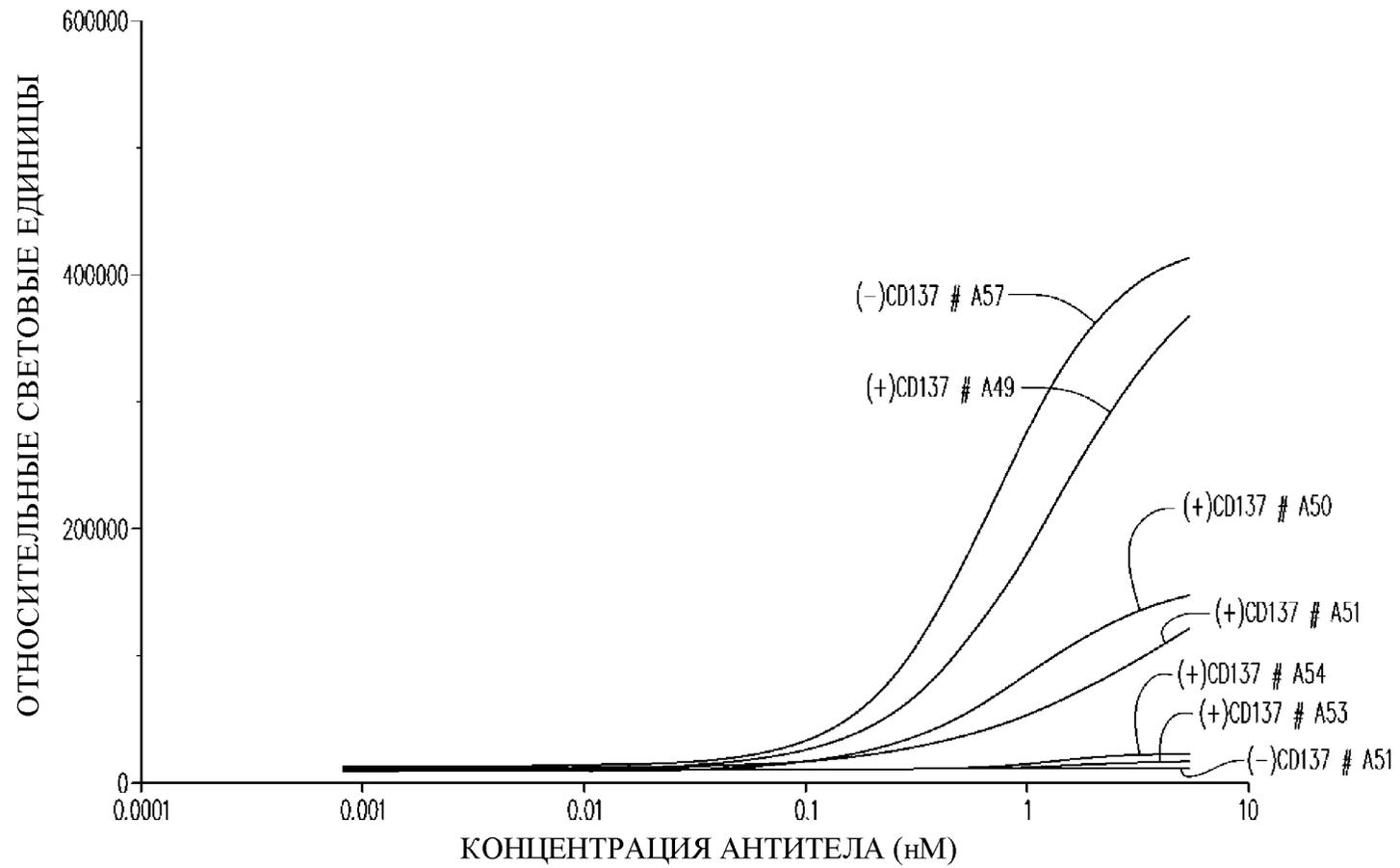
**ФИГ. 2А**



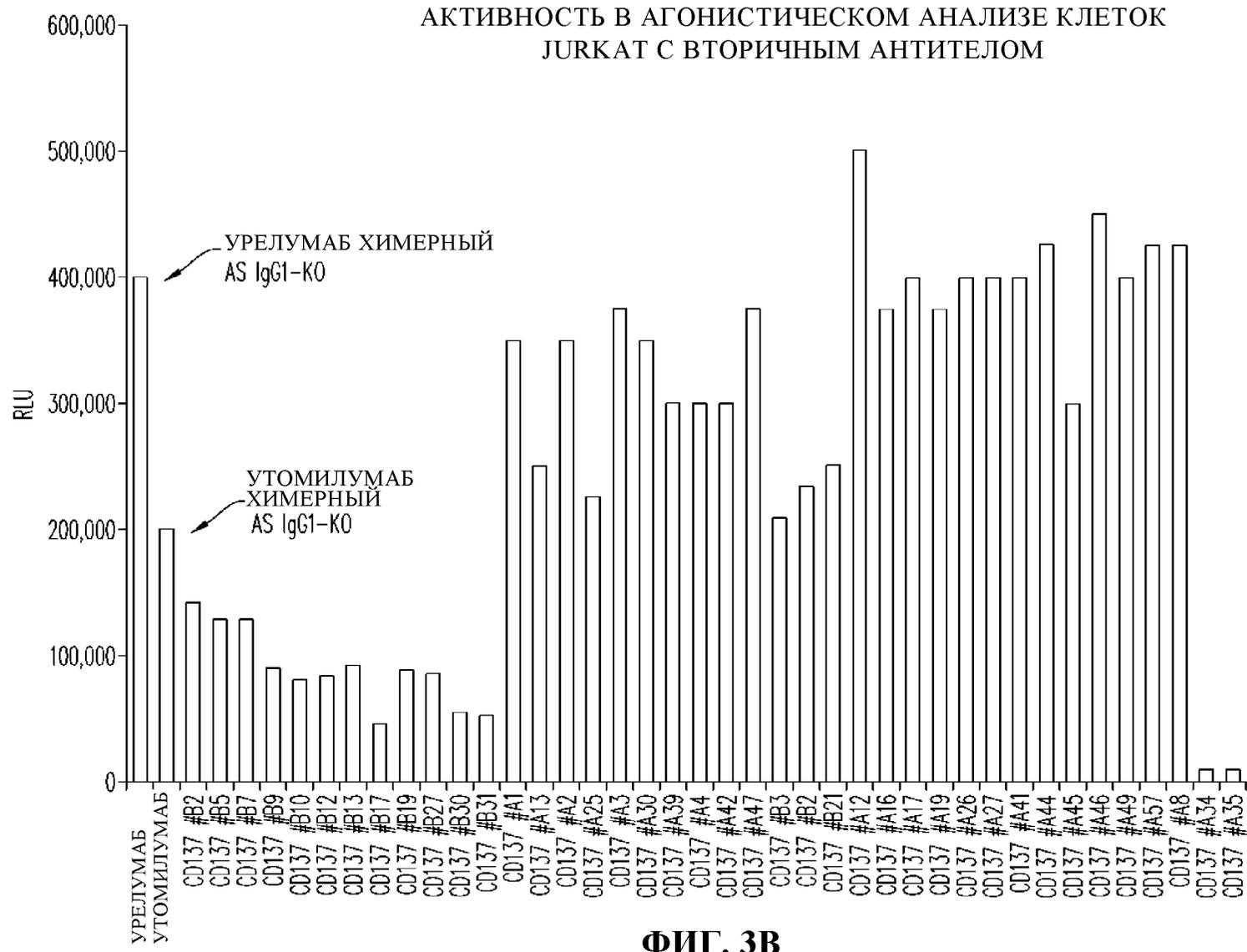
ФИГ. 2Б



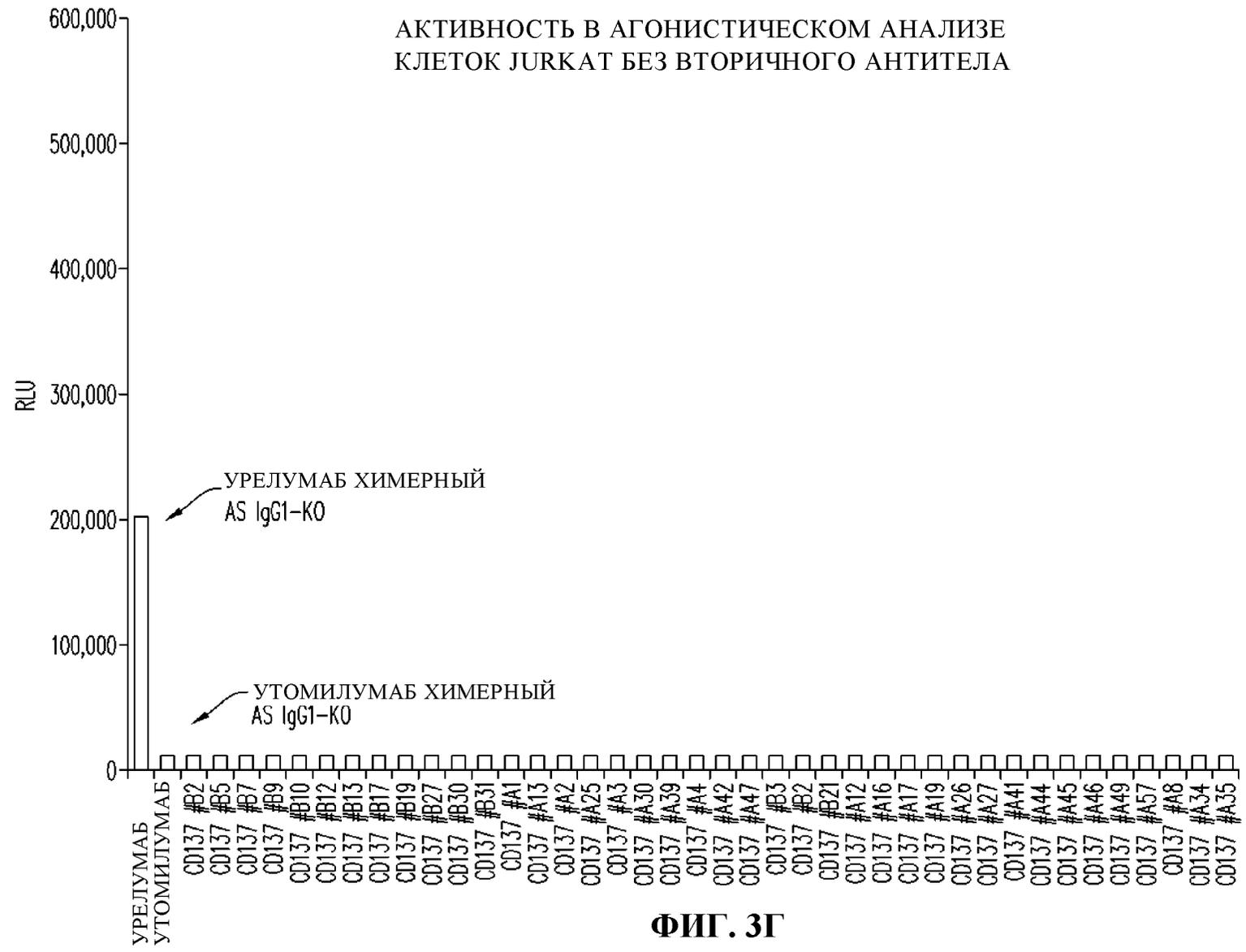
ФИГ. 3А



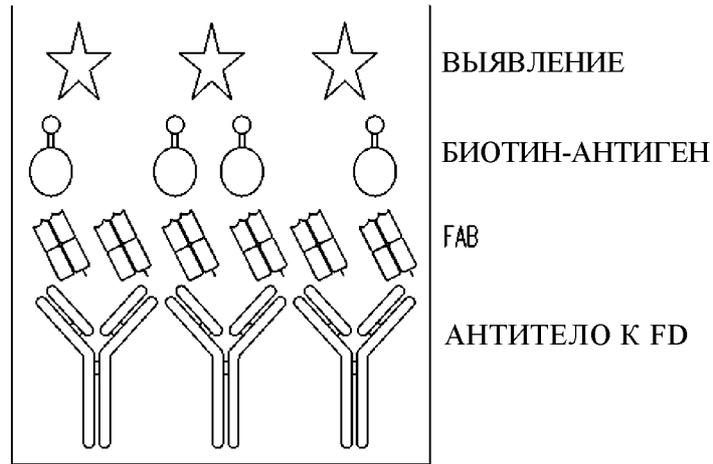
ФИГ. 3Б



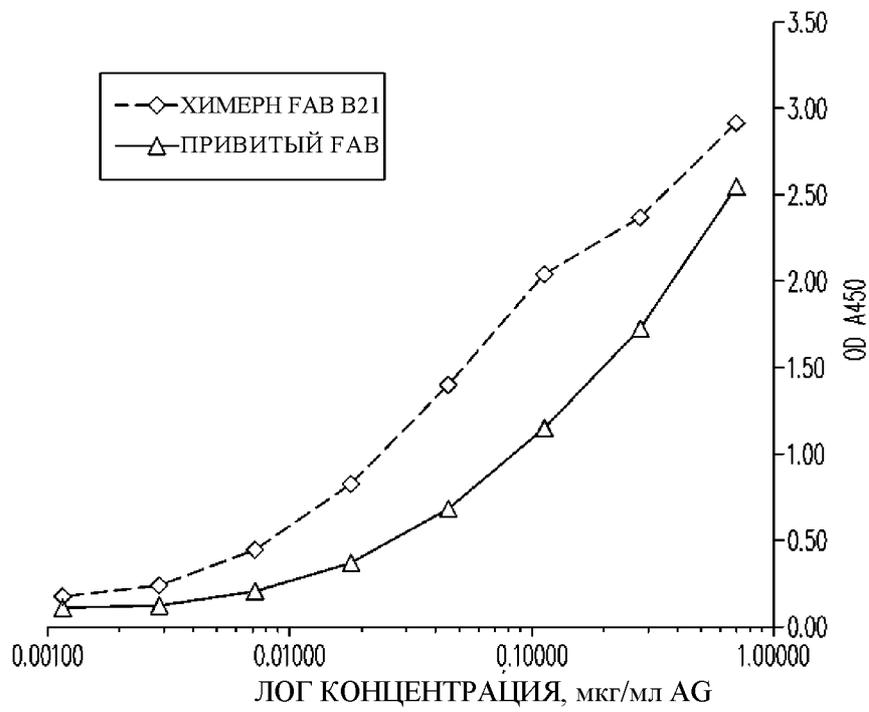
ФИГ. 3В



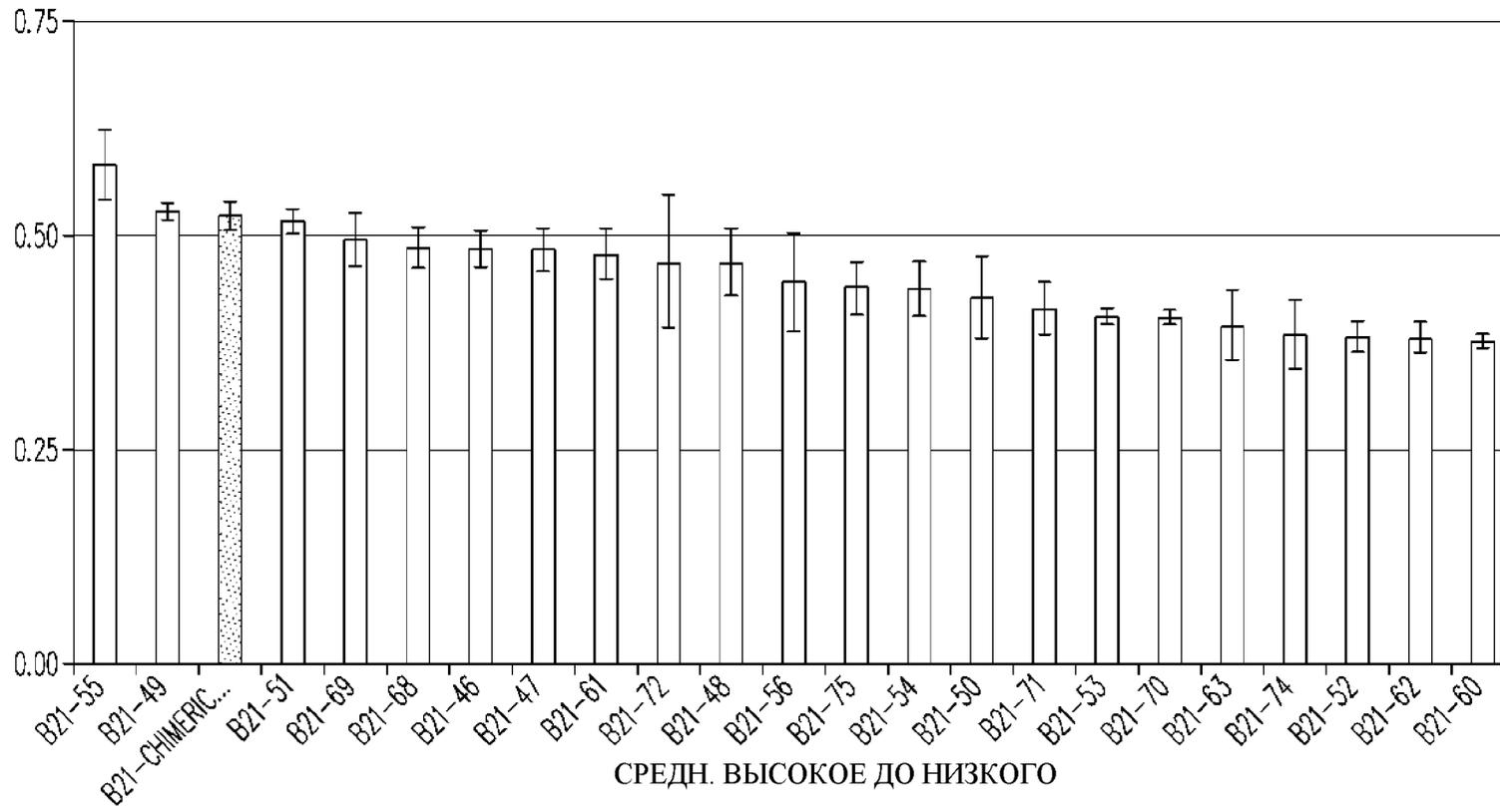
ФИГ. 3Г

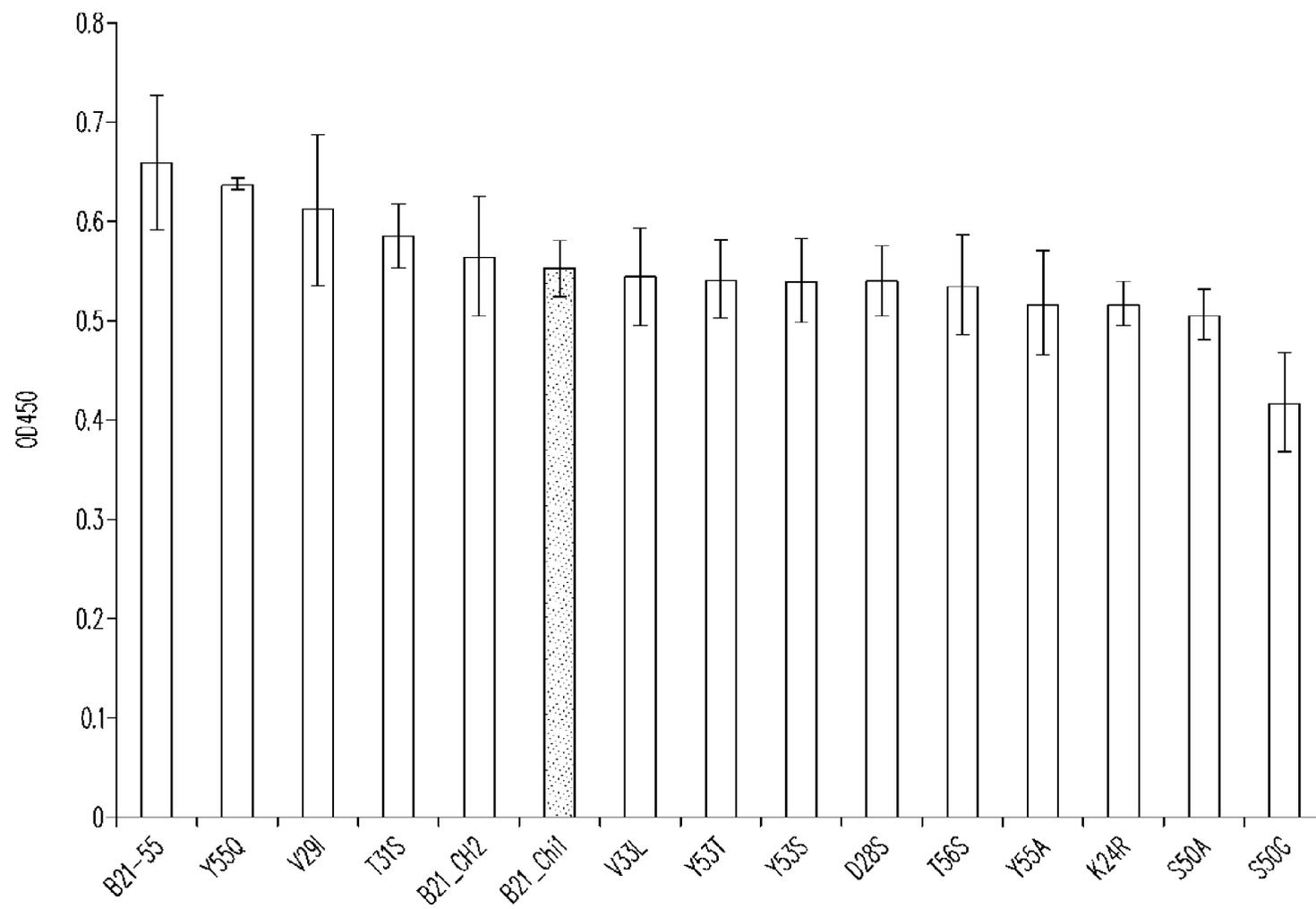


ФИГ. 4А

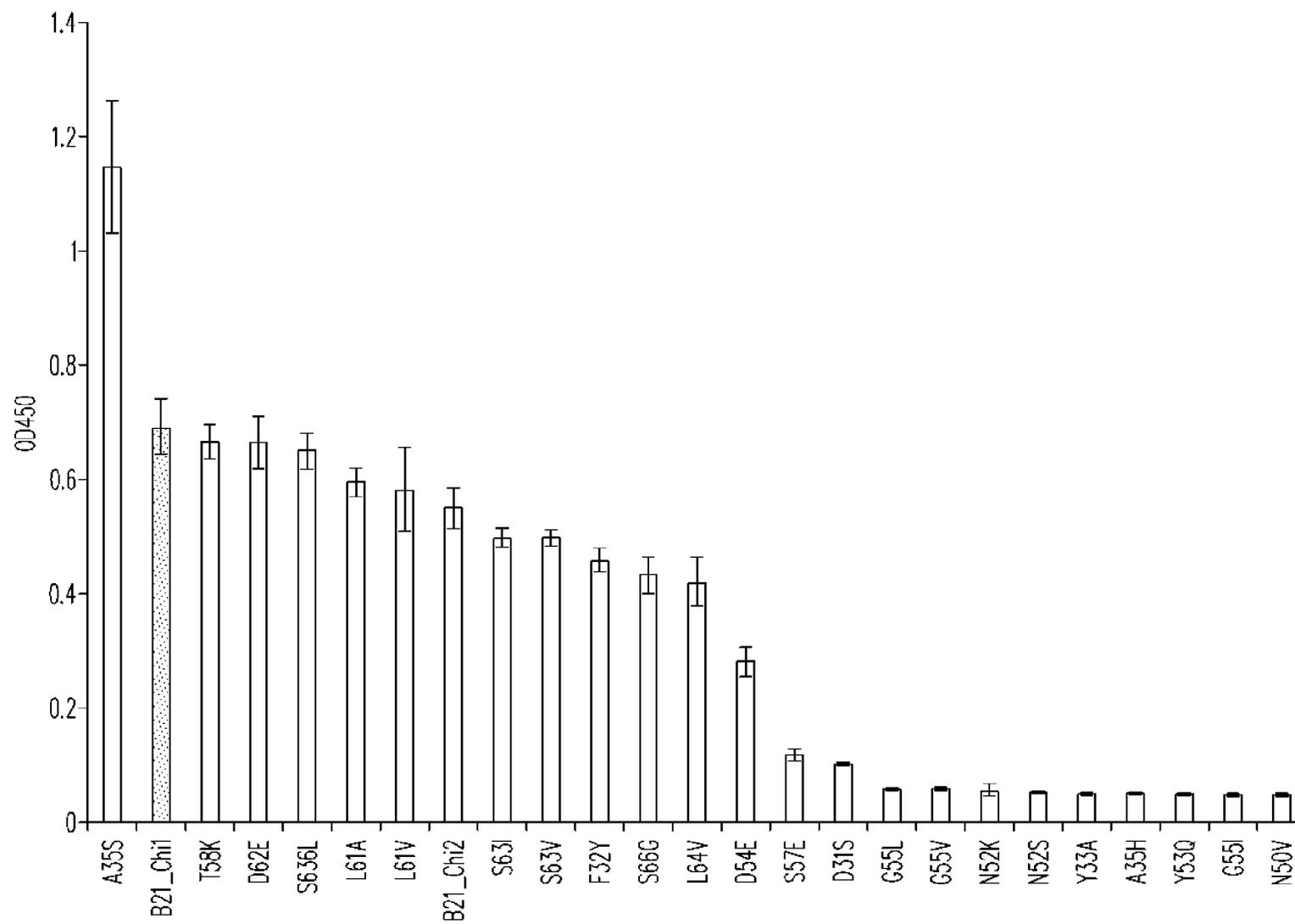


ФИГ. 4Б

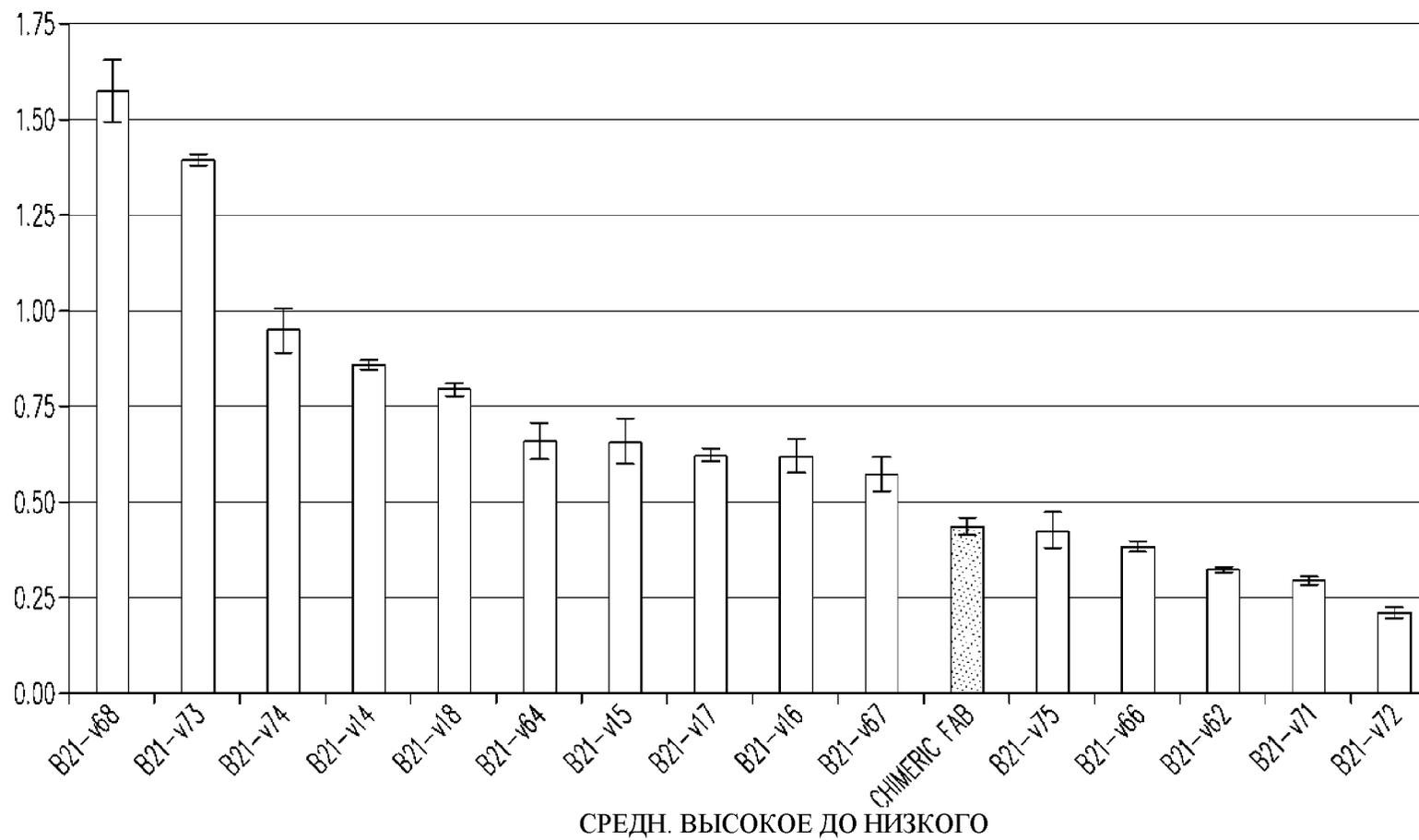
**ФИГ. 5**



ФИГ. 6А

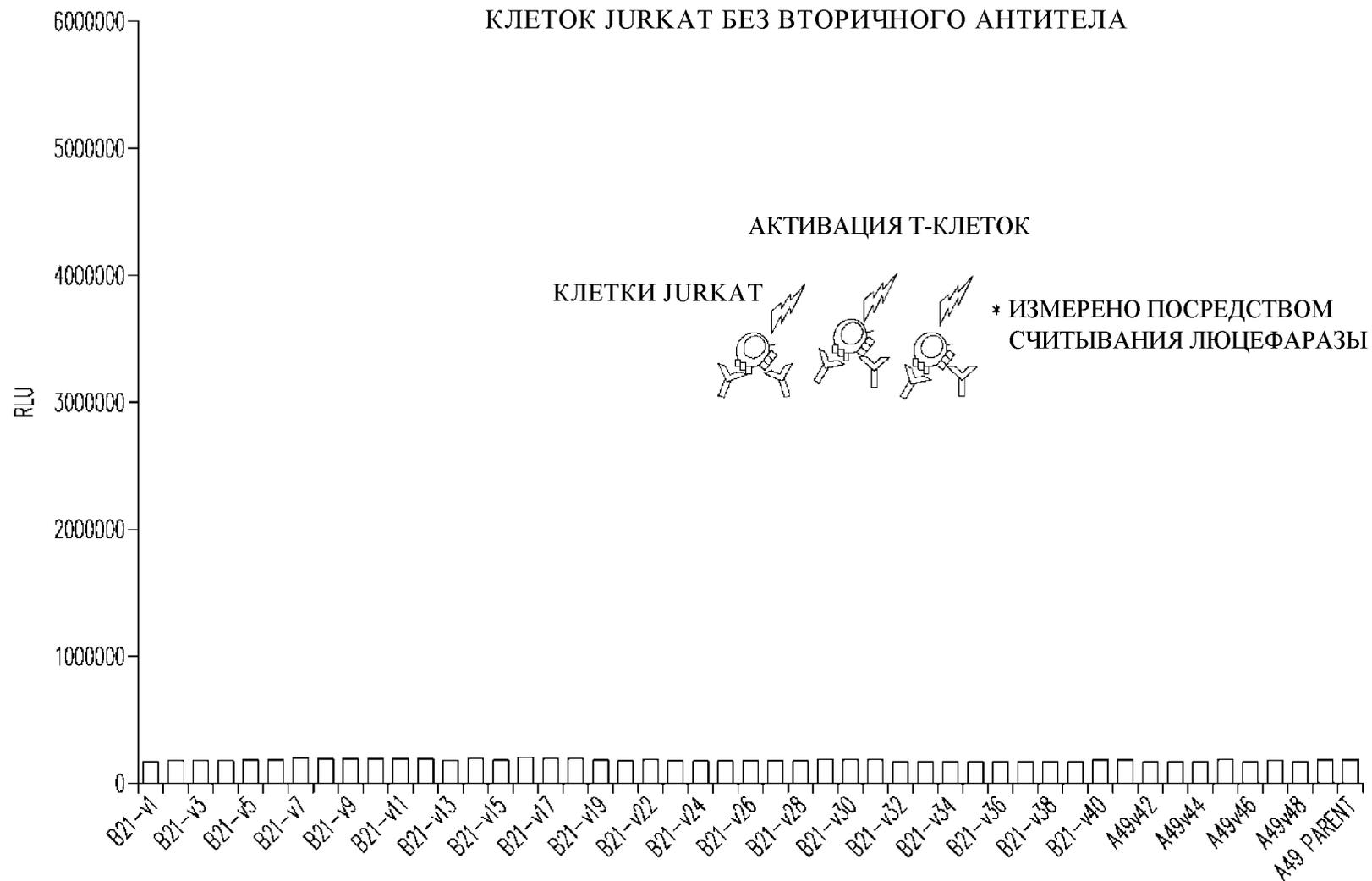


ФИГ. 6Б

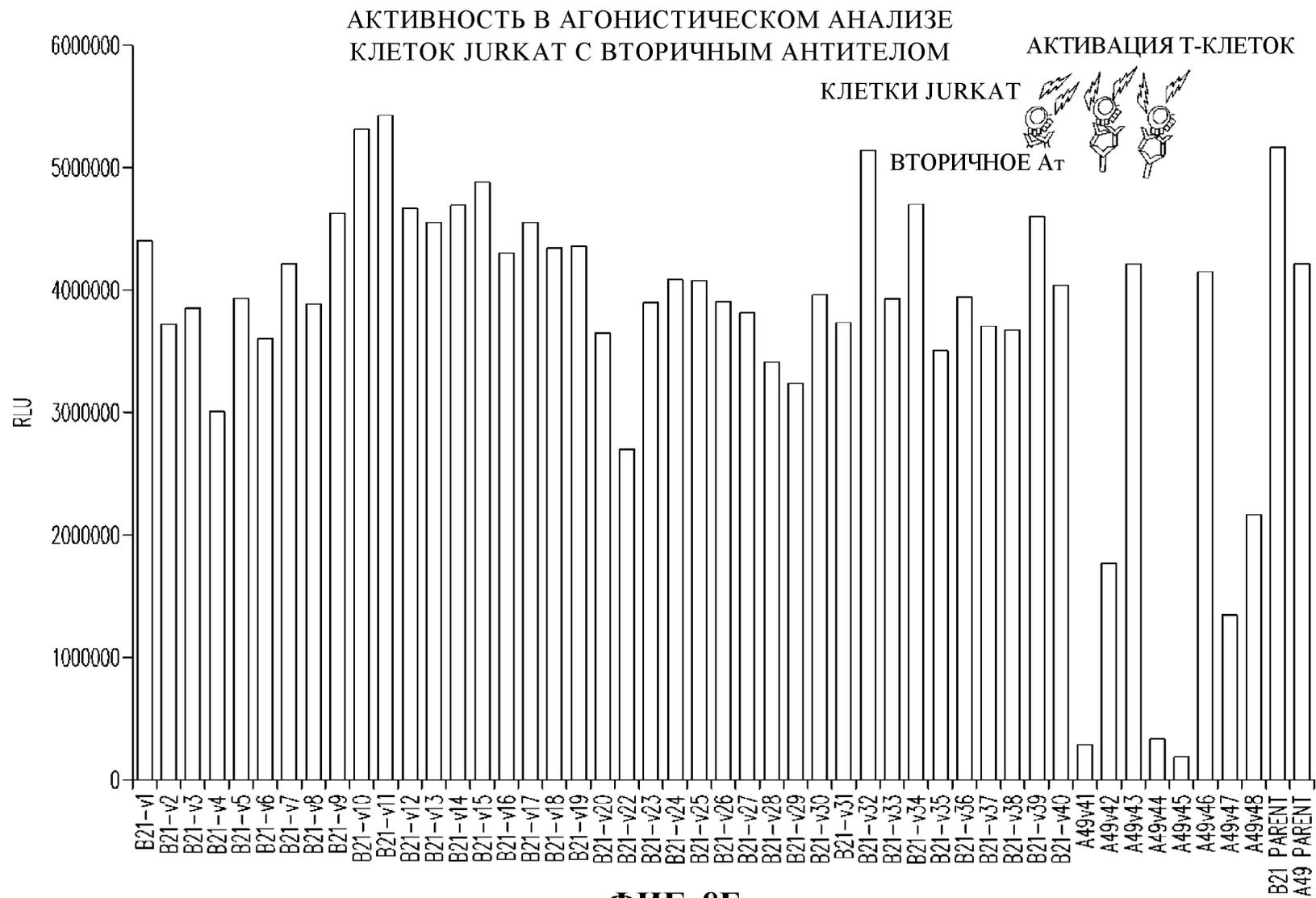


ФИГ. 7

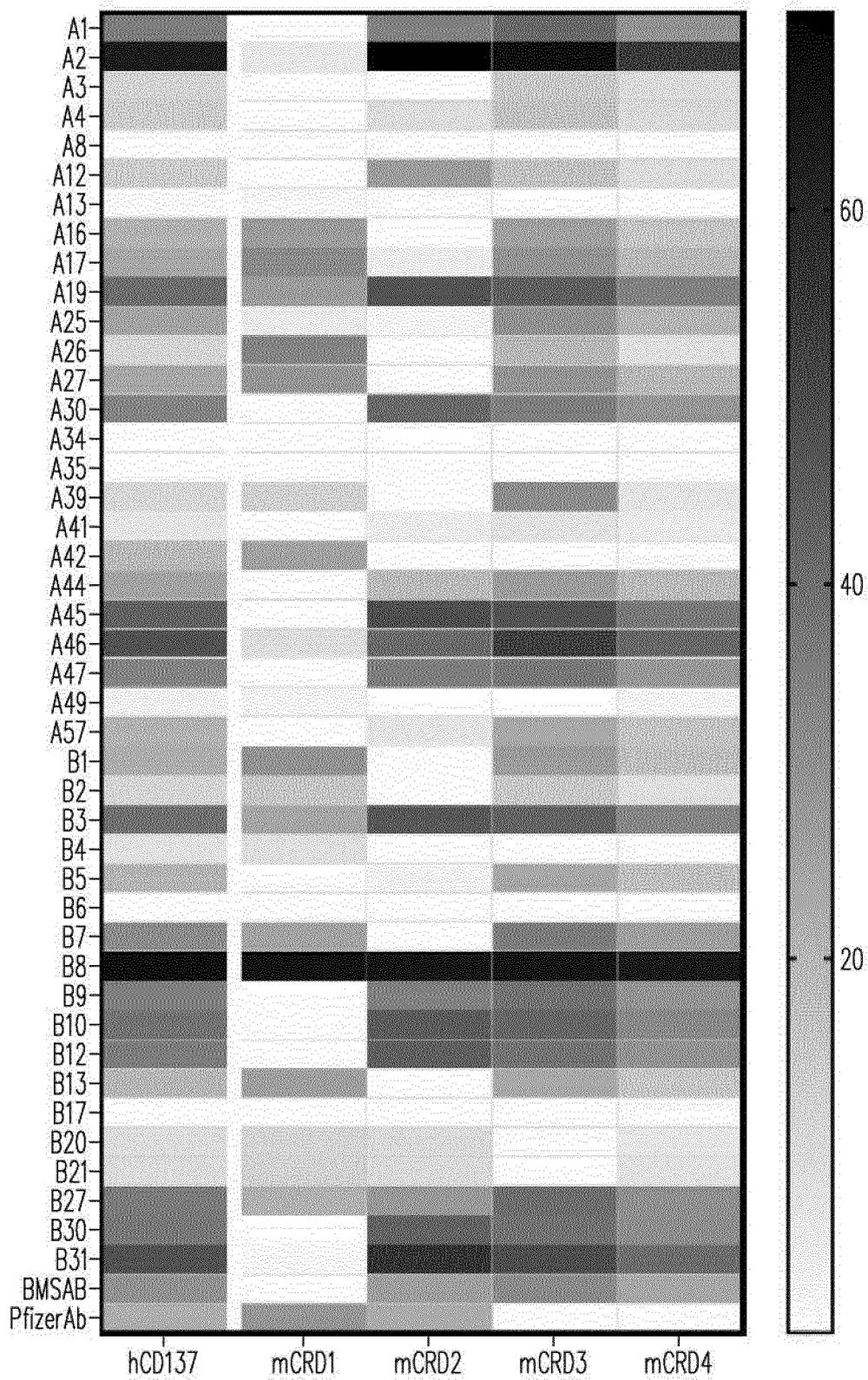
АКТИВНОСТЬ В АГОНИСТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ
КЛЕТОК JURKAT БЕЗ ВТОРИЧНОГО АНТИТЕЛА



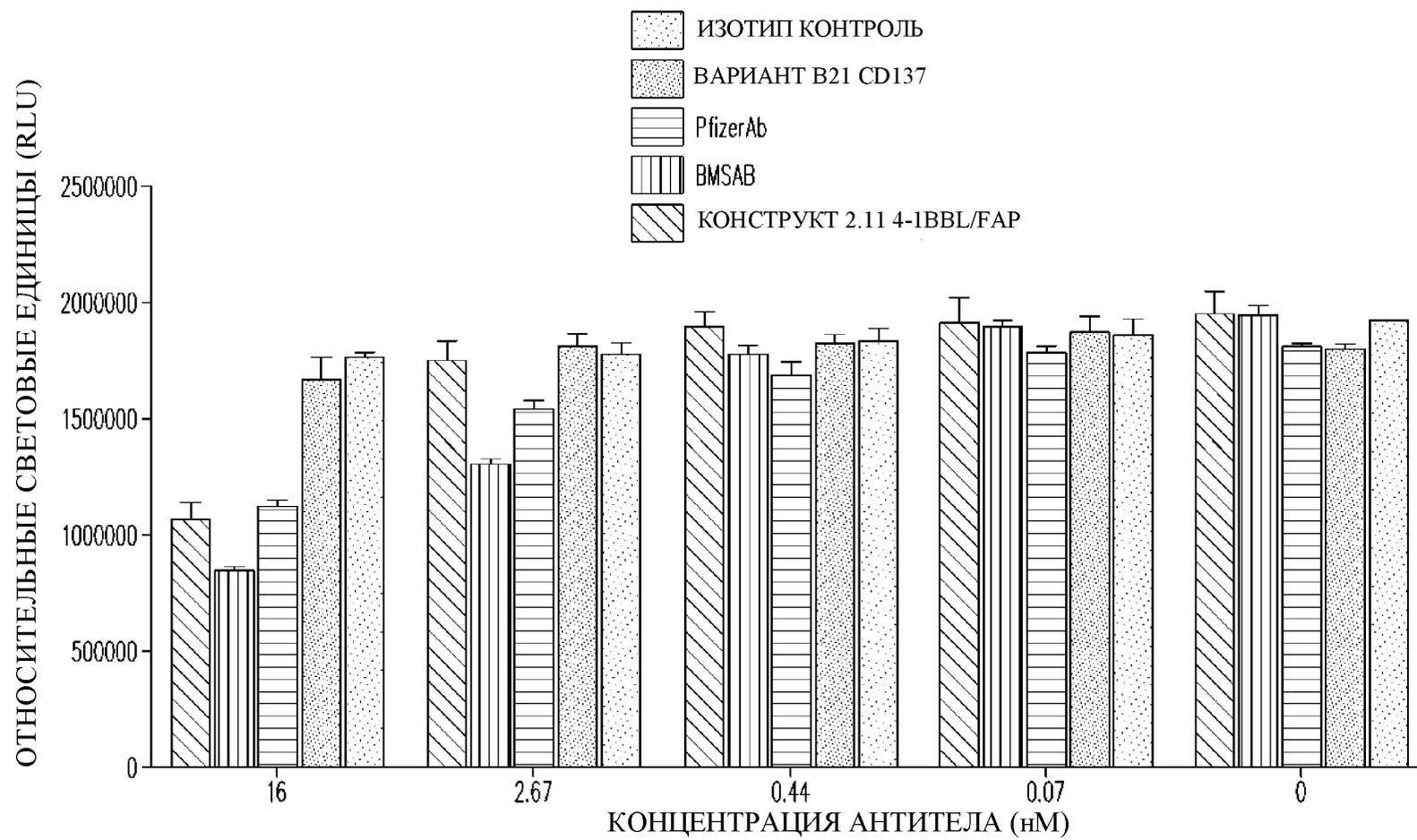
ФИГ. 8А



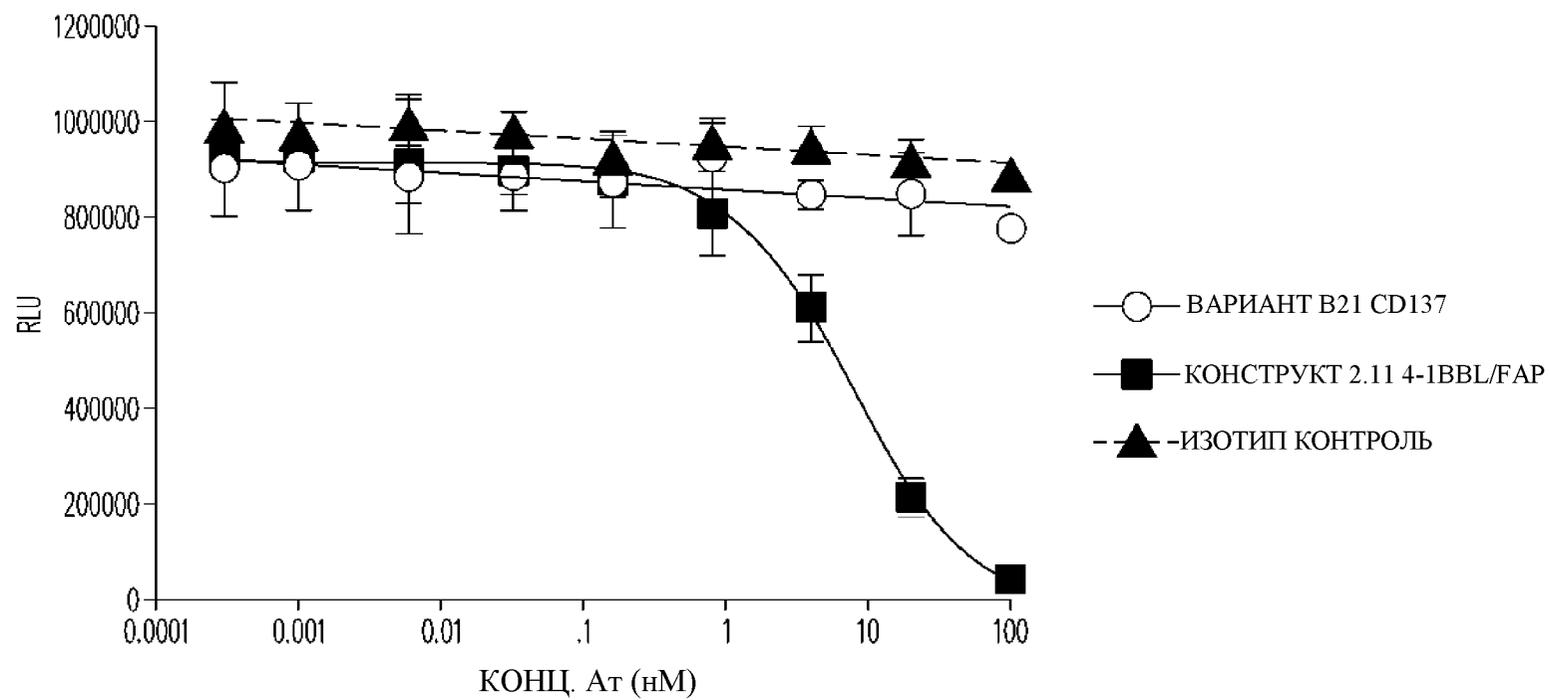
ФИГ. 8Б



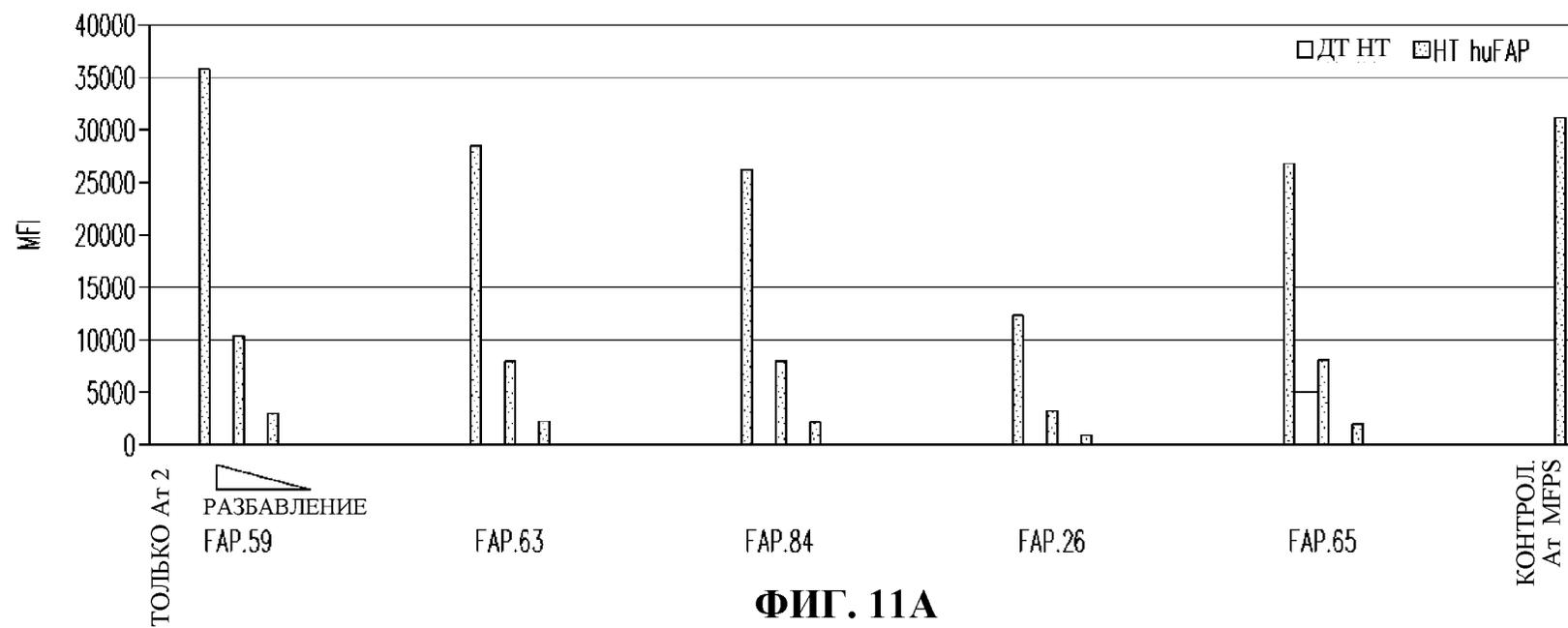
ФИГ. 9



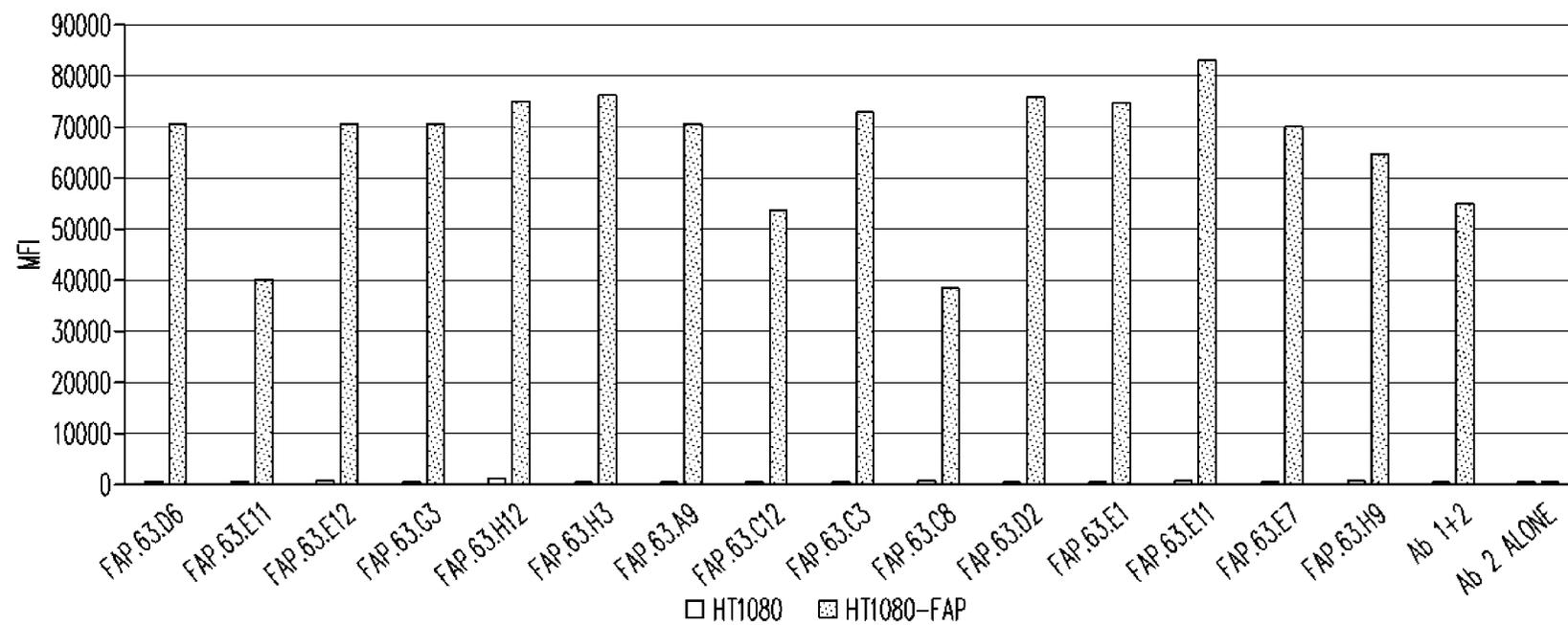
ФИГ. 10А



ФИГ. 10Б

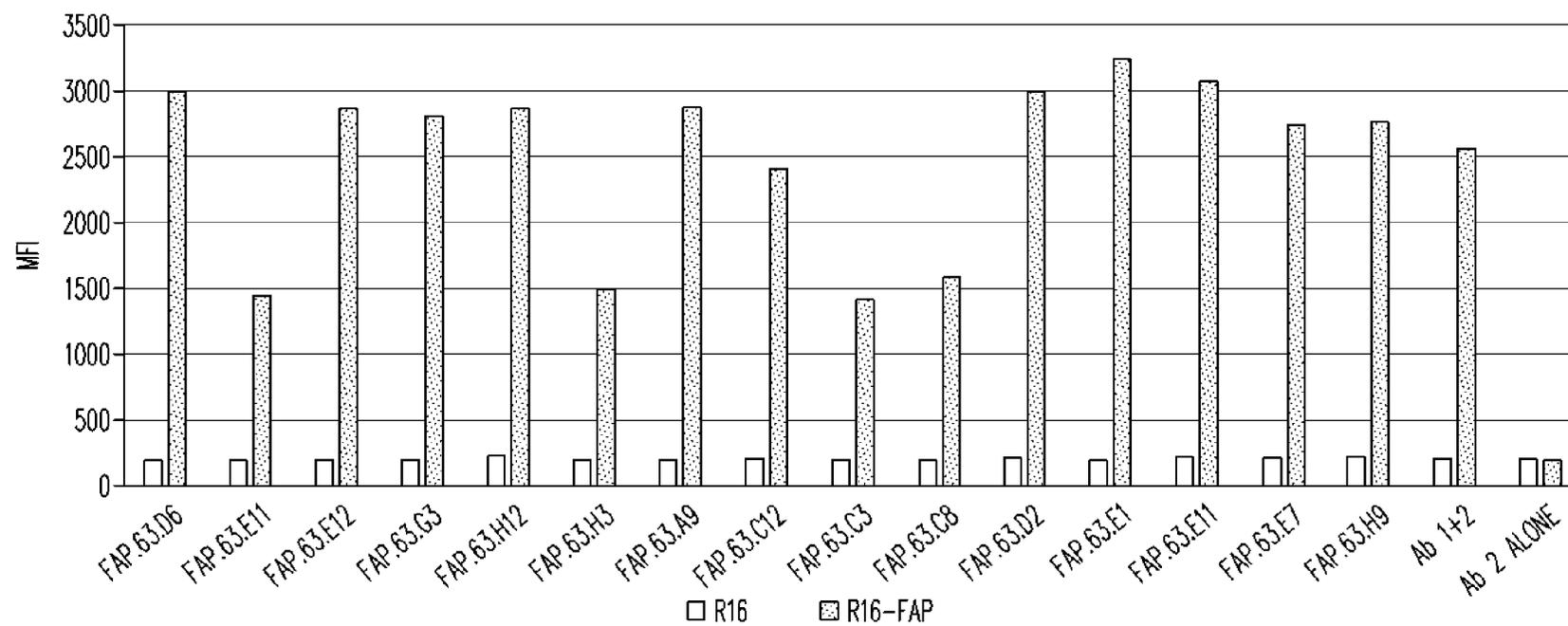


MFI НА КЛЕТКАХ FAP ЧЕЛОВЕКА



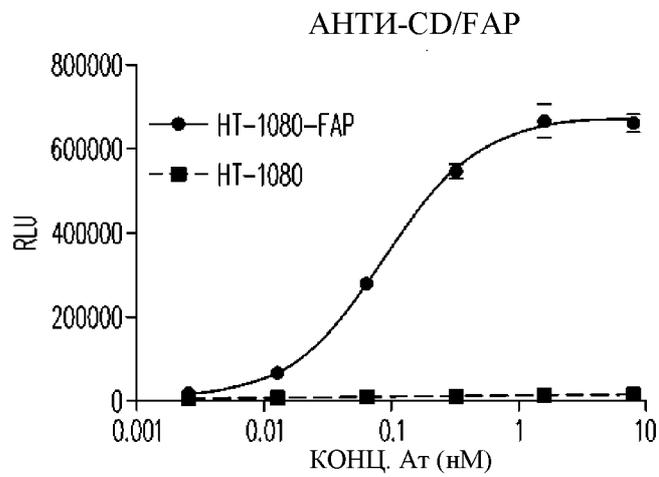
ФИГ. 11Б

МФИ НА КЛЕТКАХ FAP МЫШИ

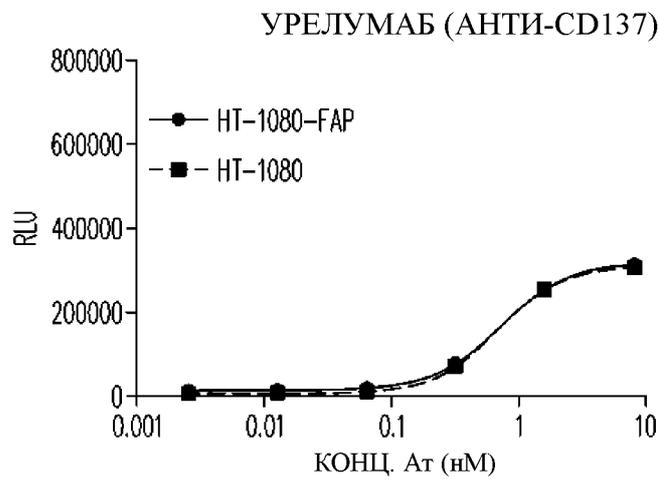


ФИГ. 11В

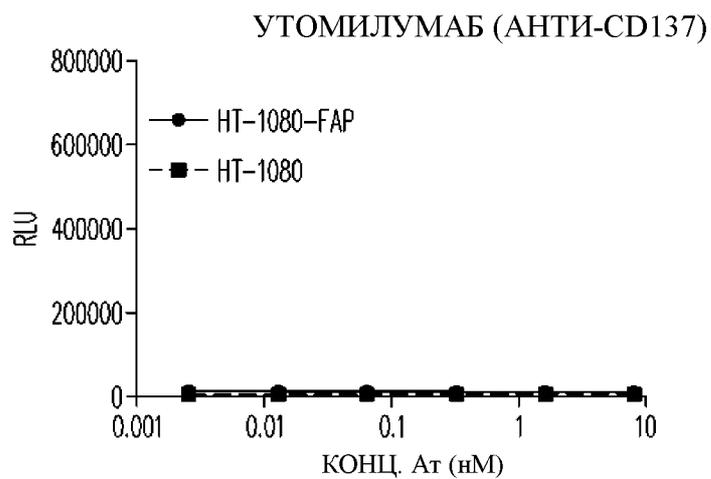
ФИГ. 12А

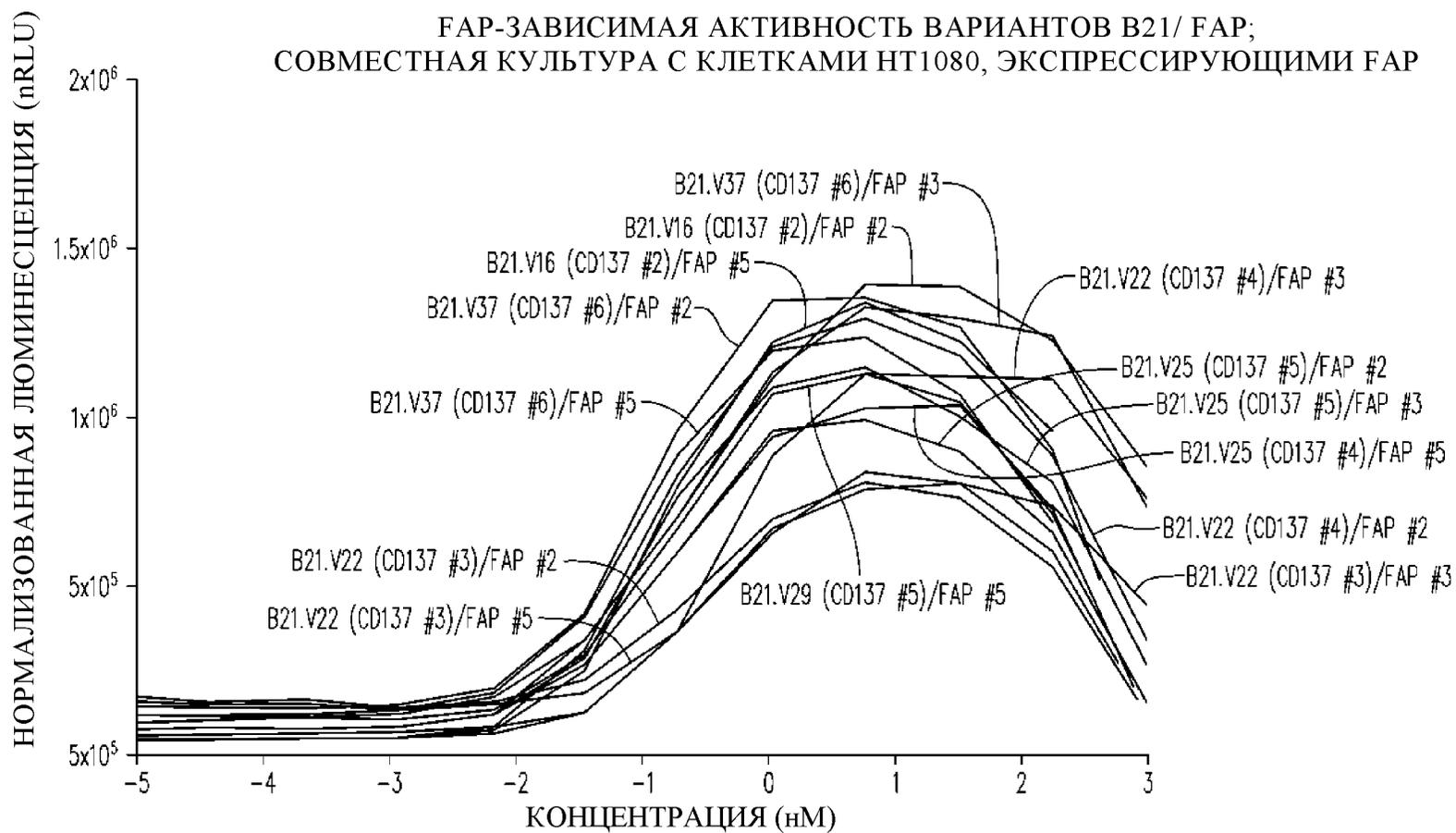


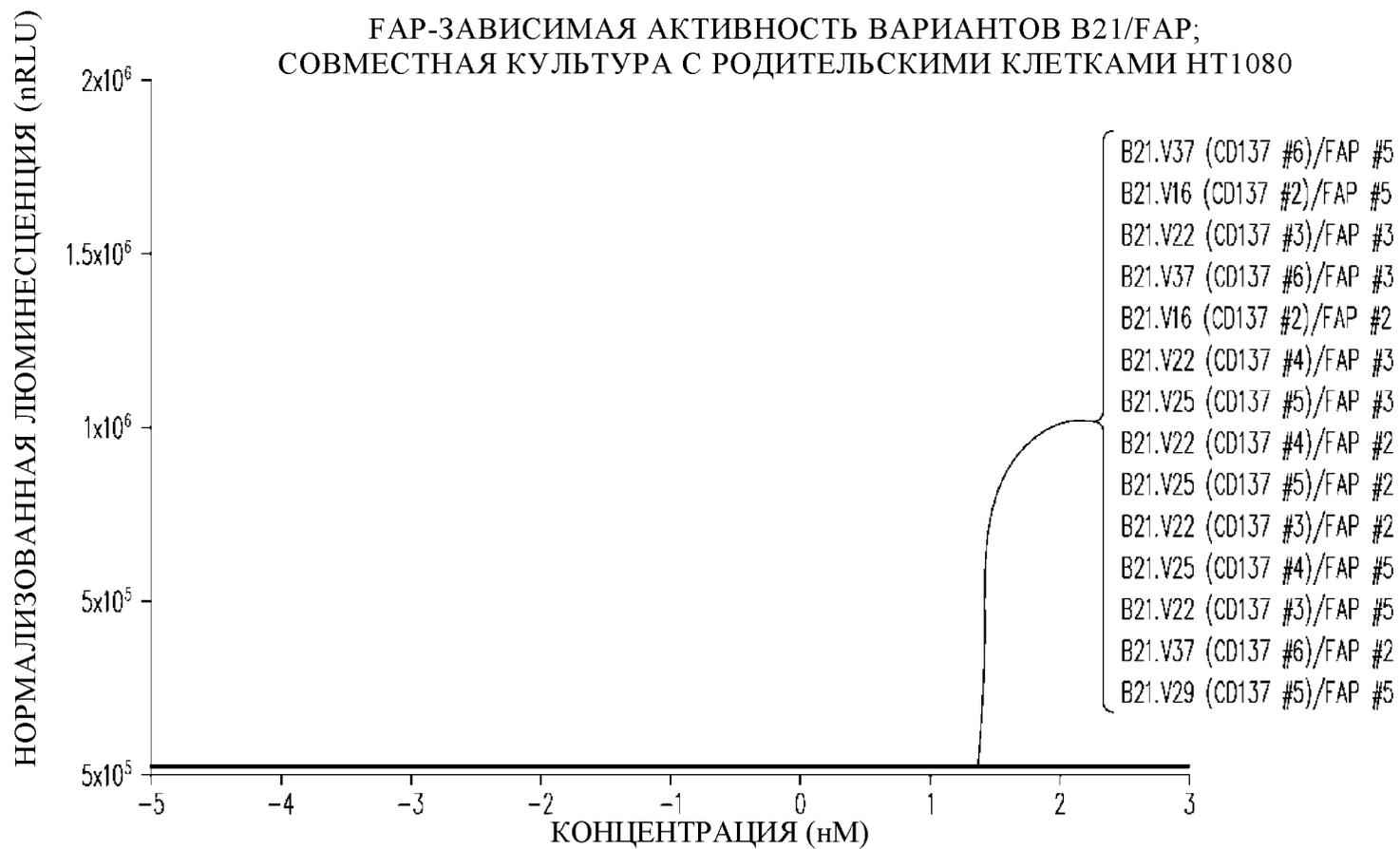
ФИГ. 12Б

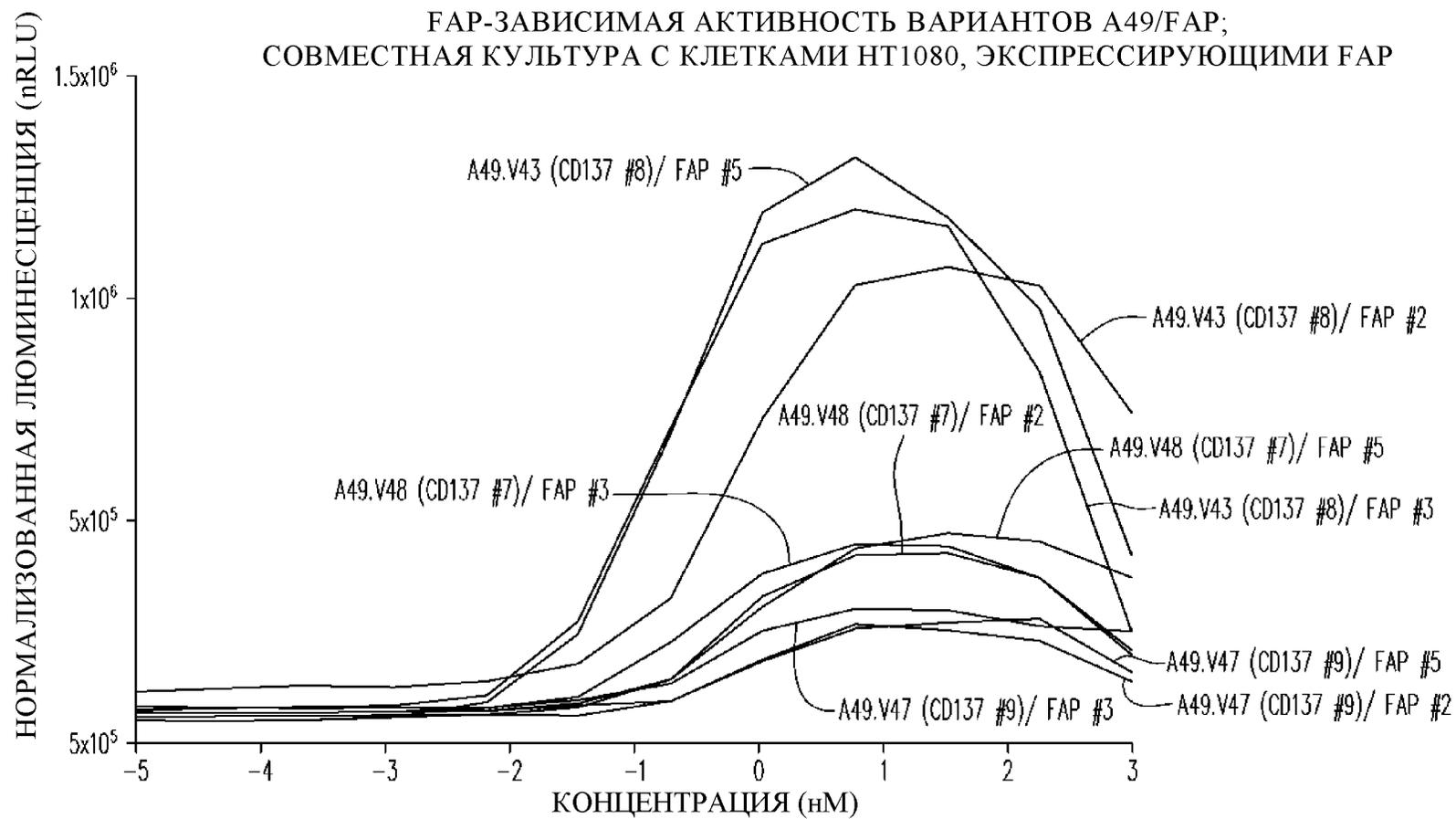


ФИГ. 12В

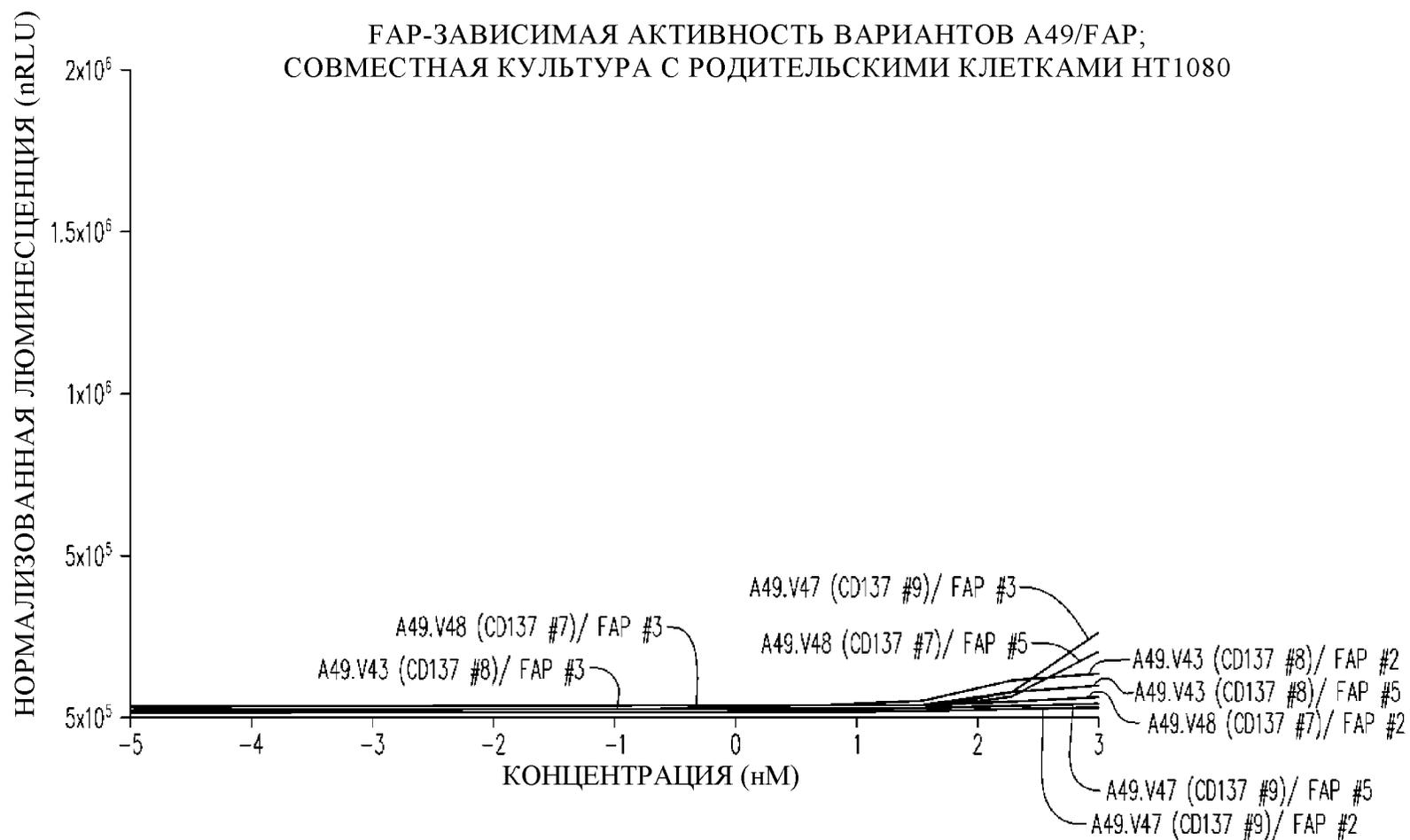


**ФИГ. 13А**

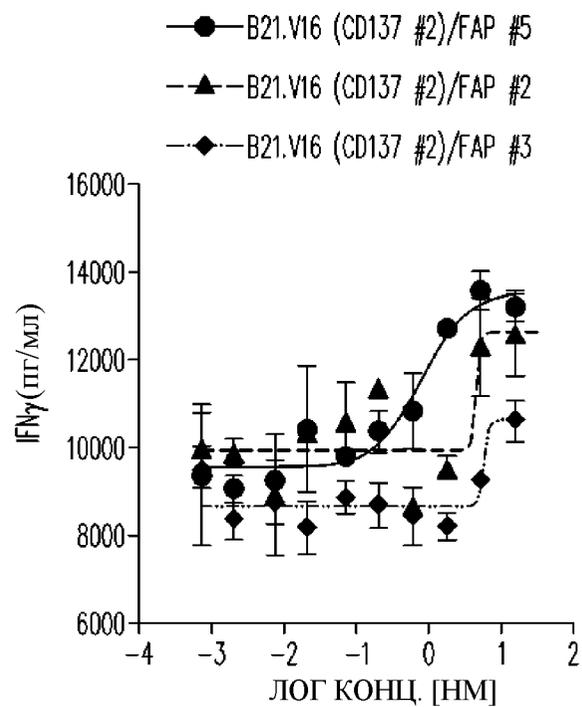
**ФИГ. 13Б**



ФИГ. 13В

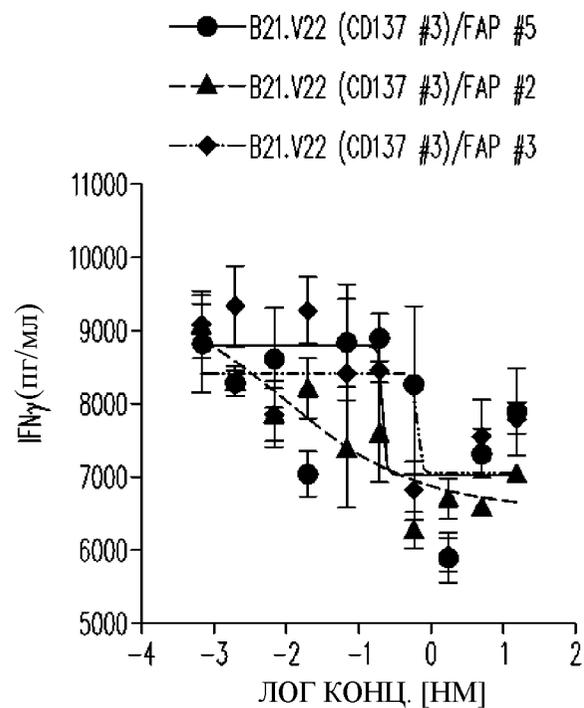


ФИГ. 13Г



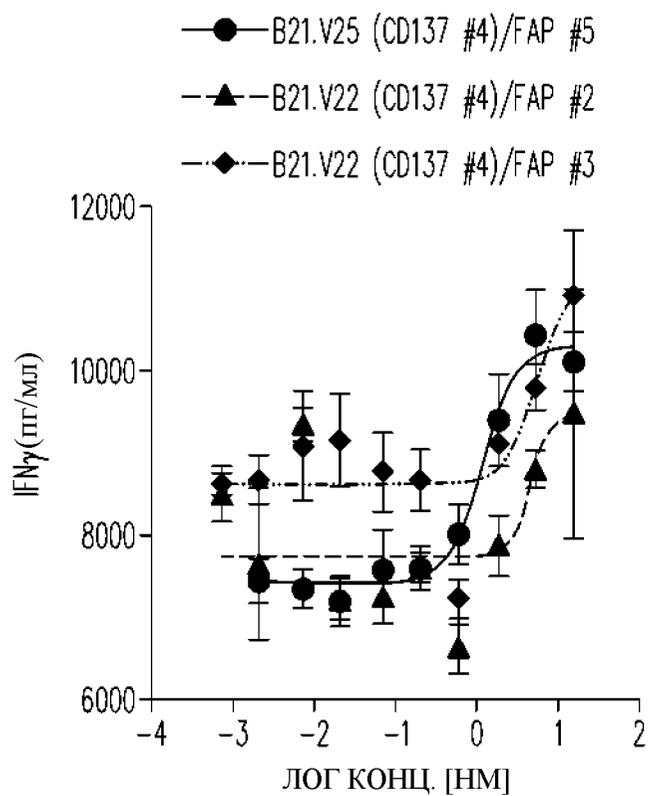
	EC50
B21.V16 (CD137 #2)/FAP #5	0.7946
B21.V16 (CD137 #2)/FAP #2	~ 4.581
B21.V16 (CD137 #2)/FAP #3	~ 5.670

ФИГ. 14А



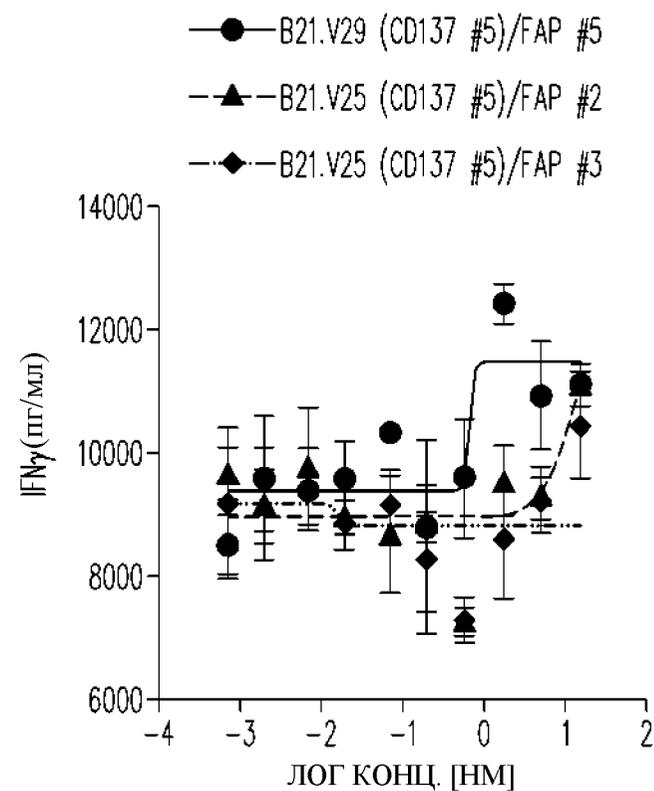
	EC50
B21.V22 (CD137 #3)/FAP #5	~ 0.6744
B21.V22 (CD137 #3)/FAP #2	0.009174
B21.V22 (CD137 #3)/FAP #3	~ 0.2204

ФИГ. 14Б



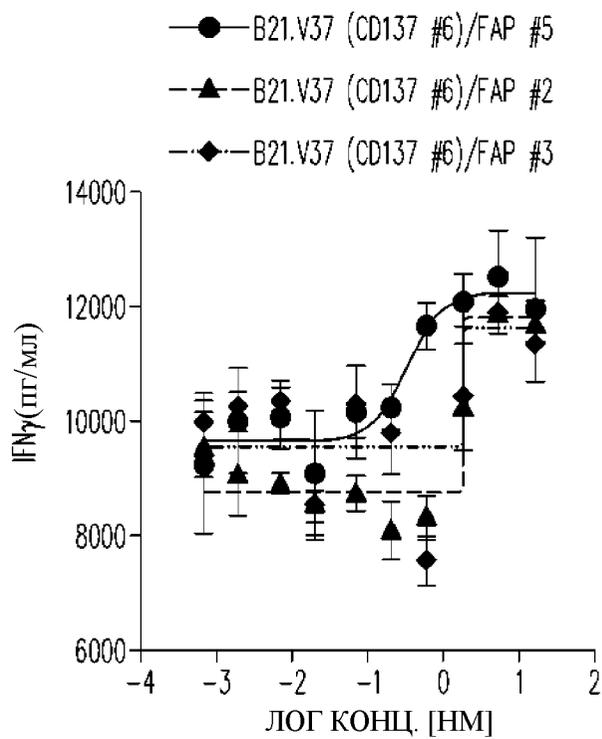
	EC50
B21.V25 (CD137 #4)/FAP #5	1.173
B21.V22 (CD137 #4)/FAP #2	4.702
B21.V22 (CD137 #4)/FAP #3	5.338

ФИГ. 14В



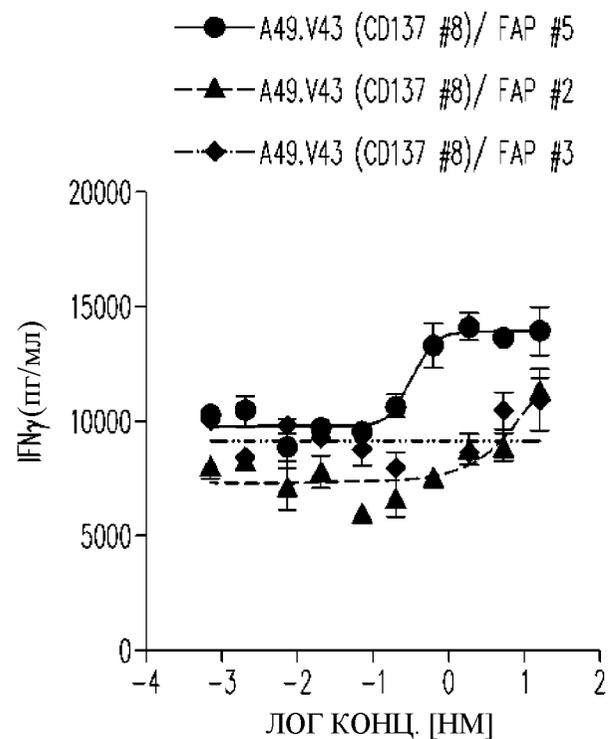
	EC50
B21.V29 (CD137 #5)/FAP #5	~ 0.6926
B21.V25 (CD137 #5)/FAP #2	13.72
B21.V25 (CD137 #5)/FAP #3	0.01557

ФИГ. 14Г



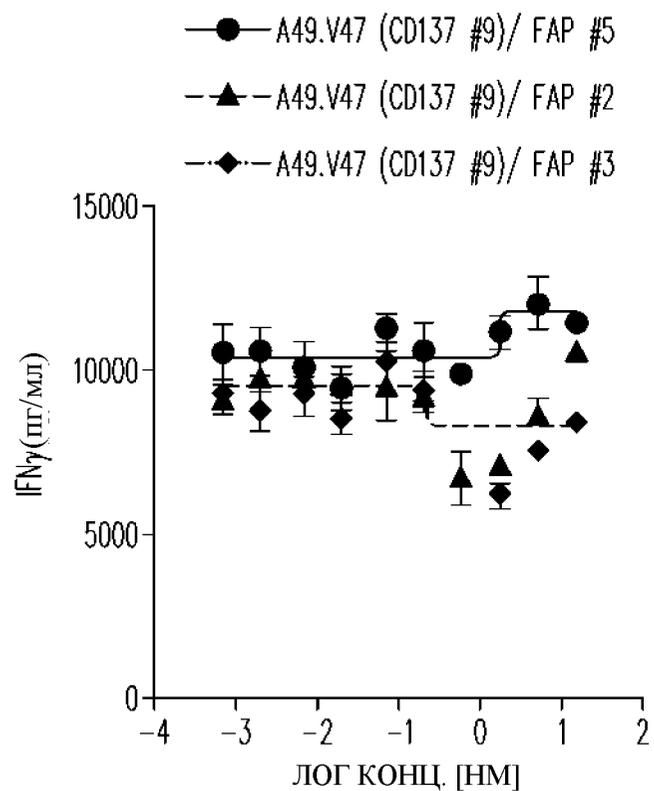
	EC50
B21.V37 (CD137 #6)/FAP #5	0.3328
B21.V37 (CD137 #6)/FAP #2	~ 1.800
B21.V37 (CD137 #6)/FAP #3	~ 1.805

ФИГ. 14Д



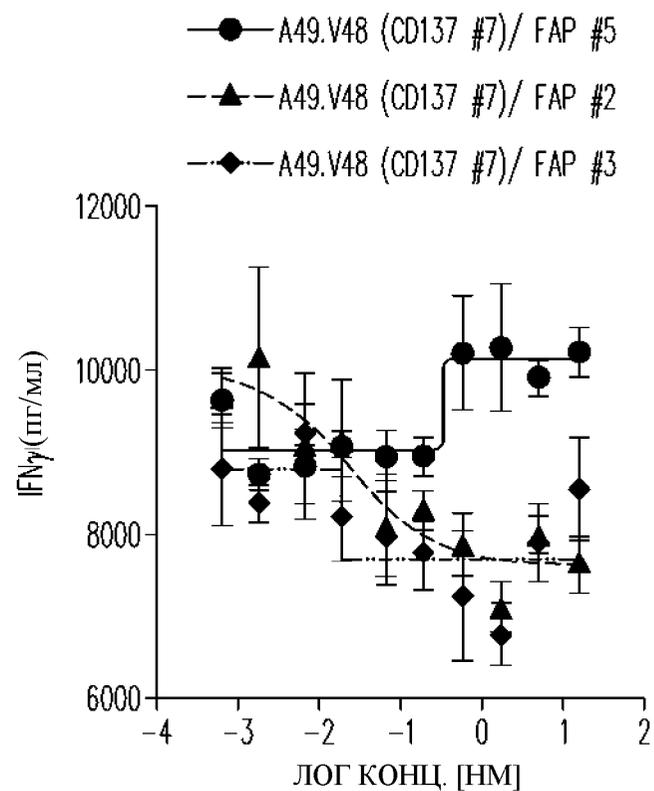
	EC50
A49.V43 (CD137 #8)/ FAP #5	0.3155
A49.V43 (CD137 #8)/ FAP #2	20.35
A49.V43 (CD137 #8)/ FAP #3	~

ФИГ. 14Е



	EC50
A49.V47 (CD137 #9)/ FAP #5	~ 1.786
A49.V47 (CD137 #9)/ FAP #2	~ 0.2072
A49.V47 (CD137 #9)/ FAP #3	

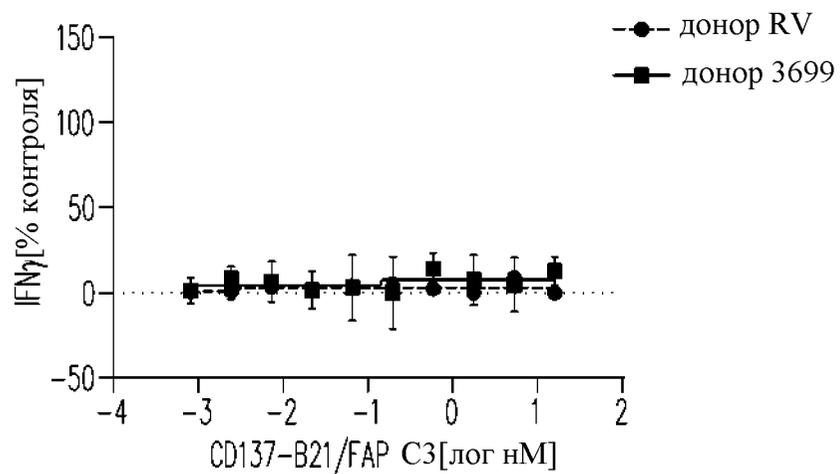
ФИГ. 14Ж



	EC50
A49.V48 (CD137 #7)/ FAP #5	0.3489
A49.V48 (CD137 #7)/ FAP #2	0.02594
A49.V48 (CD137 #7)/ FAP #3	~ 0.01997

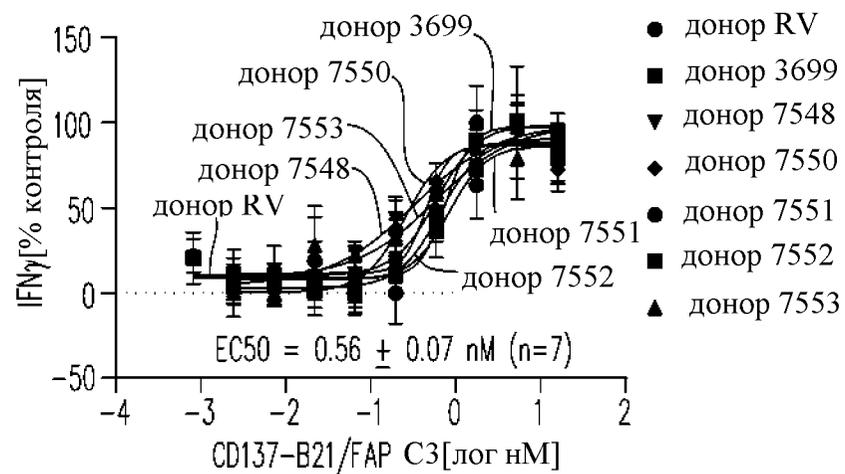
ФИГ. 14З

РВМС человека + НТ1080 (FAP негат.)

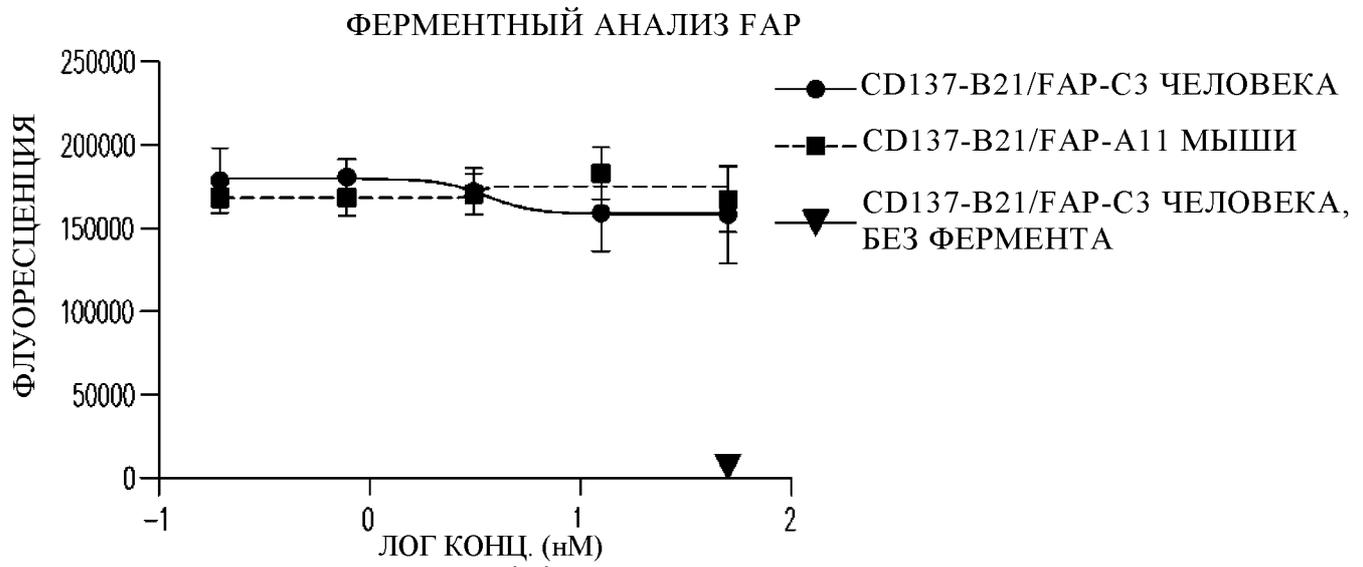
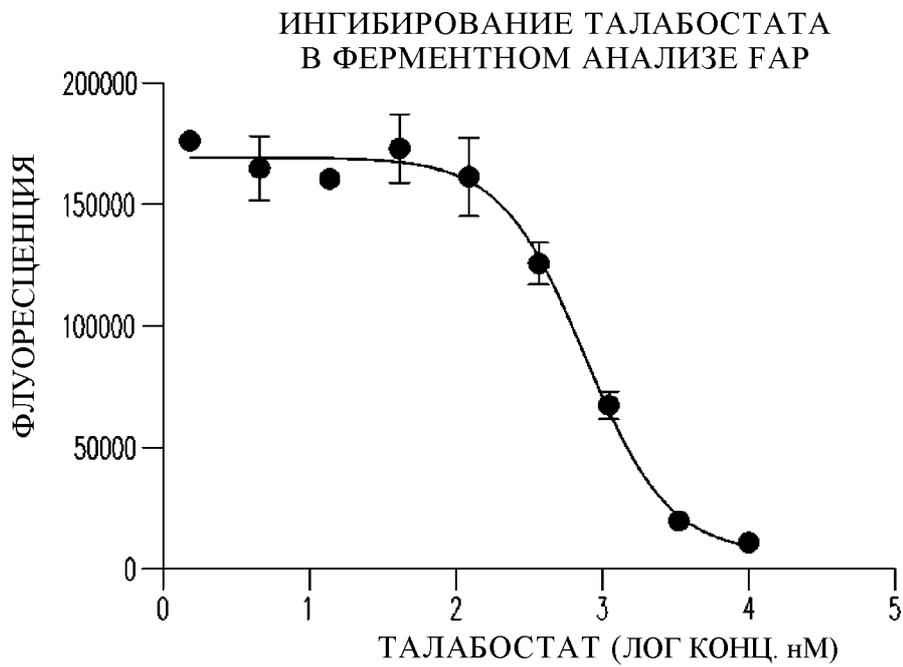


ФИГ. 15А

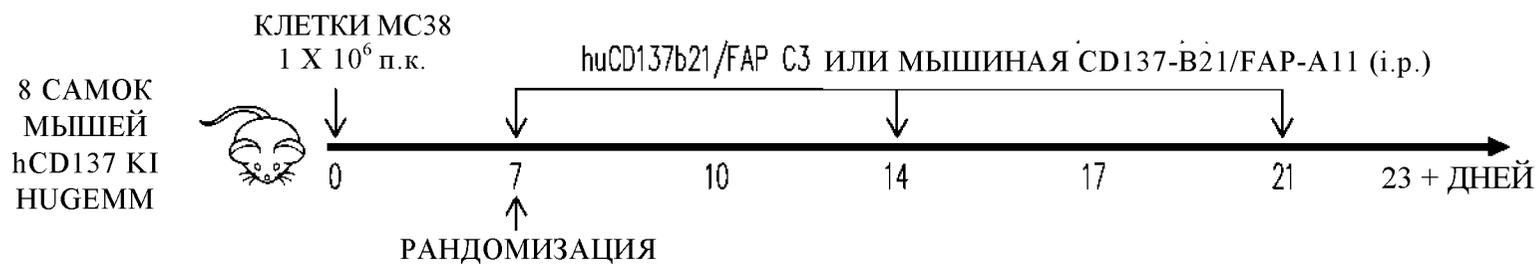
РВМС человека + НТ1080-FAP (FAP позит.)



ФИГ. 15Б

**ФИГ. 16А****ФИГ. 16Б**

МЫШИНАЯ МОДЕЛЬ: ПОДКОЖНАЯ СИНГЕННАЯ МОДЕЛЬ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА MC38 У МЫШЕЙ CD137 KI HUGEMM™



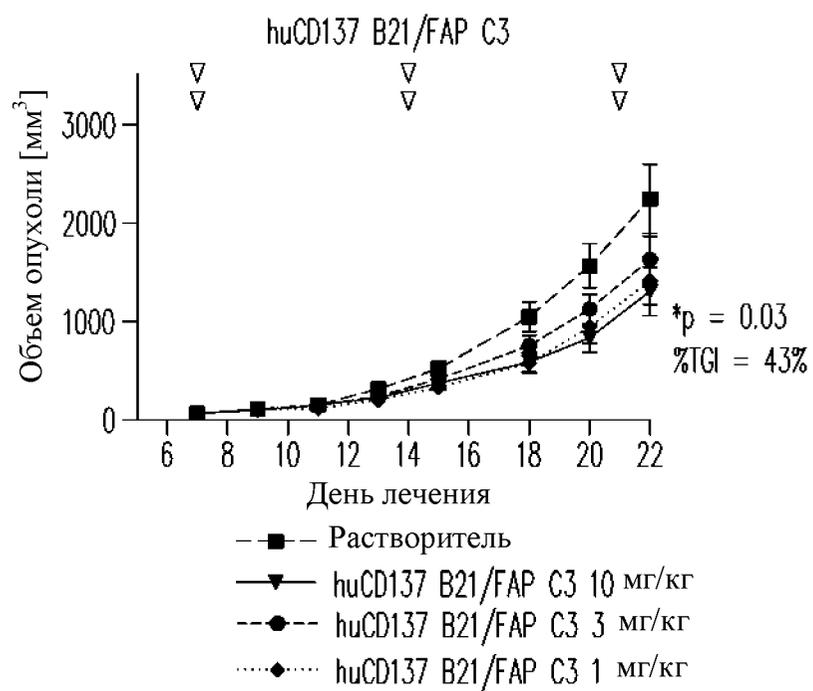
СОЕДИНЕНИЯ:

- huCD137 B21/FAP C3 или
- МЫШИНАЯ CD137-B21/FAP-A11

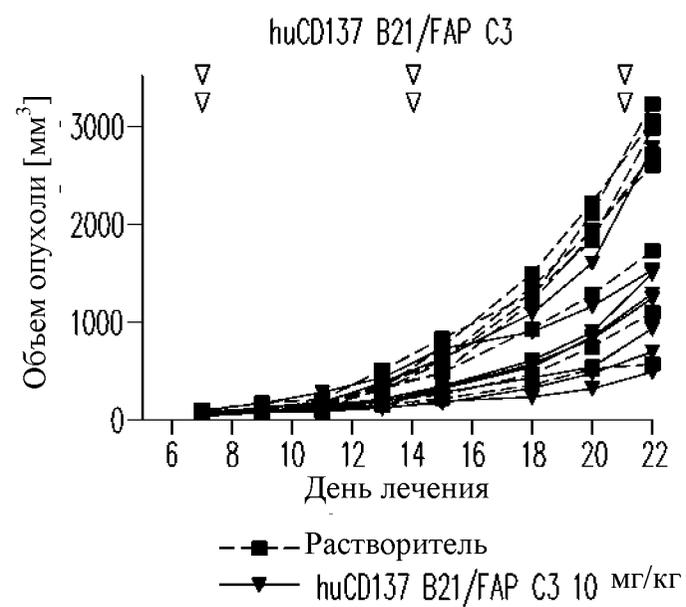
ДАННЫЕ:

- ОБЪЕМ ОПУХОЛИ
- CD3+ или CD8+ Т-КЛЕТОЧНЫЙ ИНФИЛЬТРАТ

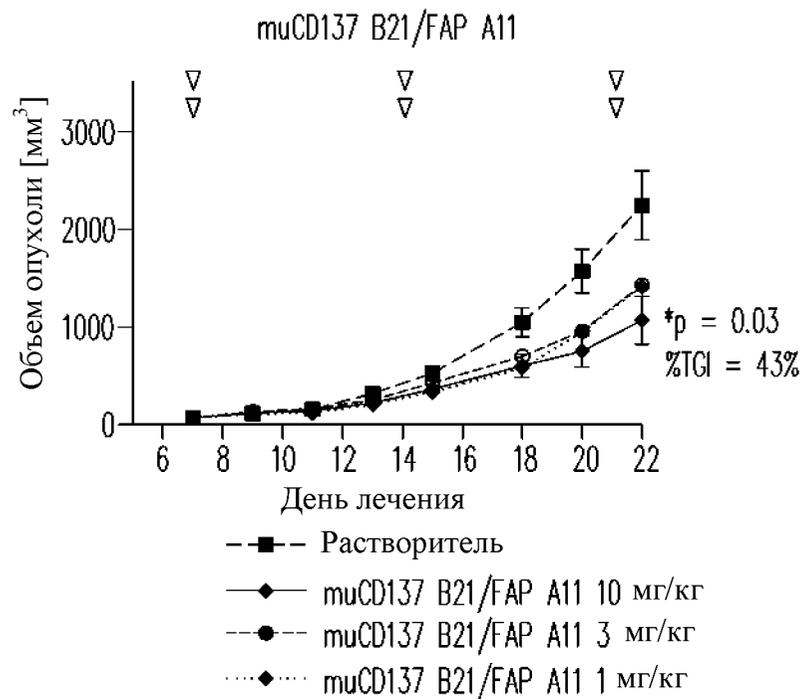
ФИГ. 17



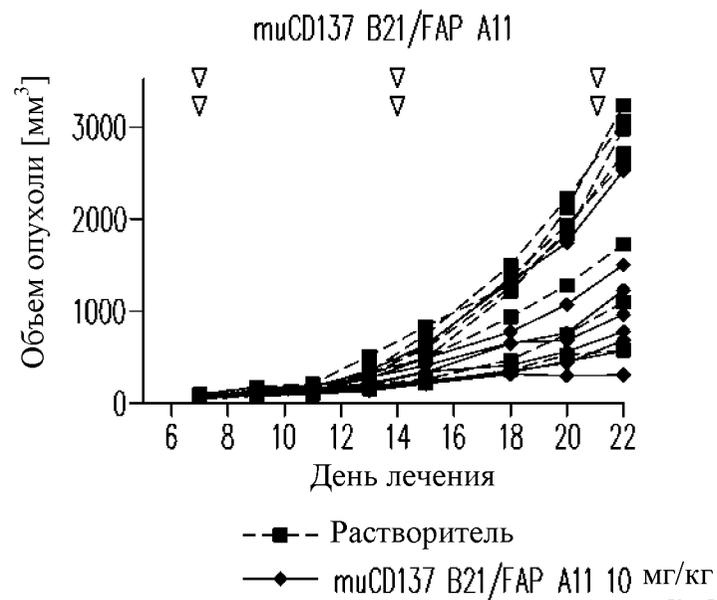
ФИГ. 18А



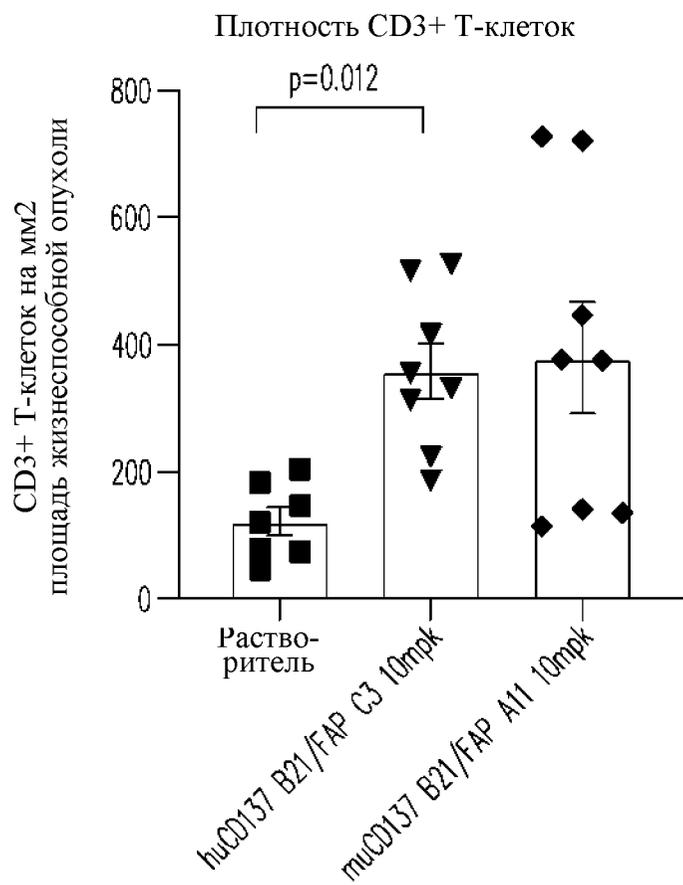
ФИГ. 18Б



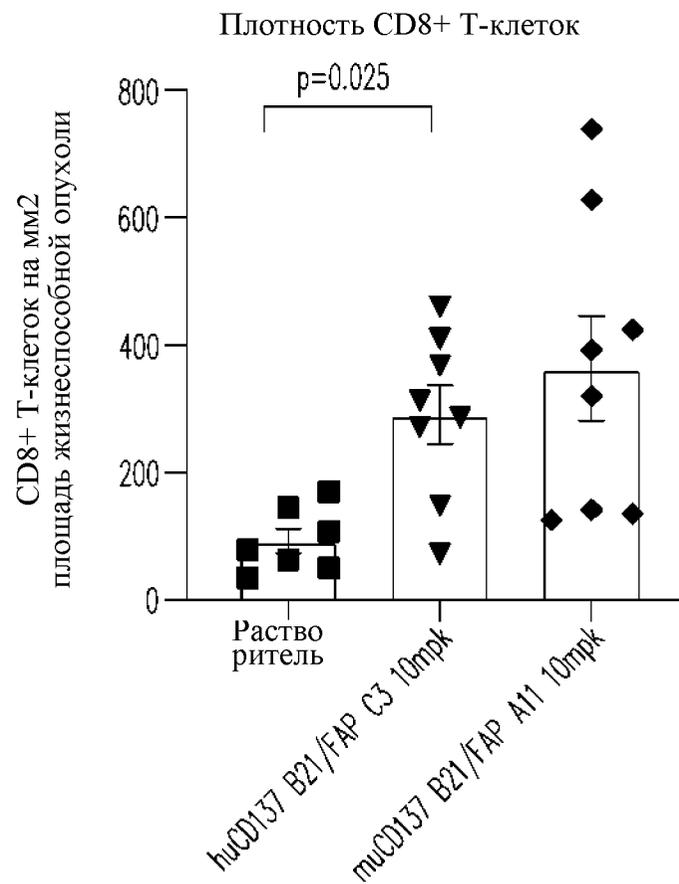
ФИГ. 18В



ФИГ. 18Г

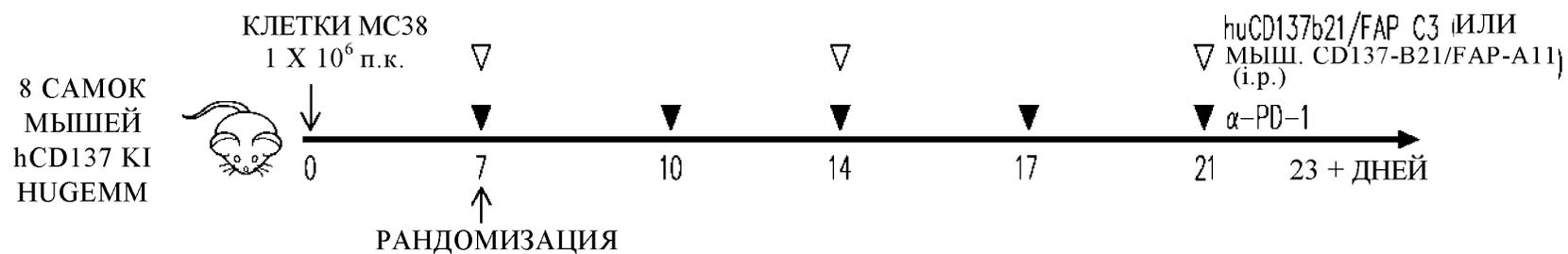


ФИГ. 19А



ФИГ. 19Б

**МЫШИНАЯ МОДЕЛЬ: ПОДКОЖНАЯ СИНГЕННАЯ МОДЕЛЬ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА MC38 У
МЫШЕЙ CD137 KI HUGEMM™**

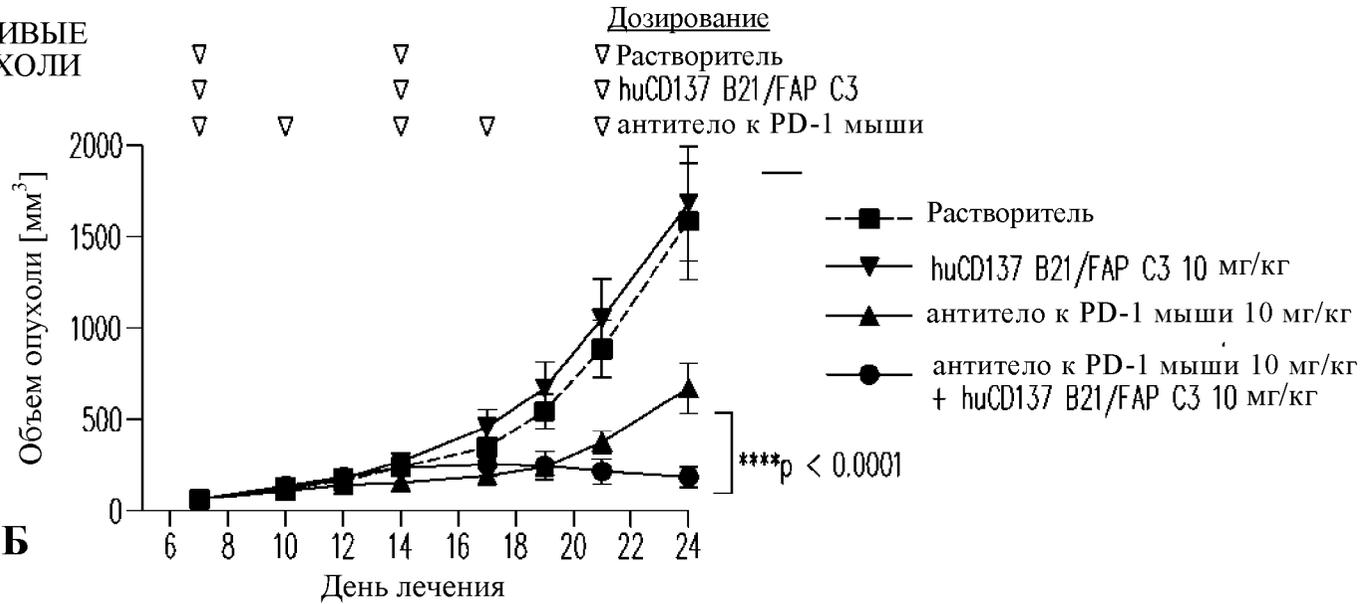


СОЕДИНЕНИЯ:

- huCD137 B21/FAP C3 или
- МЫШИНАЯ CD137-B21/FAP-A11
- АНТИТЕЛО К PD-1 МЫШИ (КЛОН RMP 1-14)

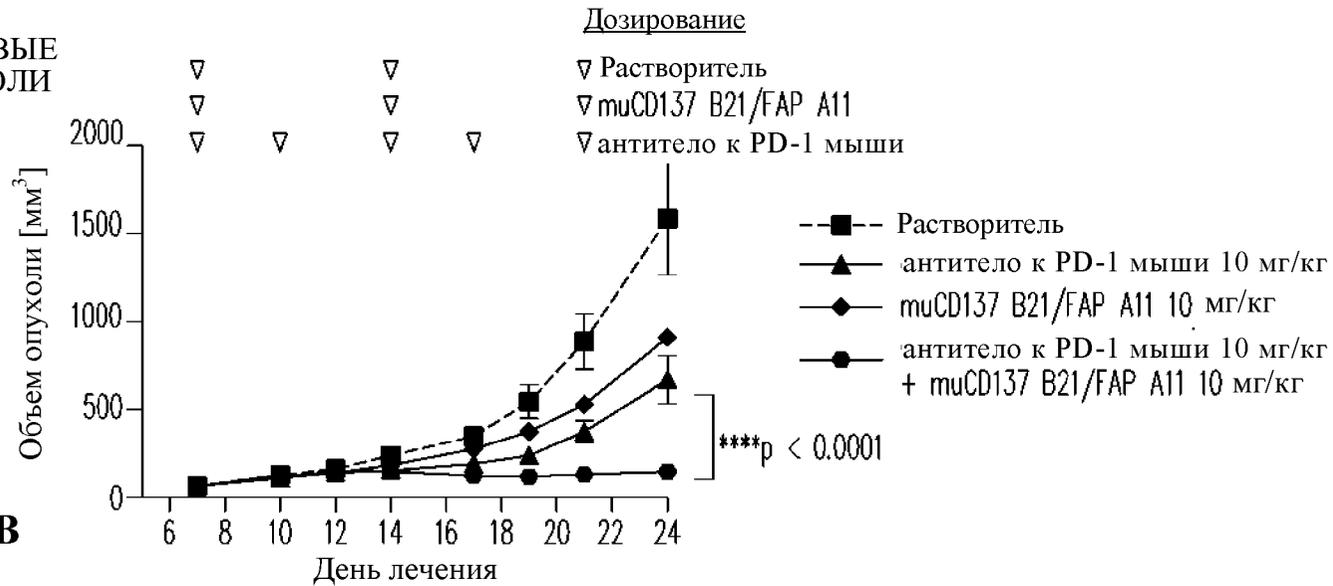
ФИГ. 20А

СРЕДНИЕ КРИВЫЕ
РОСТА ОПУХОЛИ

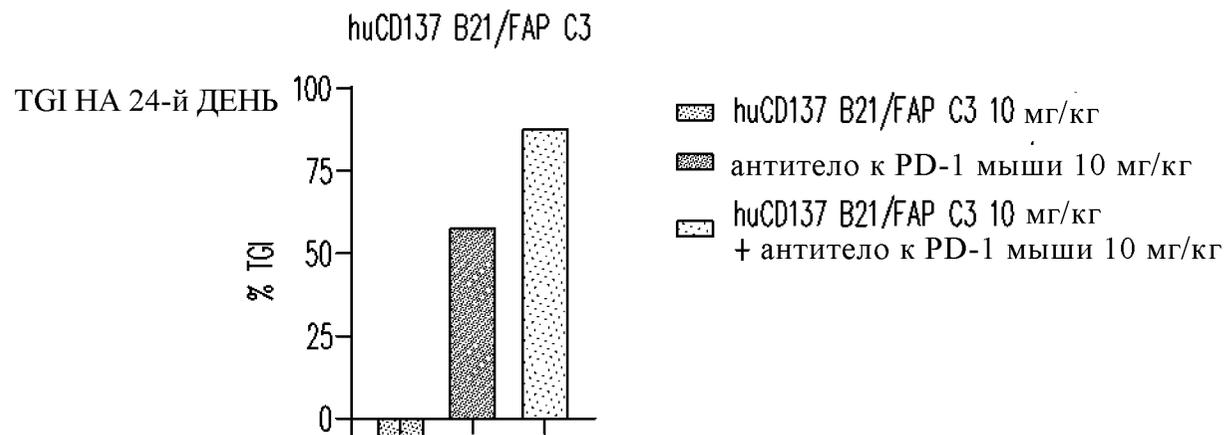


ФИГ. 20Б

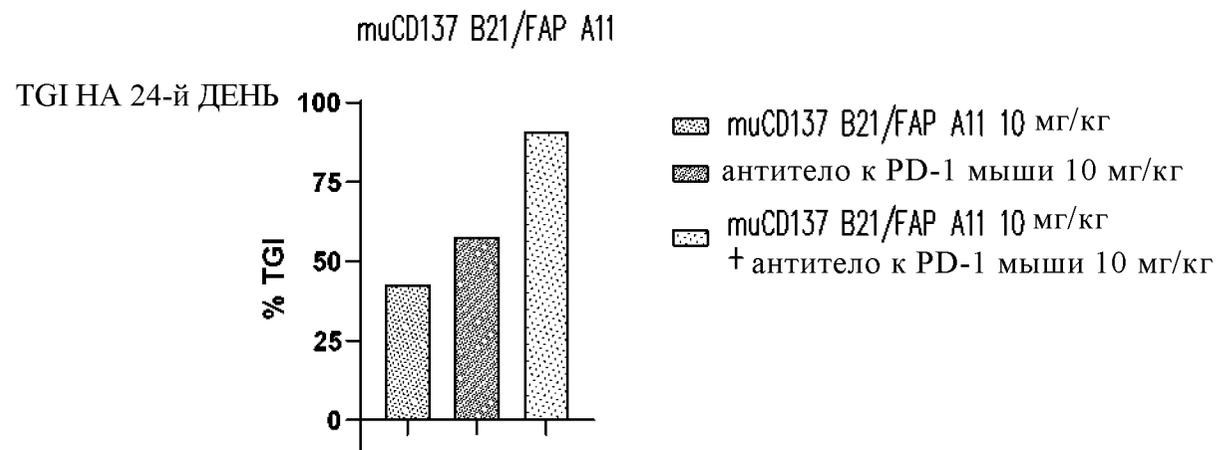
СРЕДНИЕ КРИВЫЕ
РОСТА ОПУХОЛИ



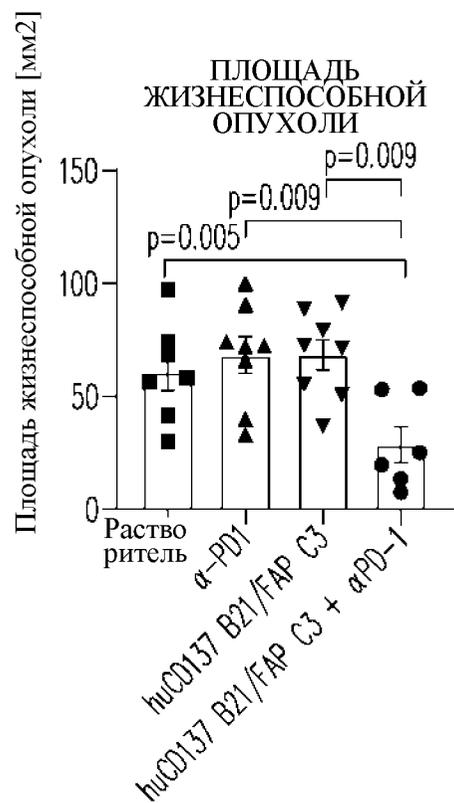
ФИГ. 20В



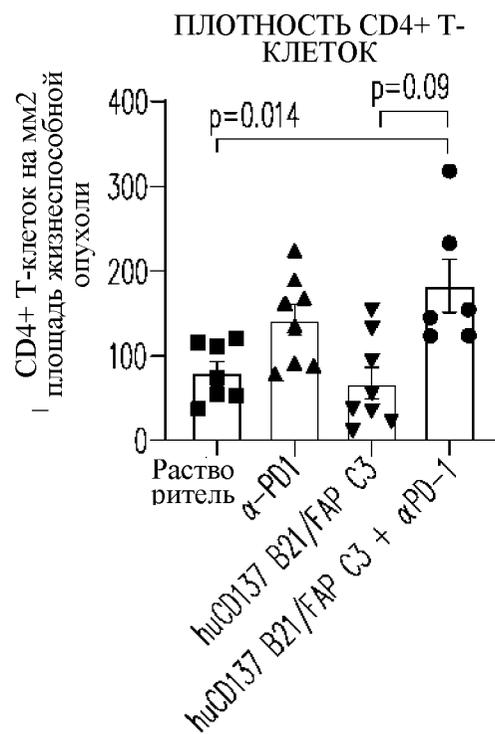
ФИГ. 20Г



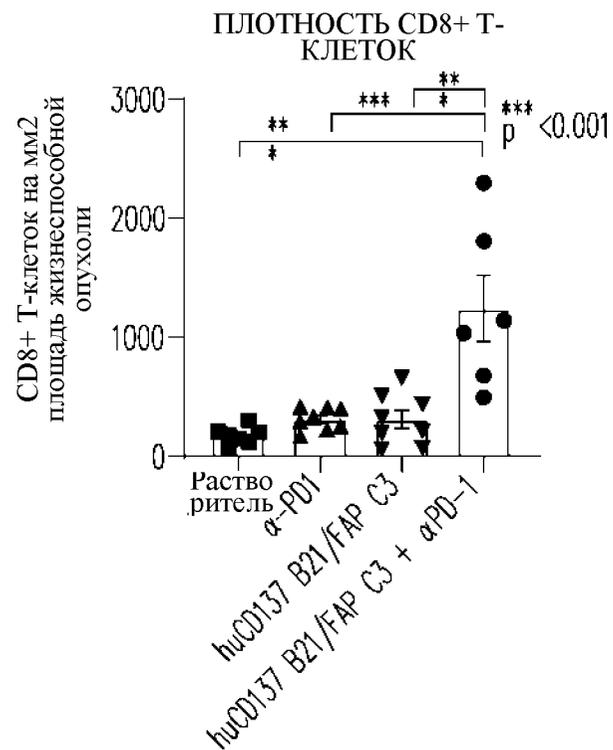
ФИГ. 20Д



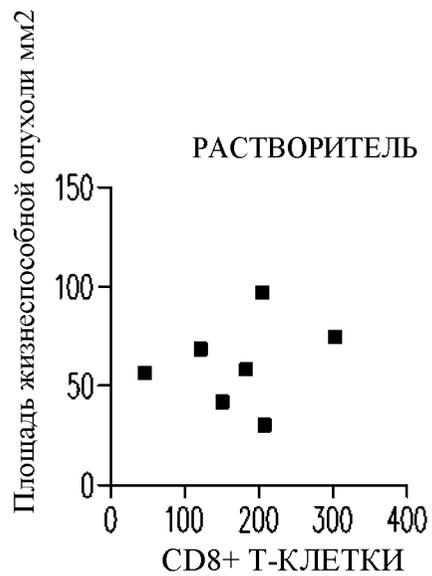
ФИГ. 21А



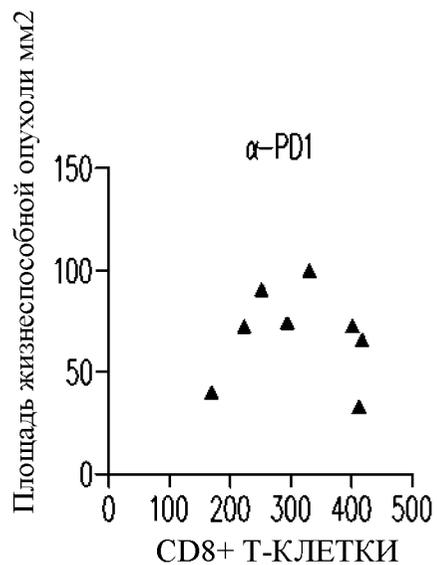
ФИГ. 21Б



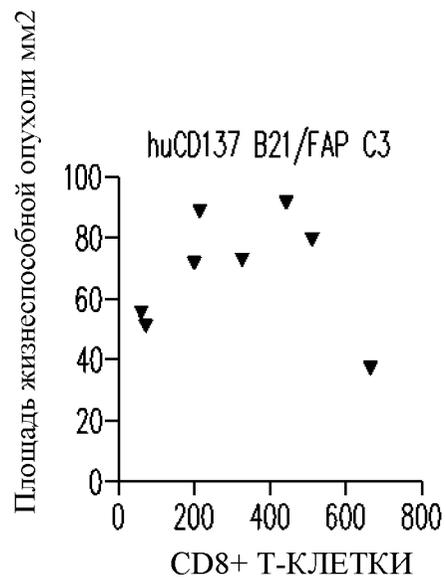
ФИГ. 21В



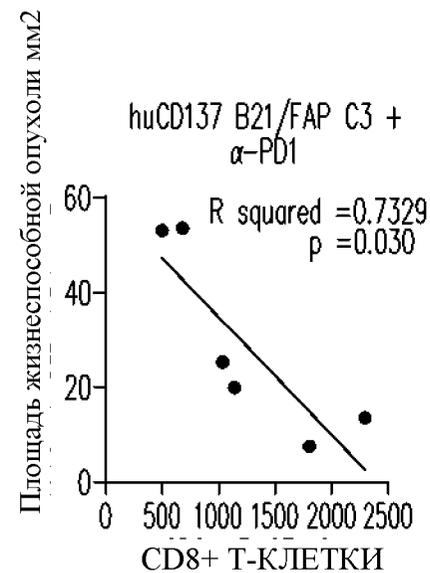
ФИГ. 21Г



ФИГ. 21Д



ФИГ. 21Е



ФИГ. 21Ж