

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390621** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.07.24**

(51) Int. Cl. **G01N 33/542** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**G01N 33/566** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2021.09.28**

---

(54) **СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ИЛИ КЛАСТЕРИЗАЦИИ ГРУППИРОВОК  
КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ**

---

(31) **2026558**

(32) **2020.09.28**

(33) **NL**

(86) **PCT/EP2021/076688**

(87) **WO 2022/064068 2022.03.31**

(71) Заявитель:

**МЕРУС Н.В. (NL)**

(72) Изобретатель:

**Гёин Сесилия Анна Вильгельмина  
(NL)**

(74) Представитель:

**Нилова М.И. (RU)**

(57) В соответствии с настоящим изобретением предложен способ обнаружения и/или количественной оценки экспрессии по меньшей мере первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности в образце из организма пациента, и способ обнаружения и/или количественной оценки кластеризации по меньшей мере первой группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности в образце, где указанный образец приводят в контакт с молекулой, способной специфично связываться с указанными по меньшей мере первой и второй группировками клеточной поверхности. Настоящее изобретение дополнительно относится к способу прогнозирования чувствительности субъекта к такой связывающей молекуле, способ определения эффективности такой связывающей молекулы, способ подтверждения механизма действия такой связывающей молекулы, способ лечения субъекта и способ скрининга одного или более исследуемых агентов на способность вызывать кластеризацию первой группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности.

**A1**

**202390621**

**202390621**

**A1**

# СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ИЛИ КЛАСТЕРИЗАЦИИ ГРУППИРОВОК КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5

Настоящее изобретение относится к способу обнаружения и/или количественной оценки экспрессии, или кластеризации, по меньшей мере первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности, предпочтительно в образце опухоли пациента. В некоторых вариантах реализации способы в соответствии с настоящим изобретением можно применять для прогнозирования того, принесет ли возможную пользу 10 пациенту терапия связывающим агентом, который связывает обе группировки клеточной поверхности, или для подтверждения механизма действия такого связывающего агента.

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

15

Разработка терапевтических антител для лечения рака быстро возросла за последние годы. Для различных типов рака применяются диагностические тесты, чтобы оценить, принесет ли пользу определенному пациенту лечение конкретным лекарственным средством, так что можно спрогнозировать, что оно, вероятно, будет безопасным и/или эффективным. 20 Одна категория диагностических тестов, которые применяются с использованием биологических препаратов или крупномолекулярных лекарственных средств, включает тестирование уровней экспрессии антигена, на который нацелен биологический препарат, в образце ткани пациента. Например, из опухоли пациента можно взять биопсию ткани и провести количественный анализ. Примеры такого количественного анализа включают 25 иммуногистохимию (ИГХ), анализ методом двойной гибридизации *in situ*, анализ методом хромогенной гибридизации *in situ* (CISH) и анализ методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

ИГХ представляет собой стандартный способ тестирования для оценки, например, экспрессии HER2, например, при раке молочной железы. При тестировании методом ИГХ 30 применяют специфические моноклональные или поликлональные антитела, которые связываются с белком HER2 клеточной поверхности. Добавление вторичного меченого антитела, обладающего репортерной функцией, с последующей ферментативной реакцией приводит к генерированию сигнала, который пропорционален присутствующему количеству

белка HER2. Тем не менее, несмотря на руководства по профилированию и оценке уровней экспрессии после ИГХ, межлабораторную вариабельность невозможно полностью предотвратить.

В анализе методами FISH, CISH и усиленной серебром гибридизации *in situ* определяют  
5 число копий генов на клетку, применяя методику с одним или двумя зондами. FISH стал широко используемой платформой, например, для тестирования HER2. Тем не менее, анализ FISH дорогостоящий, трудоемкий и требует флуоресцентной микроскопии и повышенной квалификации. Анализ методом светлопольной гибридизации *in situ*, такой как CISH и усиленная серебром гибридизация *in situ*, не требует флуоресцентной микроскопии и менее  
10 дорогостоящий.

Другой разработкой является анализ, который был одобрен как способ измерения, например, экспрессии общего HER2, гомодимеров HER2 или p95HER2 при раке молочной железы, который представляет собой анализ на основе сближения, разработанный для определения экспрессии белка, димеризации белков и белок-белкового взаимодействия  
15 (подробно описан в Diagn Mol Pathol 2009;18:11–21; Shi et al.).

На сегодняшний день в данной области техники отсутствовал надежный способ демонстрации способности двух или более антигенов кластеризоваться в присутствии мультиспецифического агента, причем такие антигены обычно не соединяются в соматических условиях. В данной заявке авторы настоящего изобретения демонстрируют такой анализ и  
20 примеры его применения.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения разработали анализ для обнаружения и  
25 количественной оценки уровней экспрессии CD137 - группировки клеточной поверхности, экспрессируемой на Т-клетках, и PD-L1 - группировки клеточной поверхности, экспрессируемой на опухолевых клетках. Это позволит спрогнозировать, будет ли конкретный пациент склонен ответить на лечение и получить пользу от лечения, связывающего данные две группировки клеточной поверхности. В некоторых вариантах реализации можно применять  
30 другие пригодные способы, которые, подобно анализу, применяемому в данной заявке, основаны на измерении сигнала, который генерируется, когда две группировки клеточной поверхности присутствуют в одном и том же образце. В этом контексте, сигналом может быть

присутствие или отсутствие сигнала. В некоторых вариантах реализации оба таких считывания дают информацию об уровнях экспрессии группировок клеточной поверхности. Также указанный способ можно применять для обнаружения и/или количественной оценки уровней экспрессии любых двух или более группировок клеточной поверхности, которые могут быть  
5 связаны определенным лекарственным средством, таким как, например, мультиспецифический агент, такой как биспецифическое или триспецифическое антитело.

Авторы настоящего изобретения дополнительно разработали анализ, применяемый для обнаружения и количественной оценки кластеризации CD137, и CD137 с PD-L1. CD137 и PD-L1 не образуют когнатную пару рецептор-лиганд, они в природе не кластеризуются и не  
10 участвуют в непосредственном белок-белковом взаимодействии. Тем не менее, при нацеливании на них лекарственного средства, которое одновременно связывается с обеими группировками клеточной поверхности, такого как, например, мультиспецифический агент, такой как биспецифическое или триспецифическое антитело, эти две группировки клеточной поверхности оказываются вблизи друг от друга, тем самым генерируя сигнал, который можно  
15 обнаруживать. Аналогично, при нацеливании на них поливалентного лекарственного средства, которое связывается с по меньшей мере двумя из указанных группировок клеточной поверхности, такого как, например, моноспецифический, бивалентный агент, такой как моноспецифическое антитело, или мультиспецифический агент, такой как биспецифическое или триспецифическое антитело, указанные по меньшей мере две группировки клеточной  
20 поверхности оказываются вблизи друг от друга, тем самым генерируя сигнал, который можно обнаруживать.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложено терапевтическое применение мультиспецифического агента, такого как би- или триспецифическое антитело, который одновременно связывается с двумя или более  
25 антигенами-мишенями на поверхности опухолевых клеток и/или клеток иммунной системы. Указанный мультиспецифический агент сразу вызывает кластеризацию двух или более антигенов-мишеней. Кластеризация двух или более антигенов, следовательно, происходит только в присутствии мультиспецифического агента, или происходит на повышенном уровне по сравнению с таковым в отсутствие мультиспецифического агента.

В некоторых вариантах реализации это позволяет оценить, действительно ли лекарственное средство, которым лечат пациента, связывает две указанные группировки  
30 клеточной поверхности одновременно и проявляет ожидаемый механизм действия. В

некоторых вариантах реализации можно применять другие пригодные способы, которые, подобно анализу, применяемому здесь, основаны на измерении сигнала, который генерируется, когда две группировки клеточной поверхности находятся в непосредственной близости. В этом контексте, сигналом может быть присутствие или отсутствие репортера или признака анализа. В некоторых вариантах реализации оба таких считывания (присутствие или утрата репортера) дают информацию о близости группировок клеточной поверхности. Также указанный способ можно применять для обнаружения и/или количественной оценки кластеризации любых двух или более группировок клеточной поверхности, которые могут быть одновременно связаны определенным лекарственным средством, таким как, например, мультиспецифический агент, такой как биспецифическое или триспецифическое антитело.

В некоторых вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложен способ обнаружения и/или количественной оценки присутствия в образце кластеризации по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности, включающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, причем указанный способ включает:

приведение в контакт образца, в котором указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности были приведены в контакт с агентом, способным специфично связываться с по меньшей мере указанными первой и второй группировками клеточной поверхности, с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, и второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, причем указанная по меньшей мере одна из первой связывающей молекулы и второй связывающей молекулы содержит молекулярную метку, которая не обнаруживается, если указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности не находятся вблизи друг от друга; и

обнаружение присутствия или отсутствия молекулярной метки для обнаружения присутствия в образце кластеризации первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности.

В соответствии с настоящим изобретением также предложен способ обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности, включающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, указанный способ включает:

приведение в контакт образца биопсии опухоли из организма субъекта, имеющего рак, с по меньшей мере одной связывающей молекулой, которая обнаруживает первую группировку клеточной поверхности, и с по меньшей мере одной связывающей молекулой, которая обнаруживает вторую группировку клеточной поверхности,

5 где по меньшей мере одна связывающая молекула, которая обнаруживает указанную первую группировку клеточной поверхности, и по меньшей мере одна связывающая молекула, которая обнаруживает указанную вторую группировку клеточной поверхности, содержат молекулярную метку;

и

10 обнаружение и/или количественную оценку присутствия или отсутствия указанных молекулярных меток для обнаружения экспрессии первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности в образце.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу прогнозирования способности субъекта, в частности, имеющего рак пациента, отвечать на агент или агенты, связывающие первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, в частности, группировку, экспрессируемую на иммунной эффекторной клетке, и группировку, экспрессируемую на клетке опухоли, причем указанный способ включает:

15 - обнаружение и/или количественную оценку уровней экспрессии первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности в биологическом образце из организма субъекта;

20 - определение того, являются ли уровни экспрессии первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности в образце из организма субъекта более высокими или более низкими, чем пороговый уровень; и

25 - прогнозирование того, что субъект вероятно ответит на агент или агенты, связывающие первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, если уровни экспрессии первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности в образце из организма субъекта равны или выше порогового уровня.

30 Настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения нуждающегося в этом субъекта, имеющего рак, причем указанный способ включает:

- прогнозирование способности субъекта, в частности, имеющего рак субъекта, отвечать на агент или агенты, связывающие первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, описанные в данной заявке; и

5 - введение агента или агентов, связывающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, субъекту, который вероятно ответит на них.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу определения эффективности агента, указанный агент содержит связывающую молекулу, которая содержит по меньшей мере связывающий домен, который специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, и связывающий домен, который специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, причем указанный способ включает обнаружение и/или количественную оценку кластеризации первой группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности в биологическом образце из организма субъекта, проходящего лечение агентом, описанным в данной заявке.

15 Настоящее изобретение дополнительно относится к способу подтверждения механизма действия агента, где указанный агент содержит связывающую молекулу, которая содержит по меньшей мере связывающий домен, который специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, и связывающий домен, который специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, причем указанный способ включает обнаружение и/или количественную оценку кластеризации первой группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности в биологическом образце из организма субъекта, проходящего лечение агентом, описанным в данной заявке.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения нуждающегося в этом субъекта, в частности, имеющего рак субъекта, причем указанный способ включает:

25 - лечение нуждающегося в этом субъекта агентом, связывающим первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности;

- анализ эффективности агента или механизма действия агента, описанных в данной заявке.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу скрининга одного или более исследуемых агентов на способность вызывать кластеризацию первой группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности, причем указанный способ включает:

- приведение в контакт одной или более исследуемых культур клеток с исследуемым агентом,

где исследуемая культура клеток содержит клетку, экспрессирующую первую группировку клеточной поверхности, и клетку, экспрессирующую вторую группировку клеточной поверхности;

- обнаружение уровня кластеризации указанных первой и второй группировок клеточной поверхности, описанных в данной заявке; и

сравнение указанного уровня кластеризации с уровнем кластеризации, обнаруживаемом для кластеризации в контрольной культуре клеток, которую не приводили в контакт с исследуемым агентом или приводили в контакт с контрольным агентом,

причем контрольная культура клеток содержит первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

**Фигура 1.** Схематическое представление концепции анализа VeraTag®, применяемого в соответствии с некоторыми вариантами реализации настоящего изобретения. В формате анализа VeraTag® в этом представлении используется два первичных антитела, которые связывают один или два определенных антигена, одно из указанных первичных антител содержит метку, а другое - индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц). Фотоактивация высвобождает индуцирующую расщепление группировку из одного из антител, после чего индуцирующая расщепление молекула вызывает отщепление метки от другого антитела. Генерируемый меткой сигнал затем измеряют с помощью капиллярного электрофореза (КЭ).

Описание, представленное в настоящей заявке, тем не менее, не ограничено форматом анализа, представленным на этой фигуре.

**Фигура 2.** Схематическое представление примера формата анализа VeraTag® с применением первичных антител. В этом представлении указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности представляют собой различные группировки клеточной поверхности. В соответствии с настоящим изобретением, тем не менее, также предложены варианты реализации, в которых указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности одинаковы.





связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), и где указанная третья связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная четвертая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц).

5           **Фигура 3.** Схематическое представление примера формата анализа VegaTag® с применением двух первичных антител и вторичного антитела для каждой мишени. В этом представлении указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности представляют собой различные группировки клеточной поверхности. В соответствии с настоящим изобретением, тем не менее, также предложены варианты реализации, в которых указанные  
10           первая и вторая группировки клеточной поверхности одинаковы.

          А) первая и вторая связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третья и четвертая связывающие молекулы, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятая связывающая молекула и шестая связывающая молекула,

15           где указанные первая и третья связывающие молекулы содержат первую и вторую молекулярные метки, соответственно, присоединенные к ним расщепляемым линкером, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и  
20           содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц);

          В) первая и вторая связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третья и четвертая связывающие молекулы, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятая связывающая молекула и шестая связывающая молекула,

25           где указанные вторая и четвертая связывающие молекулы содержат первую и вторую молекулярные метки, соответственно, присоединенные к ним расщепляемым линкером, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и  
30           содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц);

          С) первая и вторая связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третья и четвертая связывающие

молекулы, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятая связывающая молекула и шестая связывающая молекула,

где указанные первая и третья связывающие молекулы содержат индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером;

D) первая и вторая связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третья и четвертая связывающие молекулы, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятая связывающая молекула и шестая связывающая молекула,

где указанные вторая и четвертая связывающие молекулы содержат индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером;

E) первая и вторая связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третья и четвертая связывающие молекулы, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятая связывающая молекула и шестая связывающая молекула,

где указанная первая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная четвертая связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц);

F) первая и вторая связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третья и четвертая связывающие

молекулы, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятая связывающая молекула и шестая связывающая молекула,

где указанная первая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная третья связывающая молекула  
5 содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером;

10 G) первая и вторая связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третья и четвертая связывающие молекулы, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятая связывающая молекула и шестая связывающая молекула,

15 где указанная первая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная четвертая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит вторую  
20 молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером;

H) первая и вторая связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третья и четвертая связывающие молекулы, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятая связывающая молекула и шестая связывающая молекула,

25 где указанная вторая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная третья связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), и указанная  
30 шестая связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц);

И) первая и вторая связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третья и четвертая связывающие молекулы, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятая связывающая молекула и шестая связывающая молекула,

5 где указанная вторая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная третья связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), и указанная шестая связывающая  
10 молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером;

Ж) первая и вторая связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третья и четвертая связывающие молекулы, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на  
15 клеточной поверхности, пятая связывающая молекула и шестая связывающая молекула,

где указанная вторая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная четвертая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит  
20 индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером;

К) первая и вторая связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третья и четвертая связывающие  
25 молекулы, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятая связывающая молекула и шестая связывающая молекула,

где указанная первая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), указанная третья связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная пятая  
30 связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная

шестая связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц);

L) первая и вторая связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третья и четвертая связывающие молекулы, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятая связывающая молекула и шестая связывающая молекула,

где указанная первая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), указанная четвертая связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц);

M) первая и вторая связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третья и четвертая связывающие молекулы, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятая связывающая молекула и шестая связывающая молекула,

где указанная первая связывающая молекула и четвертая связывающая молекула содержат индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером;

N) первая и вторая связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третья и четвертая связывающие молекулы, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятая связывающая молекула и шестая связывающая молекула,

где указанная вторая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), указанная третья связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная

шестая связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц);

О) первая и вторая связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третья и четвертая связывающие молекулы, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на

клеточной поверхности, пятая связывающая молекула и шестая связывающая молекула, где указанная вторая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), указанная четвертая связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная пятая

связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц);

Р) первая и вторая связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третья и четвертая связывающие молекулы, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятая связывающая молекула и шестая связывающая молекула, где указанные вторая и третья связывающие молекулы содержат индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), указанная пятая связывающая молекула связывается

с указанной первой связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером.

**Фигура 4.** Схематическое представление примера формата анализа VeraTag® с применением двух первичных антител и двух вторичных антител для каждой мишени. В этом представлении указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности представляют собой различные группировки клеточной поверхности. В соответствии с настоящим изобретением, тем не менее, также предложены варианты реализации, в которых указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности одинаковы.

А) первая и вторая связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третья и четвертая связывающие молекулы, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на

клеточной поверхности, пятая связывающая молекула, шестая связывающая молекула, седьмая связывающая молекула и восьмая связывающая молекула,

где указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней  
5 расщепляемым линкером, указанная седьмая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней  
10 расщепляемым линкером, и восьмая связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц);

В) первая и вторая связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третья и четвертая связывающие молекулы, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на  
15 клеточной поверхности, пятая связывающая молекула, шестая связывающая молекула, седьмая связывающая молекула и восьмая связывающая молекула,

где указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), седьмая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей  
20 молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), и восьмая связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым  
25 линкером;

С) первая и вторая связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третья и четвертая связывающие молекулы, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на  
клеточной поверхности, пятая связывающая молекула, шестая связывающая молекула,  
30 седьмая связывающая молекула и восьмая связывающая молекула,

где указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней



расщепляемым линкером, указанная седьмая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), и восьмая связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером;

Д) первая и вторая связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третья и четвертая связывающие молекулы, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятая связывающая молекула, шестая связывающая молекула, седьмая связывающая молекула и восьмая связывающая молекула,

где указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц), седьмая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и восьмая связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц).

**Фигура 5.** Схематическое представление примера формата анализа VeraTag® с применением одного первичного антитела для каждой мишени и одного вторичного антитела против одного из указанных первичных антител. В этом формате используется опосредованное ДТТ высвобождение молекулярной метки. В этом представлении указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности представляют собой различные группировки клеточной поверхности. В соответствии с настоящим изобретением, тем не менее, также предложены варианты реализации, в которых указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности одинаковы.

А) первая связывающая молекула, которая специфично связывается с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, вторая связывающая молекула, которая специфично связывается со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной

поверхности, и третья связывающая молекула, которая связывается с указанной первой связывающей молекулой,

где указанная вторая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером; и где указанная третья связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером;

В) первая связывающая молекула, которая специфично связывается с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, вторая связывающая молекула, которая специфично связывается со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, и третья связывающая молекула, которая связывается с указанной второй связывающей молекулой,

где указанная первая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером; и где указанная третья связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером.

**Фигура 6.** Схематическое представление примера формата анализа VeraTag® с применением одного первичного антитела для каждой мишени для обнаружения и/или количественной оценки кластеризации мишеней. В этом представлении указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности представляют собой различные группировки клеточной поверхности, экспрессируемые на различных клетках. В соответствии с настоящим изобретением, тем не менее, также предложены варианты реализации, в которых указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности присутствуют на одной и той же клетке. Также в этом представлении молекула, которая способна специфично связываться с указанными первой и второй группировками клеточной поверхности, представляет собой бивалентное биспецифическое антитело. Тем не менее, в объем настоящего изобретения также входит случай, в котором молекула, которая способна специфично связываться с указанными группировками клеточной поверхности, представляет собой поливалентное биспецифическое антитело или мультиспецифическое, например, триспецифическое или тетраспецифическое, антитело.

А) биспецифическое антитело (100), связывающее первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, тем самым приводя указанные первую и вторую группировки клеточной поверхности в непосредственную близость друг к

другу; первая связывающая молекула, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, и вторая связывающая молекула, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности,

5 где указанная первая связывающая молекула содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная вторая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц);

В) биспецифическое антитело (100), связывающее первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, тем самым приводя указанные первую и вторую группировки клеточной поверхности в непосредственную близость друг к другу; первая связывающая молекула, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, и вторая связывающая молекула, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности,

10 где указанная вторая связывающая молекула содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная первая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку.

**Фигура 7.** Схематическое представление примера формата анализа VeraTag® с применением одного первичного антитела для каждой мишени и вторичного антитела против одного из указанных первичных антител для обнаружения и/или количественной оценки кластеризации мишеней. В этом представлении указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности представляют собой различные группировки клеточной поверхности, экспрессируемые на различных клетках. В соответствии с настоящим изобретением, тем не менее, также предложены варианты реализации, в которых указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности присутствуют на одной и той же клетке. Также в этом представлении молекула, которая способна специфично связываться с указанными первой и второй группировками клеточной поверхности, представляет собой бивалентное биспецифическое антитело. Тем не менее, в объем настоящего изобретения также входит случай, в котором молекула, которая способна специфично связываться с указанными группировками клеточной поверхности, представляет собой поливалентное биспецифическое антитело или мультиспецифическое, например, триспецифическое или тетраспецифическое, антитело.

30 А) биспецифическое антитело (100), связывающее первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, тем самым приводя указанные

первую и вторую группировки клеточной поверхности в непосредственную близость друг к другу; первая связывающая молекула, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, вторая связывающая молекула, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, и третья связывающая молекула, где указанная первая связывающая молекула содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная третья связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц);

В) биспецифическое антитело (100), связывающее первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, тем самым приводя указанные первую и вторую группировки клеточной поверхности в непосредственную близость друг к другу; первая связывающая молекула, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, вторая связывающая молекула, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, и третья связывающая молекула, где указанная вторая связывающая молекула содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная третья связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц);

С) биспецифическое антитело (100), связывающее первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, тем самым приводя указанные первую и вторую группировки клеточной поверхности в непосредственную близость друг к другу; первая связывающая молекула, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, вторая связывающая молекула, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, и третья связывающая молекула, где указанная первая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц) и указанная третья связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит молекулярную метку присоединенные к ним расщепляемым линкером;

Д) биспецифическое антитело (100), связывающее первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, тем самым приводя указанные первую и вторую группировки клеточной поверхности в непосредственную близость друг к другу; первая связывающая молекула, которая специфично связывается с первой

группировкой клеточной поверхности, вторая связывающая молекула, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, и третья связывающая молекула, где указанная вторая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц) и указанная третья связывающая молекула связывается с 5 указанной первой связывающей молекулой и содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером.

**Фигура 8.** Схематическое представление формата анализа VeraTag® с применением одного первичного антитела для каждой мишени и двух вторичных антител против указанного первичного антитела для обнаружения и/или количественной оценки кластеризации мишеней. 10 В этом представлении указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности представляют собой различные группировки клеточной поверхности, экспрессируемые на различных клетках. Тем не менее, в объем настоящего изобретения также входят случаи, когда указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности присутствуют на одной и той же клетке. Также в этом представлении молекула, которая способна специфично связываться с указанными первой и второй группировками клеточной поверхности, представляет собой 15 бивалентное биспецифическое антитело. Тем не менее, в объем настоящего изобретения также входит случай, в котором молекула, которая способна специфично связываться с указанными группировками клеточной поверхности, представляет собой поливалентное биспецифическое антитело или мультиспецифическое, например, триспецифическое или тетраспецифическое, 20 антитело.

А) биспецифическое антитело (100), связывающее первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, тем самым приводя указанные первую и вторую группировки клеточной поверхности в непосредственную близость друг к другу; первая связывающая молекула, которая специфично связывается с первой 25 группировкой клеточной поверхности, вторая связывающая молекула, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, третья связывающая молекула и четвертая связывающая молекула, где указанная третья связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная четвертая связывающая молекула связывается с 30 указанной второй связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц);

В) биспецифическое антитело (100), связывающее первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, тем самым приводя указанные первую и вторую группировки клеточной поверхности в непосредственную близость друг к другу; первая связывающая молекула, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, вторая связывающая молекула, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, третья связывающая молекула и четвертая связывающая молекула, где указанная третья связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку (знак ножниц); и указанная четвертая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером.

**Фигура 9.** На диаграмме показаны уровни экспрессии PD-L1 в виде относительной площади пика (RPA), измеренной с применением анализа VeraTag®. Образец А: осадок клеток, полученный путем инкубации с антителом положительного контроля против CD137; образец В: осадок клеток, полученный путем инкубации с биспецифическим антителом, связывающимся с CD137 и PD-L1; образец С: осадок клеток, полученный путем инкубации с антителом отрицательного контроля, связывающимся с RSV.

**Фигура 10.** На диаграммах показаны уровни экспрессии CD137 в виде относительной площади пика (RPA), измеренной с применением анализа VeraTag®. Слева: инкубация с анализируемым антителом против CD137 - BBK2; справа: инкубация с анализируемым антителом против CD137 - M127. Образец А: осадок клеток, полученный путем инкубации с антителом положительного контроля против CD137; образец В: осадок клеток, полученный путем инкубации с биспецифическим антителом, связывающимся с CD137 и PD-L1; образец С: осадок клеток, полученный путем инкубации с антителом отрицательного контроля, связывающимся с RSV.

**Фигура 11.** На диаграммах показана кластеризация CD137 в виде относительной площади пика (RPA), измеренной с применением анализа VeraTag®. Слева: инкубация с анализируемым антителом против CD137 - BBK2; справа: инкубация с анализируемым антителом против CD137 - M127. Образец А: осадок клеток, полученный путем инкубации с антителом отрицательного контроля, связывающимся с RSV; образец В: осадок клеток, полученный путем инкубации с биспецифическим антителом, связывающимся с CD137 и PD-

L1; образец С: осадок клеток, полученный путем инкубации с антителом положительного контроля против CD137.

**Фигура 12.** На диаграммах показана кластеризация PD-L1-CD137 в виде относительной площади пика (RPA), измеренной с применением анализа VeraTag®. Слева: инкубация с анализируемым антителом против CD137 - BBK2; справа: инкубация с анализируемым антителом против CD137 - M127. Образец А: осадок клеток, полученный путем инкубации с антителом отрицательного контроля, связывающимся с RSV; образец В: осадок клеток, полученный путем инкубации с биспецифическим антителом, связывающимся с CD137 и PD-L1; образец С: осадок клеток, полученный путем инкубации с антителом положительного контроля против CD137. Уровень кластеризации в этом анализе сравнивали с таковым, измеренным в эксперименте с изотипическим контролем (ITC).

**Фигура 13.** Схематическое представление: А – анализ, описанный в данной заявке, для обнаружения экспрессии рецептора (Антиген 1), присутствующего на мембране клетки; В – анализ сближения, описанный в данной заявке, для обнаружения кластеризации рецептора (Антиген 1) на одной той же клетке; и С – анализ сближения, описанный в данной заявке, для обнаружения кластеризации рецептора (Антиген 1) на одной клетке с рецептором (Антиген 2) на другой клетке, тем самым образующей иммунологический синапс.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце по меньшей мере первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности, причем указанный способ включает обнаружение сигнала, который генерируется, когда указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности экспрессируются в одном и том же образце. В некоторых вариантах реализации предпочтительно генерируются два различных сигнала, так что возможно количественно оценить экспрессию каждой группировки клеточной поверхности. В качестве альтернативы, в некоторых вариантах реализации генерирующие сигнал молекулы выбирают таким образом, что объединенный сигнал дает информацию об уровне экспрессии каждой группировки клеточной поверхности.

Сигнал может быть сгенерирован различными способами, включая, но не ограничиваясь перечисленными способами: предоставление указанных первой и второй

группировок клеточной поверхности с предпочтительно различными флуоресцентными молекулярными метками, предоставление указанных первой и второй группировок клеточной поверхности с предпочтительно различными хромогенными молекулярными метками, предоставление указанных первой и второй группировок клеточной поверхности с предпочтительно различными радиоактивными молекулярными метками; и предоставление указанных первой и второй группировок клеточной поверхности с предпочтительно различными молекулярными метками - хелаторами изотопно-чистых металлов. Другим способом, который можно применять, является гашение. В некоторых вариантах реализации предпочтительно применяют различные флуорофоры для каждой группировки клеточной поверхности, чтобы позволить измерение снижения интенсивности флуоресценции одного флуорофора или сигнала от излучающего сигнал агента, индуцированного взаимодействием со вторым гасителем.

Способ в соответствии с настоящим изобретением можно осуществить в различных форматах. В одном формате, в соответствии с настоящим изобретением предложен способ обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности, включающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, причем указанный способ включает:

а) приведение в контакт образца с по меньшей мере одной связывающей молекулой, которая обнаруживает первую группировку клеточной поверхности, и с по меньшей мере одной связывающей молекулой, которая обнаруживает вторую группировку клеточной поверхности,

где по меньшей мере одна связывающая молекула, которая обнаруживает указанную первую группировку клеточной поверхности, и по меньшей мере одна связывающая молекула, которая обнаруживает указанную вторую группировку клеточной поверхности, содержат молекулярную метку, необязательно при этом молекулярная метка, присоединенная к связывающей молекуле, которая обнаруживает указанную первую группировку клеточной поверхности, отлична от молекулярной метки, присоединенной к связывающей молекуле, которая обнаруживает указанную вторую группировку клеточной поверхности; и

б) обнаружение присутствия или отсутствия, или измерение количества, указанных молекулярных меток для обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности.



В другом формате, в соответствии с настоящим изобретением предложен способ обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности, включающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, причем указанный способ

5 включает:

а) приведение в контакт образца с по меньшей мере двумя связывающими молекулами, которые обнаруживают первую группировку клеточной поверхности, и по меньшей мере двумя связывающими молекулами, которые обнаруживают вторую группировку клеточной поверхности,

10 где одна из указанных связывающих молекул, которая обнаруживает указанную первую группировку клеточной поверхности, и одна из указанных связывающих молекул, которая обнаруживает указанную вторую группировку клеточной поверхности, содержат молекулярные метки, предпочтительно присоединенные к ним расщепляемым линкером, и необязательно где другая из связывающих молекул, которая обнаруживает указанную первую

15 группировку клеточной поверхности, и другая из связывающих молекул, которая обнаруживает указанную вторую группировку клеточной поверхности, содержат индуцирующую расщепление группировку;

б) необязательно индуцирование расщепления указанных молекулярных меток; и

20 в) обнаружение присутствия или отсутствия, или измерение количества, указанных молекулярных меток для обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности.

В некоторых вариантах реализации способ в соответствии с настоящим изобретением можно применять для измерения коэкспрессии по меньшей мере двух различных группировок клеточной поверхности в одном образце, предпочтительно в образце из организма пациента.

25 По этой причине, он особенно полезен для прогнозирования ответа пациента, предпочтительно имеющего рак пациента, на лечение агентом или агентами, которые связываются с указанными по меньшей мере двумя различными группировками клеточной поверхности. Примером такого агента является, например, мультиспецифическое антитело.

В некоторых вариантах реализации способ, применяемый в соответствии с настоящим изобретением, включает анализ VeraTag®. Анализ VeraTag® хорошо известен в данной

30 области техники и описан, например, в WO 2017/161030 и ссылочных материалах,

цитированных в указанном источнике, которые полностью включены в данную заявку посредством ссылки.

Анализ VeraTag® можно осуществить в различных форматах. Один формат представляет собой анализ сближения с применением двух первичных связывающих молекул для каждой группировки-мишени, где одна из указанных первичных молекул, связывающихся с каждой из группировок-мишеней, содержит молекулярную метку, а другая - индуцирующую расщепление группировку.

В одном варианте реализации настоящего изобретения, следовательно, предложен способ обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности, включающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, причем указанный способ включает:

а1) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, и третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности,

где указанная первая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная вторая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку, и где указанная третья связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная четвертая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку; или

а2) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, и третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности,

где указанная вторая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная первая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку, и где указанная четвертая связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная третья связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку; или

а3) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, и третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности,

5 где указанная первая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная вторая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку, и где указанная четвертая связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная третья связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку; или

а4) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, и третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности,

15 где указанная вторая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная первая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку, и где указанная третья связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная четвертая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку;

20 где молекулярная метка, присоединенная к связывающей молекуле, которая обнаруживает указанную первую группировку клеточной поверхности, отлична от молекулярной метки, присоединенной к связывающей молекуле, которая обнаруживает указанную вторую группировку клеточной поверхности;

25 b) индукция расщепления указанных первой и второй молекулярных меток; и

c) обнаружение присутствия или отсутствия высвобожденных первой и второй молекулярных меток для обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности.

30 Другой формат представляет собой анализ сближения с применением двух первичных связывающих молекул для каждой группировки-мишени и вторичной связывающей молекулы против одной из первичных связывающих молекул.

В одном варианте реализации настоящего изобретения, следовательно, предложен способ обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности, включающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, причем указанный способ

5 включает:

a1) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятой

10 связывающей молекулой и шестой связывающей молекулой,

где указанные первая и третья связывающие молекулы содержат первую и вторую молекулярные метки, соответственно, присоединенные к ним расщепляемым линкером, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку, и указанная шестая

15 связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку; или

a2) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично

20 связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятой связывающей молекулой и шестой связывающей молекулой,

где указанные вторая и четвертая связывающие молекулы содержат первую и вторую молекулярные метки, соответственно, присоединенные к ним расщепляемым линкером, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей

25 молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку, и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку; или

a3) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной

30 поверхности, третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятой связывающей молекулой и шестой связывающей молекулой,

где указанные первая и третья связывающие молекулы содержат индуцирующую расщепление группировку, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная шестая связывающая молекула связывается с  
5 указанной четвертой связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером; или

а4) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично  
10 связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятой связывающей молекулой и шестой связывающей молекулой,

где указанные вторая и четвертая связывающие молекулы содержат индуцирующую расщепление группировку, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой, и первая молекулярная метка присоединена к ней  
15 расщепляемым линкером, и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером; или

а5) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной  
20 поверхности, третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятой связывающей молекулой и шестой связывающей молекулой,

где указанная первая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная четвертая связывающая молекула  
25 содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку, и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку; или

а6) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной  
30 поверхности, третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично

связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятой связывающей молекулой и шестой связывающей молекулой,

где указанная первая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная третья связывающая молекула  
5 содержит индуцирующую расщепление группировку, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку, и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером; или

10 а7) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятой связывающей молекулой и шестой связывающей молекулой,

15 где указанная первая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная четвертая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку, и указанная шестая связывающая молекула связывается с  
20 указанной третьей связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером; или

а8) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной  
25 поверхности, третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятой связывающей молекулой и шестой связывающей молекулой,

где указанная вторая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная третья связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером,  
30 указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку, и указанная шестая

связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку; или

а9) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятой связывающей молекулой и шестой связывающей молекулой,

где указанная вторая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная третья связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку, и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером; или

а10) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятой связывающей молекулой и шестой связывающей молекулой,

где указанная вторая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная четвертая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку, и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером; или

а11) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятой связывающей молекулой и шестой связывающей молекулой,

где указанная первая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку, указанная третья связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку; или

a12) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятой связывающей молекулой и шестой связывающей молекулой,

где указанная первая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку, указанная четвертая связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку; или

a13) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятой связывающей молекулой и шестой связывающей молекулой,

где указанная первая связывающая молекула и четвертая связывающая молекула содержат индуцирующую расщепление группировку, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером; или

a14) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной



поверхности, третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятой связывающей молекулой и шестой связывающей молекулой,

5 где указанная вторая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку, указанная третья связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит  
10 индуцирующую расщепление группировку; или

a15) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятой  
15 связывающей молекулой и шестой связывающей молекулой,

где указанная вторая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку, указанная четвертая связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит первую  
20 молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку; или

a16) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной  
25 поверхности, третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятой связывающей молекулой и шестой связывающей молекулой,

где указанные вторая и третья связывающие молекулы содержат индуцирующую расщепление группировку, указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной  
30 первой связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная шестая связывающая молекула связывается с

указанной четвертой связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером;

где молекулярная метка, присоединенная к связывающей молекуле, которая обнаруживает указанную первую группировку клеточной поверхности, отлична от  
5 молекулярной метки, присоединенной к связывающей молекуле, которая обнаруживает указанную вторую группировку клеточной поверхности;

b) индукция расщепления указанных первой и второй молекулярных меток; и

c) обнаружение присутствия или отсутствия высвобожденных первой и второй молекулярных меток для обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце  
10 первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности.

Другой формат представляет собой анализ сближения с применением двух первичных связывающих молекул для каждой группировки-мишени и вторичных связывающих молекул против каждой из указанных первичных связывающих молекул, где одна из указанных вторичных связывающих молекул для каждой группировки-мишени содержит молекулярную  
15 метку и другую индуцирующую расщепление группировку.

В одном варианте реализации настоящего изобретения, следовательно, предложен способ обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности, включающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, причем указанный способ  
20 включает:

a1) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятой  
25 связывающей молекулой, шестой связывающей молекулой, седьмой связывающей молекулой и восьмой связывающей молекулой,

где указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная седьмая связывающая молекула связывается с указанной  
30 второй связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку, указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым

линкером, и восьмая связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку; или

а2) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятой связывающей молекулой, шестой связывающей молекулой, седьмой связывающей молекулой и восьмой связывающей молекулой,

где указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку, указанная седьмая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку, и указанная восьмая связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером; или

а3) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятой связывающей молекулой, шестой связывающей молекулой, седьмой связывающей молекулой и восьмой связывающей молекулой,

где указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная седьмая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку, указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку, и указанная восьмая связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером; или

а4) приведение в контакт образца с первой и второй связывающими молекулами, которые специфично связываются с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной

поверхности, третьей и четвертой связывающими молекулами, которые специфично связываются со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, пятой связывающей молекулой, шестой связывающей молекулой, седьмой связывающей молекулой и восьмой связывающей молекулой,

5 где указанная пятая связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку, указанная седьмая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, указанная шестая связывающая молекула связывается с указанной третьей связывающей  
10 молекулой и содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная восьмая связывающая молекула связывается с указанной четвертой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку;

где молекулярная метка, присоединенная к связывающей молекуле, которая обнаруживает указанную первую группировку клеточной поверхности, отлична от  
15 молекулярной метки, присоединенной к связывающей молекуле, которая обнаруживает указанную вторую группировку клеточной поверхности;

b) индукцию расщепления указанных первой и второй молекулярных меток; и

c) обнаружение присутствия или отсутствия высвобожденных первой и второй молекулярных меток для обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце  
20 первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности.

Другой формат представляет собой опосредованное ДТГ высвобождение, где способ обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце по меньшей мере первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности включает:

a) приведение в контакт образца с по меньшей мере одной связывающей молекулой,  
25 которая обнаруживает первую группировку клеточной поверхности, и с по меньшей мере одной связывающей молекулой, которая обнаруживает вторую группировку клеточной поверхности,

где по меньшей мере одна связывающая молекула, которая обнаруживает указанную первую группировку клеточной поверхности, и по меньшей мере одна связывающая молекула,  
30 которая обнаруживает указанную вторую группировку клеточной поверхности, содержат молекулярные метки, присоединенные к ним расщепляемым линкером, и

где молекулярная метка, присоединенная к связывающей молекуле, которая обнаруживает указанную первую группировку клеточной поверхности, отлична от молекулярной метки, присоединенной к связывающей молекуле, которая обнаруживает указанную вторую группировку клеточной поверхности;

- 5           b) индукцию расщепления указанных молекулярных меток; и
- c) обнаружение присутствия или отсутствия высвобожденных молекулярных меток для обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности.

10           В одном формате, в анализе опосредованного ДТТ высвобождения используют первичную связывающую молекулу для каждой группировки-мишени, которая содержит молекулярную метку.

          В одном варианте реализации настоящего изобретения, следовательно, предложен способ обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности, включающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, причем указанный способ

15           включает:

- a) приведение в контакт образца с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, и второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой,
- 20           экспрессируемой на клеточной поверхности,

          где указанная первая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером; и

          где указанная вторая связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером;

25           где молекулярная метка, присоединенная к связывающей молекуле, которая обнаруживает указанную первую группировку клеточной поверхности, отлична от молекулярной метки, присоединенной к связывающей молекуле, которая обнаруживает указанную вторую группировку клеточной поверхности;

- b) индукцию расщепления указанных первой и второй молекулярных меток; и
- 30           c) обнаружение присутствия или отсутствия высвобожденных молекулярных меток для обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности.

Другой формат представляет собой анализ опосредованного ДТТ высвобождения с применением первичной связывающей молекулы и вторичной связывающей молекулы для каждой группировки-мишени, где указанные вторичные связывающие молекулы содержат молекулярную метку.

5 В одном варианте реализации настоящего изобретения, следовательно, предложен способ обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности, включающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, причем указанный способ включает:

10 а) приведение в контакт образца с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, третьей связывающей молекулой, которая специфично связывается с указанной первой связывающей молекулой, и четвертой  
15 связывающей молекулой, которая специфично связывается с указанной второй связывающей молекулой,

где указанная третья связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером; и

20 где указанная четвертая связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером;

где молекулярная метка, присоединенная к связывающей молекуле, которая обнаруживает указанную первую группировку клеточной поверхности, отлична от молекулярной метки, присоединенной к связывающей молекуле, которая обнаруживает указанную вторую группировку клеточной поверхности;

25 b) индукцию расщепления указанных первой и второй молекулярных меток; и

c) обнаружение присутствия или отсутствия высвобожденных молекулярных меток для обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности.

30 Другой формат представляет собой анализ опосредованного ДТТ высвобождения с применением первичной связывающей молекулы для каждой группировки-мишени и вторичной связывающей молекулы, которая связывается с одной из указанных первичных связывающих молекул и которая содержит молекулярную метку.

В одном варианте реализации настоящего изобретения, следовательно, предложен способ обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности, включающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, причем указанный способ

5 включает:

a1) приведение в контакт образца с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, и третьей связывающей молекулой, которая

10 специфично связывается с указанной первой связывающей молекулой,

где указанная вторая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером; и

где указанная третья связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером; или

a2) приведение в контакт образца с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой, экспрессируемой на клеточной поверхности, и третьей связывающей молекулой, которая специфично связывается с указанной второй связывающей молекулой,

20 где указанная первая связывающая молекула содержит первую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером; и

где указанная третья связывающая молекула содержит вторую молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером;

где молекулярная метка, присоединенная к связывающей молекуле, которая

25 обнаруживает указанную первую группировку клеточной поверхности, отлична от молекулярной метки, присоединенной к связывающей молекуле, которая обнаруживает указанную вторую группировку клеточной поверхности;

b) индукцию расщепления указанных первой и второй молекулярных меток; и

c) обнаружение присутствия или отсутствия высвобожденных молекулярных меток для

30 обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности.

В каждом из форматов, приведенных выше в качестве примера, в которых применяют первичную связывающую молекулу и вторичную связывающую молекулу, между указанными первичной и вторичной связывающими молекулами могут присутствовать одна или более связывающих молекул.

5           Способ в соответствии с настоящим изобретением может включать комбинацию анализа сближения и анализа опосредованного ДТТ высвобождения, где анализ сближения применяют для обнаружения первой группировки клеточной поверхности, а анализ опосредованного ДТТ высвобождения применяют для обнаружения второй группировки клеточной поверхности.

10           Способ в соответствии с настоящим изобретением можно применять для измерения коэкспрессии по меньшей мере двух различных группировок клеточной поверхности в одном образце. Полученную посредством этого информацию можно применять для прогнозирования способности пациента, в частности, имеющего рак пациента, отвечать на агент или агенты, связывающие указанные две различные группировки клеточной поверхности.

15           В соответствии с настоящим изобретением, следовательно, предложен способ прогнозирования способности пациента, в частности, имеющего рак пациента, отвечать на агент или агенты, связывающие по меньшей мере первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, в частности, группировку, экспрессируемую на иммунной эффекторной клетке, и молекулу, экспрессируемую на клетке опухоли, причем  
20           указанный способ включает:

а) обнаружение уровней экспрессии первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности в биологическом образце из организма субъекта, в частности, из опухоли субъекта, с применением способа в соответствии с настоящим изобретением;

25           b) определение того, являются ли уровни экспрессии первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности в образце из организма субъекта более высокими или более низкими, чем пороговый уровень; и

30           c) прогнозирование того, что субъект вероятно ответит на агент или агенты, связывающие указанную первую группировку клеточной поверхности и указанную вторую группировку клеточной поверхности, если уровни экспрессии первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности в образце из организма субъекта равны или выше порогового уровня. Указанные агент или агенты включают агент, описанный



далее в данной заявке. Этот способ в данной заявке также называют “способом прогнозирования”.

В соответствии с настоящим изобретением также предложен способ лечения нуждающегося в этом субъекта, в частности, имеющего рак субъекта, причем указанный  
5 способ включает:

а) прогнозирование способности субъекта отвечать на агент или агенты, связывающие первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, с применением способа прогнозирования, описанного выше; и

б) введение агента или агентов, связывающих указанную первую группировку  
10 клеточной поверхности и указанную вторую группировку клеточной поверхности, субъекту, у которого вероятно будет ответ, в соответствии с прогнозом. Указанные агент или агенты включают агент, описанный далее в данной заявке.

В соответствии с настоящим изобретением дополнительно предложены агент или агенты, связывающие первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку  
15 клеточной поверхности, для лечения субъекта, в частности, имеющего рак субъекта, причем указанное лечение включает:

а) прогнозирование способности субъекта отвечать на агент или агенты, связывающие первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, с применением способа прогнозирования, описанного выше; и

б) введение агента или агентов, связывающих указанную первую группировку  
20 клеточной поверхности и указанную вторую группировку клеточной поверхности, субъекту, у которого вероятно будет ответ, в соответствии с прогнозом. Указанные агент или агенты включают агент, описанный далее в данной заявке.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу обнаружения и/или  
25 количественной оценки присутствия в образце кластеризации по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности, включающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, причем указанный способ включает обнаружение присутствия или отсутствия сигнала, причем указанный сигнал не обнаруживается, если указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности не  
30 находятся вблизи друг от друга, в образце, в котором указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности были подвергнуты воздействию агента, обладающего специфичностью связывания в отношении по меньшей мере указанных первой и второй

группировок клеточной поверхности. Этот способ можно применять для демонстрации того, что две или более группировок клеточной поверхности находятся в непосредственной близости друг от друга. Когда две или более группировок клеточной поверхности находятся в непосредственной близости друг от друга, их считают кластеризовавшимися, если они генерируют сигнал, описанный в данной заявке. Сближение указанных по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности вызывается или индуцируется агентом, который способен специфично связываться с указанными по меньшей мере двумя группировками клеточной поверхности, таким как, например, мультиспецифическое антитело. В некоторых вариантах реализации указанный способ, следовательно, также может включать обнаружение сигнала, который генерируется, когда указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности одновременно связаны агентом, который способен специфично связываться с указанными по меньшей мере двумя группировками клеточной поверхности.

Способ в соответствии с настоящим изобретением можно осуществить различными путями, включая различные форматы анализа сближения. Один путь осуществления указанного способа включает гашение сигнала от флуорофора, присоединенного к связывающей молекуле, которая позволяет обнаруживать одну из группировок клеточной поверхности, причем гашение индуцировано гасителем, присоединенным к связывающей молекуле, которая позволяет обнаруживать другую из группировок клеточной поверхности. Другой путь осуществления указанного способа включает сигнал, полученный в результате интерференции сигнала флуорофора, присоединенного к связывающей молекуле, которая позволяет обнаруживать одну из группировок клеточной поверхности, с сигналом другого отличного флуорофора, присоединенного к связывающей молекуле, которая позволяет обнаруживать другую из группировок клеточной поверхности.

В одном формате анализа сближения применяют две первичные связывающие молекулы, по одной для каждой группировки-мишени, где одна из указанных первичных связывающих молекул содержит молекулярную метку, а другая первичная связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку.

В одном варианте реализации настоящего изобретения, следовательно, предложен способ обнаружения и/или количественной оценки присутствия в образце кластеризации по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности, включающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, где указанный способ включает:

a1) приведение в контакт образца, в котором указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности были подвергнуты воздействию агента, обладающего специфичностью связывания в отношении по меньшей мере указанных первой и второй группировок клеточной поверхности, с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, и второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, где указанная первая связывающая молекула содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная вторая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку; или

a2) приведение в контакт образца, в котором указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности были подвергнуты воздействию агента, обладающего специфичностью связывания в отношении по меньшей мере указанных первой и второй группировок клеточной поверхности, с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, и второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, где указанная вторая связывающая молекула содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная первая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку; и

b) индукцию отщепления молекулярной метки; и

c) обнаружение присутствия или отсутствия высвобожденной молекулярной метки для обнаружения и/или количественной оценки кластеризации первой группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности в образце.

В другом формате, для каждой группировки-мишени используют первичную связывающую молекулу и вторичную связывающую молекулу против одной из первичных связывающих молекул, где первичная связывающая молекула, не связанная вторичной связывающей молекулой, содержит молекулярную метку, и вторичная связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку, или первичная связывающая молекула, не связанная вторичной связывающей молекулой, содержит индуцирующую расщепление группировку, и вторичная связывающая молекула содержит молекулярную метку.

В одном варианте реализации настоящего изобретения, следовательно, предложен способ обнаружения и/или количественной оценки присутствия в образце кластеризации по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности, включая кластеризацию первой

группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности, где указанный способ включает:

а1) приведение в контакт образца, в котором указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности были приведены в контакт с агентом, способным специфично связываться с по меньшей мере указанными первой и второй группировками клеточной поверхности, с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, и третьей связывающей молекулой,

10 где указанная первая связывающая молекула содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная третья связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку; или

а2) приведение в контакт образца, в котором указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности были приведены в контакт с агентом, способным специфично связываться с по меньшей мере указанными первой и второй группировками клеточной поверхности, с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, и третьей связывающей молекулой,

20 где указанная вторая связывающая молекула содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная третья связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку; или

а3) приведение в контакт образца, в котором указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности были приведены в контакт с агентом, способным специфично связываться с по меньшей мере указанными первой и второй группировками клеточной поверхности, с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, и третьей связывающей молекулой,

30

где указанная первая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку, и указанная третья связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером; или

5 а4) приведение в контакт образца, в котором указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности были приведены в контакт с агентом, способным специфично связываться с по меньшей мере указанными первой и второй группировками клеточной поверхности, с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, второй связывающей молекулой, которая специфично  
10 связывается со второй группировкой клеточной поверхности, и третьей связывающей молекулой,

где указанная вторая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку, и указанная третья связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит молекулярную метку, присоединенную к ней  
15 расщепляемым линкером;

b) индукцию отщепления молекулярной метки; и

c) обнаружение присутствия или отсутствия высвобожденной молекулярной метки для обнаружения и/или количественной оценки кластеризации первой группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности в образце.

20 В другом формате, для каждой группировки-мишени используют первичную связывающую молекулу и вторичные связывающие молекулы против обеих указанных первичных связывающих молекул, где одна из указанных вторичных связывающих молекул содержит молекулярную метку и другую индуцирующую расщепление группировку.

В одном варианте реализации настоящего изобретения, следовательно, предложен  
25 способ обнаружения и/или количественной оценки присутствия в образце кластеризации по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности, включающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, где указанный способ включает:

a1) приведение в контакт образца, в котором указанные первая и вторая группировки  
30 клеточной поверхности были приведены в контакт с агентом, способным специфично связываться с по меньшей мере указанными первой и второй группировками клеточной поверхности, с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой

группировкой клеточной поверхности, второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, третьей связывающей молекулой и четвертой связывающей молекулой,

5 где указанная третья связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная четвертая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку; или

10 а2) приведение в контакт образца, в котором указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности были приведены в контакт с агентом, способным специфично связываться с по меньшей мере указанными первой и второй группировками клеточной поверхности, с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, третьей связывающей молекулой  
15 и четвертой связывающей молекулой,

где указанная третья связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку; и указанная четвертая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером,

20 б) индукцию отщепления молекулярной метки; и

с) обнаружение высвобожденной молекулярной метки для обнаружения и/или количественной оценки кластеризации первой группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности в образце.

В каждом из форматов, приведенных выше в качестве примера, в которых применяют  
25 первичную связывающую молекулу и вторичную связывающую молекулу, между указанными первичной и вторичной связывающими молекулами могут присутствовать одна или более связывающих молекул.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу обнаружения и/или количественной оценки присутствия в образце кластеризации по меньшей мере двух  
30 группировок клеточной поверхности, включающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, причем указанный способ включает:

приведение в контакт образца, в котором указанная первая и указанная третья группировки клеточной поверхности были приведены в контакт с агентом, способным специфично связываться с по меньшей мере указанными первой и третьей группировками клеточной поверхности, с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с 5 первой группировкой клеточной поверхности, второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, причем указанная по меньшей мере одна из первой связывающей молекулы и второй связывающей молекулы содержит молекулярную метку, которая не обнаруживается, если указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности не находятся вблизи друг от друга; и

10 обнаружение присутствия или отсутствия молекулярной метки для обнаружения присутствия в образце кластеризации первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности.

В этом контексте, указанные по меньшей мере первая и третья группировки клеточной поверхности предпочтительно представляют собой различные группировки клеточной 15 поверхности. В некоторых вариантах реализации указанная первая группировка клеточной поверхности представляет собой CD137 или другую костимулирующую группировку, и указанная третья группировка клеточной поверхности представляет собой молекулу на другой клетке, такую как ассоциированная с опухолью группировка или группировка иммунной контрольной точки, предпочтительно PD-L1. Указанные первая и вторая группировки 20 клеточной поверхности предпочтительно представляют собой одинаковые группировки клеточной поверхности. В некоторых вариантах реализации указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности представляют собой CD137.

Способ в соответствии с настоящим изобретением можно применять для измерения кластеризации двух или более различных группировок клеточной поверхности в одном 25 образце и, в соответствии с настоящим изобретением, в частности, когда кластеризация вызывается агентом, который способен специфично связываться с указанными двумя или более различными группировками клеточной поверхности. В некоторых вариантах реализации полученную посредством этого информацию можно применять для определения того, эффективно ли или нет лечение агентом, который способен специфично связываться с 30 указанными двумя или более различными группировками клеточной поверхности, указанное определение основано на подтверждении одновременного связывания агента, способного

специфично связываться с указанными двумя различными группировками клеточной поверхности, с этими молекулами.

Агент может представлять собой любую отдельную молекулу, которая способна одновременно связываться с по меньшей мере двумя группировками клеточной поверхности.

5 В некоторых вариантах реализации указанный агент содержит по меньшей мере связывающий домен, который специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, и связывающий домен, который специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности. Подходящие агенты например, включают связывающие молекулы, такие как антитела, включая мультиспецифические антитела, такие как, например, биспецифические и

10 триспецифические антитела, фрагменты антител, молекулы, содержащие происходящие из антител домены, и слитые белки. Агент также могут называть лекарственным средством.

В соответствии с настоящим изобретением, следовательно, предложен способ определения эффективности агента, где указанный агент содержит по меньшей мере связывающий домен, который специфично связывается с первой группировкой клеточной

15 поверхности, и связывающий домен, который специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, причем указанный способ включает обнаружение и/или количественную оценку кластеризации первой группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности в биологическом образце из организма субъекта, проходящего лечение указанным агентом с применением способа в соответствии с настоящим

20 изобретением. Указанный агент представляет собой агент, описанный далее в данной заявке. Этот способ в данной заявке также называют “способом мониторинга”.

В соответствии с настоящим изобретением также предложен способ подтверждения механизма действия агента, где указанный агент содержит по меньшей мере связывающий домен, который специфично связывается с по меньшей мере первой группировкой клеточной

25 поверхности, и связывающий домен, который специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, причем указанный способ включает обнаружение и/или количественную оценку кластеризации первой группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности в биологическом образце из организма субъекта, проходящего лечение указанным агентом с применением способа в соответствии с настоящим

30 изобретением. Указанный агент представляет собой агент, описанный далее в данной заявке. Механизм действия представляет собой, например, одновременное связывание агента с указанными первой и второй группировками клеточной поверхности. В этом контексте,



указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности предпочтительно представляют собой различные группировки клеточной поверхности, и агент представляет собой мультиспецифическое антитело. Другой механизм действия представляет собой, например, кластеризацию двух или более группировок клеточной поверхности. В этом контексте, в одном варианте реализации указанные по меньшей мере первая и вторая группировки клеточной поверхности одинаковы, и агент представляет собой моноспецифическое антитело; и в другом варианте реализации указанные по меньшей мере первая и вторая группировки клеточной поверхности представляют собой различные группировки клеточной поверхности, и агент представляет собой мультиспецифическое антитело. Этот способ в данной заявке также называют “способом подтверждения”. Например, можно определить, вызывает ли агент, предпочтительно мультиспецифическое антитело, специфичное к молекуле клеточной поверхности, экспрессируемой на иммунной эффекторной клетке, предпочтительно CD137 или любой другой костимулирующей группировке эффекторных иммунных клеток, и молекуле клеточной поверхности, экспрессируемой на клетке опухоли, предпочтительно PD-L1 или любой другой ассоциированной с опухолью группировке или иммунной контрольной точке, кластеризацию двух или более из группировок клеточной поверхности, экспрессируемых на иммунной эффекторной клетке, предпочтительно одного или более белков CD137 или любой другой костимулирующей группировки эффекторных иммунных клеток.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения нуждающегося в этом субъекта, в частности, имеющего рак субъекта, причем указанный способ включает:

- a) лечение субъекта агентом, связывающим первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности;
- b) анализ эффективности агента с применением способа мониторинга, описанного в данной заявке, или подтверждение механизма действия агента с применением способа подтверждения, описанного в данной заявке. Указанный агент представляет собой агент, описанный далее в данной заявке. В некоторых вариантах реализации этот способ может дополнительно включать продолжение или корректировку лечения на основании результата анализа или подтверждения, где корректировка включает, но не ограничена повышением или снижением дозы и/или повышением или снижением частоты введения агента, или прекращением лечения.

В соответствии с настоящим изобретением дополнительно предложен агент, связывающий первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, для применения для лечения субъекта, в частности, имеющего рак субъекта, причем указанное лечение включает:

5           а) лечение субъекта агентом, связывающим первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности;

          b) анализ эффективности агента с применением способа мониторинга, описанного в данной заявке, или подтверждение механизма действия агента с применением способа подтверждения, описанного в данной заявке. Указанный агент представляет собой агент, описанный далее в данной заявке. В некоторых вариантах реализации лечение может дополнительно включать продолжение или корректировку лечения на основании результата анализа или подтверждения, где корректировка включает, но не ограничена повышением или снижением дозы и/или повышением или снижением частоты введения агента, или прекращением лечения.

15           Способ в соответствии с настоящим изобретением можно дополнительно применять для скрининга одного или более исследуемых агентов на способность вызывать кластеризацию по меньшей мере первой группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности.

          В соответствии с настоящим изобретением, следовательно, дополнительно предложен способ скрининга одного или более исследуемых агентов на способность вызывать кластеризацию по меньшей мере первой группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности, причем указанный способ включает:

          a) приведение в контакт одной или более исследуемых культур клеток с исследуемым агентом,

25           где исследуемая культура клеток содержит клетку, экспрессирующую по меньшей мере первую группировку клеточной поверхности, и вторую клетку, экспрессирующую вторую группировку клеточной поверхности;

          b) обнаружение уровня кластеризации указанных первой и второй группировок клеточной поверхности с применением способа в соответствии с настоящим изобретением; и

30           c) сравнение уровня кластеризации, обнаруживаемого на этапе b), с уровнем кластеризации, обнаруживаемом для кластеризации в контрольной культуре клеток, которую

не приводили в контакт с исследуемым агентом или приводили в контакт с контрольным агентом,

причем контрольная культура клеток содержит указанную первую группировку клеточной поверхности и указанную вторую группировку клеточной поверхности. В некоторых вариантах реализации этот способ может дополнительно включать выбор исследуемого агента, который вызывает равный или более высокий уровень кластеризации, чем уровень кластеризации в контрольной культуре клеток.

Этот способ можно применять, чтобы идентифицировать новые, дополнительные или альтернативные связывающие молекулы со специфичностью связывания с двумя или более различными группировками клеточной поверхности дополнительно к уже известным. Например, этот способ можно применять, чтобы идентифицировать дополнительные или альтернативные связывающие молекулы со специфичностью связывания с CD137 или любой другой костимулирующей группировкой эффекторных иммунных клеток, и PD-L1 или любой другой ассоциированной с опухолью группировкой или группировкой иммунной контрольной точки.

В соответствии с настоящим изобретением дополнительно предложен набор. В некоторых вариантах реализации указанный набор содержит связывающие молекулы, которые специфично связываются с указанными по меньшей мере первой и второй группировками клеточной поверхности в соответствии со способами, описанными в данной заявке. В одном варианте реализации указанный набор содержит по меньшей мере две связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой и второй группировками клеточной поверхности, необязательно где одна из указанных связывающих молекул содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, а другая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку, и инструкции по приведению в контакт образца из организма пациента с указанными по меньшей мере двумя связывающими молекулами, опционально с индукцией расщепления молекулярной метки; и по измерению сигнала, индуцированного приведением в контакт образца из организма пациента с указанными по меньшей мере двумя связывающими молекулами.

Далее приведено дополнительное описание особенностей способов, описанных в данной заявке. С целью ясности и лаконичности описания, особенности описаны в данной заявке в рамках одного или отдельных вариантов реализации, тем не менее, должно быть

очевидно, что в объем настоящего изобретения могут входить варианты реализации, содержащие комбинации всех или некоторых из описанных особенностей.

Способ в соответствии с настоящим изобретением можно применять для обнаружения экспрессии первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности. В соответствии с настоящим изобретением дополнительно предложен способ, который можно применять, чтобы показать, находятся ли две группировки клеточной поверхности в непосредственной близости друг от друга. В используемых способах обнаружения, высвобождение молекулярной метки из связывающей молекулы, связанной с группировками (с одной из группировок) поверхности, также позволяет количественный анализ экспрессии первой и второй группировок (их комплекса) клеточной поверхности.

В некоторых вариантах реализации способ в соответствии с настоящим изобретением позволяет обнаружение и/или количественный анализ первой и второй группировок клеточной поверхности в одном образце. Для этого молекулярная метка, присоединенная к антителу, связывающему указанную первую группировку клеточной поверхности, отлична от молекулярной метки, присоединенной к антителу, связывающему указанную вторую группировку клеточной поверхности. В некоторых вариантах реализации указанный способ можно применять для определения того, коэкспрессируются ли первая и вторая молекулы клетки в некотором образце.

Образец в способах в соответствии с некоторыми вариантами реализации настоящего изобретения может представлять собой, но не ограничен образцом ткани, образцом крови или культивированными клетками. Предпочтительно образец представляет собой образец ткани, образец крови или культивированные клетки из организма субъекта или пациента. Образец ткани из организма субъекта или пациента может представлять собой свежий образец или фиксированный в формалине и заключенный в парафин (FFPE), или иным способом фиксированный, образец. Указанные способы особенно полезны для обнаружения и/или количественного анализа (кластеризации) первой и второй группировки клеточной поверхности в образце биопсии опухоли из организма субъекта, имеющего рак.

В некоторых вариантах реализации указанная первая группировка клеточной поверхности и указанная вторая группировка клеточной поверхности предпочтительно представляют собой различные группировки и могут экспрессироваться на одном типе клеток, таком как, например, опухолевая клетка или иммунная клетка, на одной и той же клетке или на различных клетках. В некоторых вариантах реализации указанная первая группировка

клеточной поверхности и указанная вторая группировка клеточной поверхности предпочтительно экспрессируются на различных типах клеток.

В некоторых вариантах реализации способы в соответствии с настоящим изобретением пригодны для любого применения, в котором представляет интерес измерение коэкспрессии  
5 двух или более группировок клеточной поверхности и/или в котором представляет интерес определение кластеризации двух или более группировок клеточной поверхности на одной или на отдельных клетках.

В некоторых вариантах реализации одна из по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности предпочтительно экспрессируется на иммунной эффекторной клетке,  
10 в частности, на NK-клетке, Т-клетке, В-клетке, моноците, макрофаге, дендритной клетке или нейтрофильном гранулоците, предпочтительно на Т-клетке.

В некоторых вариантах реализации одна из по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности экспрессируется на клетке, которая может быть опухолевого или иммунного происхождения, такой как, например, но не ограничиваясь перечисленными:  
15 клетка опухоли, В-клетка, миелоидная клетка, дендритная клетка или нейтрофил.

В некоторых вариантах реализации одна из по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности экспрессируется на иммунной эффекторной клетке, в частности, на NK-клетке, Т-клетке, В-клетке, моноците, макрофаге, дендритной клетке или нейтрофильном гранулоците, предпочтительно на Т-клетке, а другая из по меньшей мере двух группировок  
20 клеточной поверхности экспрессируется на клетке, которая может быть опухолевого или иммунного происхождения, такой как, например, но не ограничиваясь перечисленными: клетка опухоли, В-клетка, миелоидная клетка, дендритная клетка или нейтрофил.

В некоторых вариантах реализации иммунная эффекторная клетка может представлять собой NK-клетку, Т-клетку, В-клетку, моноцит, макрофаг, дендритную клетку или  
25 нейтрофильный гранулоцит, предпочтительно Т-клетку.

В некоторых вариантах реализации костимулирующая группировка эффекторных иммунных клеток может представлять собой CD137, OX40, GITR, CD27, CD28, ICOS, CD40L или LIGHT, предпочтительно CD137.

В некоторых вариантах реализации группировки иммунных контрольных точек или  
30 опухолеассоциированные группировки могут быть выбраны из перечисленных, но не ограничены ими: PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, TIM3, CD47 или CD70, предпочтительно PD-L1.

Указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности могут представлять собой любые группировки клеточной поверхности, которые кластеризуются в ответ на агент, который приводит обе группировки клеточной поверхности в непосредственную близость друг к другу. В некоторых вариантах реализации указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности могут быть одинаковыми, и указанный способ применяют для обнаружения и/или количественной оценки кластеризации, например, димеризации или тримеризации, этих группировок клеточной поверхности в ответ на агент. В данной заявке, например, это продемонстрировано на примере кластеризации по меньшей мере двух молекул CD137.

В некоторых вариантах реализации указанная первая группировка клеточной поверхности представляет собой CD137 и указанная вторая группировка клеточной поверхности представляет собой PD-L1.

Способы измерения гомодимеров HER2, а также гетеродимеров HER1/HER2, гетеродимеров HER2/HER3, комплекса HGF-с-Met, комплекса HER3-PI3K, комплекса PD-1-PD-L1, не являются частью настоящего изобретения.

В соответствии с настоящим изобретением, следовательно, предложен способ обнаружения и/или количественной оценки экспрессии в образце по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности, включающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, описанные в данной заявке, такой что указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности не являются HER2; HER1 и HER2; HER2 и HER3; HGF и с-Met; HER3 и PI3K; или PD-1 и PD-L1.

В соответствии с настоящим изобретением также предложен способ обнаружения и/или количественной оценки присутствия в образце кластеризации по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности, включающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, описанные в данной заявке, так что указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности не являются HER2; HER1 и HER2; HER2 и HER3; HGF и с-Met; HER3 и PI3K; или PD-1 и PD-L1.

В некоторых вариантах реализации способов в соответствии с настоящим изобретением, образец приводят в контакт со связывающими молекулами, которые связываются с указанными первой и второй группировками клеточной поверхности. Их также называют анализируемыми связывающими молекулами.

В некоторых форматах способа в соответствии с настоящим изобретением, для каждой молекулы используют две связывающие молекулы. В соответствии с настоящим изобретением две связывающие молекулы, которые связываются с первой группировкой клеточной поверхности, называют первой связывающей молекулой и второй связывающей молекулой.

5 Две связывающие молекулы, которые связываются со второй группировкой клеточной поверхности, называют в данной заявке третьей связывающей молекулой и четвертой связывающей молекулой. Номера, используемые в отношении этих связывающих молекул, указывают на то, что связывающие молекулы отличны друг от друга в отношении специфичности связывания, и/или приведены для упрощения визуализации примеров

10 пригодных форматов анализа. Указанные номера не относятся к какому-либо конкретному порядку или необходимому присутствию одной или более связывающих молекул. Также, в форматах с применением первичных связывающих молекул и одной или более вторичных связывающих молекул между первичными связывающими молекулами могут присутствовать другие связывающие молекулы, т.е., связывающие молекулы, которые напрямую связываются

15 с группировками клеточной поверхности, и вторичные связывающие молекулы, т.е., указанные связывающие молекулы содержат молекулярную метку или индуцирующую расщепление группировку.

В некоторых форматах способа в соответствии с настоящим изобретением, две связывающие молекулы, которые связываются с первой группировкой клеточной поверхности,

20 представляют собой связывающие молекулы, которые связывают различные эпитопы, и их выбирают таким образом, чтобы они не препятствовали связыванию друг друга с первой группировкой клеточной поверхности. Аналогично, две связывающие молекулы, которые связываются со второй группировкой клеточной поверхности, представляют собой связывающие молекулы, которые связывают различные эпитопы, и их выбирают таким

25 образом, чтобы они не препятствовали связыванию друг друга с указанной второй группировкой клеточной поверхности. Первая, вторая, третья и/или четвертая связывающие молекулы могут связывать внеклеточный домен группировки клеточной поверхности; но также возможно, что они связывают внутриклеточный домен группировки клеточной поверхности. Также возможна их комбинация. Например, две связывающие молекулы,

30 которые связываются с первой группировкой клеточной поверхности, могут быть направлены на ее внеклеточный домен, тогда как две связывающие молекулы, которые связываются со второй группировкой клеточной поверхности, могут связываться с ее внутриклеточным

доменом; или одна из указанных связывающих молекул, которые связываются с первой группировкой клеточной поверхности, может связываться с внеклеточным доменом, а другая может связывать ее внутриклеточный домен, и то же справедливо для указанной второй группировки клеточной поверхности; или одна из указанных связывающих молекул, которые связываются с первой группировкой клеточной поверхности, может связываться с внеклеточным доменом, а другая может связывать ее внутриклеточный домен, тогда как обе связывающие молекулы, которые связываются со второй группировкой клеточной поверхности, могут связываться с ее внеклеточным или внутриклеточным доменом, или наоборот.

10 В некоторых вариантах реализации для каждой группировки используют одну первичную связывающую молекулу. В соответствии с настоящим изобретением две первичные связывающие молекулы, которые связываются с первой группировкой клеточной поверхности и второй группировкой клеточной поверхности, называют первой связывающей молекулой и второй связывающей молекулой. Номера, используемые в отношении этих связывающих молекул, указывают на то, что связывающие молекулы отличны друг от друга в отношении специфичности связывания, и/или приведены для упрощения визуализации примеров пригодных форматов анализа. Указанные номера не относятся к какому-либо конкретному порядку или необходимому присутствию одной или более связывающих молекул. Они также не указывают, что они будут такими же, как и первая и вторая связывающие молекулы, которые упоминаются в отношении других вариантов реализации настоящего изобретения. Также, в форматах с применением первичных связывающих молекул и одной или более вторичных связывающих молекул между первичными связывающими молекулами могут присутствовать другие связывающие молекулы, т.е., связывающие молекулы, которые напрямую связываются с группировками клеточной поверхности, и вторичные связывающие молекулы, т.е., указанные связывающие молекулы содержат молекулярную метку или индуцирующую расщепление группировку.

В некоторых вариантах реализации указанные две связывающие молекулы, которые связывают первую и вторую группировки клеточной поверхности, представляют собой связывающие молекулы, которые связывают различные группировки клеточной поверхности. Первая и вторая связывающие молекулы могут связывать внеклеточный домен группировки клеточной поверхности; но также возможно, что они связывают внутриклеточный домен группировки клеточной поверхности. Также возможна их комбинация. Например,



связывающая молекула, которая связывается с первой группировкой клеточной поверхности, может связываться с ее внеклеточным доменом, тогда как связывающая молекула, которая связывается со второй группировкой клеточной поверхности, может связываться с ее внутриклеточным доменом, или наоборот.

5           Связывающие молекулы, применяемые в некоторых вариантах реализации способов в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно представляют собой антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. В этом контексте, первую и вторую группировки клеточной поверхности можно считать антигенами. Антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с антигеном, известны в данной области и  
10 доступны для большого количества различных антигенов. Они доступны для приобретения или могут быть легко получены. Такие антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, обычно связываются с антигеном, но иным образом не проявляют биологическую функцию, такую как, например, блокирование взаимодействия между антигеном и его лигандом или индукция активности уничтожения клеток.

15           В некоторых форматах способа в соответствии с настоящим изобретением, одна из первичных связывающих молекул против каждой группировки клеточной поверхности содержит молекулярную метку или индуцирующую расщепление группировку. В некоторых форматах способа в соответствии с настоящим изобретением одна из первичных связывающих молекул содержит молекулярную метку, а другая - индуцирующую расщепление группировку.  
20           Такую молекулярную метку или индуцирующую расщепление группировку можно присоединить к первичной связывающей молекуле, в частности, к антителу, применяя стандартные методики в данной области техники. В некоторых случаях может быть трудно присоединить молекулярную метку или индуцирующую расщепление группировку к некоторой связывающей молекуле. В этом случае, можно применять вторичную связывающую  
25 молекулу, как правило, антитело, к которой присоединяют молекулярную метку или индуцирующую расщепление группировку. Такие вторичные связывающие молекулы, содержащие молекулярную метку или индуцирующую расщепление группировку, обычно направлены на Fc-область первичной связывающей молекулы и, как правило, доступны для приобретения.

30           Молекулярная метка может представлять собой любую молекулярную группировку, такую как молекула, которую можно обнаруживать. В некоторых случаях после высвобождения молекулярная группировка генерирует измеримый сигнал. Молекулярную

метку можно выбрать на основании одного или более ее свойств, которые отличают ее от других функциональных групп, указанные свойства включают, но не ограничиваются перечисленными: электрофоретическую подвижность, молекулярную массу, форму, растворимость, рКа, гидрофобность, заряд, соотношение заряд/масса и полярность. Различие в по меньшей мере одном из данных свойств позволяет разделить молекулярные метки в анализе, в котором измеряют множество группировок клеточной поверхности в одном образце. В некоторых вариантах реализации молекулярная метка содержит обнаруживаемую молекулу, такую как, например, но не ограничиваясь перечисленными: флуоресцентная метка, хромогенная метка, радиоактивная метка или электрохимическая метка. Примеры флуоресцентных красителей включают водорастворимые родаминовые красители, флуоресцеины, 4,7-дихлорфлуоресцеины, бензоксантоновые красители и переносящие энергию красители, описанные в следующих ссылочных материалах: Handbook of Molecular Probes and Research Reagents, 8<sup>oe</sup> изд. (2002), Molecular Probes, Eugene, Oreg.; WO 2001/32783; публикациях патентов США № US 2002-0081616, US 2002-0086985; и Lee et al., 1997, Nucleic Acids Research 25:2816-2822. Примеры подходящих молекулярных меток включают, но не ограничены репортерной молекулой VeraTag®. Репортерные молекулы VeraTag® хорошо известны в данной области техники. Предпочтительные молекулярные метки представляют собой, например, репортерные молекулы VeraTag® - Pro11 и Pro125. Pro11 является примером высвобождаемой светом метки, тогда как Pro125 является примером высвобождаемой DTT метки. Другие молекулы VeraTag®, например, описаны в публикациях патентов США № US 2004-0166529; US 2004-0126818; US 2003-0013126; US 2005-0079565 и US 2011-0180408, содержания каждой из которых и цитированные в ней ссылочные материалы полностью включены в данную заявку посредством ссылки.

Индущирующая расщепление группировка может представлять собой любую группировку, способную непосредственно или опосредованно вызывать отщепление молекулярной метки от связывающей молекулы, к которой молекулярная метка присоединена расщепляемым линкером. В некоторых вариантах реализации индуцирующая расщепление группировка представляет собой, например, группировку, которая образует активную частицу, способную расщеплять расщепляемый линкер. Примеры активных частиц включают синглетный кислород, пероксид водорода, NADH и гидроксильные радикалы, феноксильный радикал, супероксид и тому подобные частицы. Примеры гасителей для активных частиц, которые вызывают окисление, включают полиены, каротиноиды, витамин E, витамин C, N-

конъюгаты аминокислот с пирролом: тирозина, гистидина и глутатиона. См., например, Beutner et al., 2000, Meth. Enzymol. 319:226-241. В одном примере биотин, конъюгированный со связывающей молекулой, приводят в контакт с конъюгированным со стрептавидином метиленовым синим и подвергают воздействию света, что приводит к высвобождению синглетного кислорода, способного расщеплять расщепляемый линкер.

В некоторых форматах анализа, молекулярная метка присоединена к связывающей молекуле расщепляемым линкером. Расщепляемый линкер может представлять собой любой расщепляемый линкер, включая, но не ограничиваясь перечисленными: линкер, который может быть расщеплен синглетным кислородом, или пероксидом водорода, или ДТТ. Линкер, который может быть расщеплен ДТТ, представляет собой SS-линкер. Расщепляемые связи могут также включать связи, которые неустойчивы к агентам, которые работают в реакционной смеси, такие как неустойчивые к основаниям связи, фоторасщепляемые связи, связи, расщепляемые путем восстановления, связи, расщепляемые путем окисления, неустойчивые к кислотам связи и пептидные связи, расщепляемые специфическими протеазами. Ссылочные материалы, в которых описано множество таких связей, включают Greene и Wuts, 1991, *Protective Groups in Organic Synthesis*, второе издание, John Wiley & Sons, Нью-Йорк; Hennanson, 1996, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, Нью-Йорк; и публикацию патента США № US 2003-0119059.

Отщепление молекулярной метки от связывающей молекулы можно вызвать с помощью способов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь перечисленными: применение фотоиндукции и опосредованного ДТТ высвобождения. Фотоиндукция вызывает активацию поглощающей свет молекулы, которая, когда она активирована светом, превращает молекулярный кислород в синглетный кислород. Индукция расщепления с применением ДТТ включает индуцированное ДТТ расщепление дисульфидного линкера, который расщепляется восстановлением и который соединяет молекулярную метку со связывающей молекулой.

В некоторых вариантах реализации сигнал, который измеряют в способах в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой количество высвобожденных молекулярных меток. В некоторых форматах способов в соответствии с настоящим изобретением применяют по меньшей мере две различные молекулярные метки. В некоторых вариантах реализации их можно разделить перед обнаружением с помощью способов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь перечисленными:

электрофорез или способы, основанные на различии в молекулярной массе, форме, растворимости, рКа, гидрофобности, заряде, соотношении заряд/масса и полярности. Способ обнаружения зависит от молекулярной метки.

В контексте настоящего изобретения “близость (вблизи)” означает, что связывающая молекула, содержащая молекулярную метку, присоединенную к ней, и связывающая молекула, содержащая индуцирующую расщепление группировку, находятся в пределах расстояния, которое позволяет расщепление молекулярной метки, индуцированное индуцирующей расщепление группировкой. В анализе VeraTag® оно составляет приблизительно 1000 нм, предпочтительно в пределах приблизительно 20 - 200 нм или 30 - 100 нм друг от друга.

10 Приемлемы и другие диапазоны сближения, в зависимости от природы используемой молекулярной метки, и их может легко определить специалист в данной области техники на основании информации, предоставленной поставщиками доступных для приобретения меток, гасителей и репортерных молекул. Информация, необходимая специалисту в данной области техники, для применения определенного анализа сближения в соответствии с настоящим изобретением, доступна в данной области техники. Например, в Nathan P. 2020, Assay Guidance Manual, Compound-Mediated Assay Interferences in Homogenous Proximity Assays (полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки), приведена информация о донорных и акцепторных флуорофорах, которые можно применять, среди прочих, в анализе FRET, включая описание оптимальных расстояний между донорным и акцепторным флуорофорами

15 (см., например, Таблицы 2 и 3).

Способ в соответствии с настоящим изобретением можно применять для измерения коэкспрессии двух различных группировок клеточной поверхности в одном образце. Полученную посредством этого информацию можно применять для определения плана лечения пациента. Например, если две группировки клеточной поверхности

25 коэкспрессируются в образце ткани или крови пациента, могут принять решение лечить пациента агентом или агентами, которые нацелены на эти две группировки клеточной поверхности. Одним примером такой ситуации является ситуация, когда в образце биопсии опухоли имеющего рак пациента выявили коэкспрессию двух ассоциированных с опухолью антигенов на опухолевых клетках. Указанного пациента затем можно успешно лечить одним

30 или более агентами, которые связывают эти ассоциированные с опухолью антигены и которые препятствуют сигнальному пути указанных ассоциированных с опухолью антигенов и/или вызывают опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток. Если в образце

опухоли пациента не выявили коэкспрессию таких ассоциированных с опухолью антигенов, то лечащий врач может определить, что пациент маловероятно получит пользу от такого лечения. В другой ситуации, например, в биоптате опухоли выявляют коэкспрессию ассоциированного с опухолью антигена на опухолевой клетке и антигена, экспрессируемого на иммунных эффекторных клетках. Это свидетельствует о том, что иммунные эффекторные клетки, такие как, например, Т-клетки и/или НК-клетки, присутствуют в микроокружении опухоли. 5  
Такому пациенту может принести пользу лечение агентом, который приводит иммунные клетки в непосредственную близость от опухолевых клеток и/или активирует иммунные эффекторные клетки так, что опухолевые клетки будут селективно уничтожены. В некоторых вариантах реализации способ в соответствии с настоящим изобретением, следовательно, можно 10  
применять для прогнозирования ответа пациента, предпочтительно имеющего рак пациента, на лечение агентом или агентами, которые связывают две различные группировки клеточной поверхности.

Примером агента, который связывает две различные группировки клеточной 15  
поверхности, является, например, мультиспецифическое антитело. Такое мультиспецифическое антитело может представлять собой биспецифическое или триспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые одновременно связываются с обеими группировками клеточной поверхности. Такое мультиспецифическое антитело может проявлять моновалентное связывание с обеими группировками клеточной 20  
поверхности, так что мультиспецифическое антитело содержит отдельный антигенсвязывающий фрагмент для каждой группировки клеточной поверхности. Группировки клеточной поверхности могут представлять собой любые из указанных первой и второй группировок клеточной поверхности, описанных в данной заявке.

Конкретный пример мультиспецифического антитела, которое связывает две 25  
различные группировки клеточной поверхности, и в отношении которого полезен способ в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой мультиспецифическое антитело, которое связывается с PD-L1 на опухолевых клетках и с CD137 на Т-клетках. Такое мультиспецифическое антитело может содержать связывающий CD137 домен, содержащий CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) с последовательностью аминокислот, представленной в любой 30  
из SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 19, 23, 27, 30, 34, 38, 42, 45, 48 или 52, с допустимым присутствием одной, двух или трех замен аминокислот в них. В некоторых вариантах реализации связывающий CD137 домен содержит CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) с последовательностью

аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 19, 23, 27, 30, 34, 38, 42, 45, 48 или 52. Связывающий CD137 домен может дополнительно содержать CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 21, 25, 32, 36, 40, 44 или 50, с допустимым присутствием одной, двух или трех замен аминокислот в них, и/или CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 22, 26, 29, 33, 37, 41, 47 или 51, с допустимым присутствием одной, двух или трех замен аминокислот в них. В некоторых вариантах реализации связывающий CD137 домен может содержать CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 21, 25, 32, 36, 40, 44 или 50; и/или CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 22, 26, 29, 33, 37, 41, 47 или 51. Возможна любая комбинация HCDR1, HCDR2 и HCDR3. Предпочтительные связывающие CD137 домены содержат комбинацию HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48; или SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 52. Связывающий CD137 домен такого мультиспецифического антитела может содержать вариабельную область тяжелой цепи, имеющую любую из последовательностей SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 20, 24, 28, 31, 35, 39, 43, 46 или 49, или идентичность по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, предпочтительно на 95%, последовательности их каркасных областей. В некоторых вариантах реализации связывающий CD137 домен такого мультиспецифического антитела также содержит домен CH1. Можно применять любой домен CH1. Пример подходящего домена CH1 представлен в последовательности аминокислот, представленной в виде SEQ ID NO: 116.

Мультиспецифическое антитело может дополнительно содержать связывающий PD-L1 домен, содержащий CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 56, 58, 61, 72, 76, 80, 84, 88, 91, 95, 99, 102 или 106, с допустимым присутствием одной, двух или трех замен аминокислот в них. В некоторых

вариантах реализации связывающий PD-L1 домен содержит CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 56, 58, 61, 72, 76, 80, 84, 88, 91, 95, 99, 102 или 106. Связывающий PD-L1 домен может дополнительно содержать CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 54, 60, 65, 68, 70, 74, 78, 82, 86, 90 или 93, с допустимым присутствием одной, двух или трех замен аминокислот в них, и/или CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 55, 3, 63, 66, 71, 75, 79, 83, 87, 94, 98, 101, 105 или 108, с допустимым присутствием одной, двух или трех замен аминокислот в них. В некоторых вариантах реализации связывающий PD-L1 домен содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 54, 60, 65, 68, 70, 74, 78, 82, 86, 90 или 93; и/или CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 55, 3, 63, 66, 71, 75, 79, 83, 87, 94, 98, 101, 105 или 108. Возможна любая комбинация HCDR1, HCDR2 и HCDR3. Предпочтительные связывающие PD-L1 домены содержат комбинацию HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72; SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76; SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 80; SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83 и SEQ ID NO: 84; SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87 и SEQ ID NO: 88; SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 91; SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94 и SEQ ID NO: 95; SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99; SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 101 и SEQ ID NO: 102; SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 105 и SEQ ID NO: 106; или SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 108 и SEQ ID NO: 88.

Связывающий PD-L1 домен такого мультиспецифического антитела может содержать переменную область тяжелой цепи, имеющую любую из последовательностей SEQ ID NO: 53, 57, 59, 62, 64, 67, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 92, 96, 97, 100, 103, 104 или 107, или идентичность по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, предпочтительно на 95% последовательности ее каркасных областей. В некоторых вариантах реализации связывающий PD-L1 домен такого мультиспецифического антитела также содержит домен CH1. Можно применять любой домен CH1. Пример подходящего домена CH1 представлен в последовательности аминокислот, представленной в виде SEQ ID NO: 116.

В некоторых вариантах реализации мультиспецифическое антитело может содержать любую комбинацию связывающих CD137 и PD-L1 доменов, описанных в данной заявке, см., например, таблицу 1. Одно такое мультиспецифическое антитело представляет собой MCLA-145.

5 В некоторых вариантах реализации мультиспецифическое антитело может дополнительно содержать любую легкую цепь. Пример подходящей легкой цепи содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDR3 легкой цепи (LCDR3) с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 113, допускающей одну, две или три замены аминокислот. В некоторых вариантах реализации переменная область легкой

10 цепи содержит CDR3 легкой цепи (LCDR3) с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 113. Переменная область легкой цепи может дополнительно содержать CDR1 легкой цепи (LCDR1) с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 111, допускающей одну, две или три замены аминокислот, и/или CDR2 легкой цепи (LCDR2) с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 112,

15 допускающей одну, две или три замены аминокислот. В некоторых вариантах реализации переменная область легкой цепи содержит CDR1 легкой цепи (LCDR1) с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 111; и/или CDR2 легкой цепи (LCDR2) с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 112. Переменная область легкой цепи мультиспецифического антитела может содержать

20 переменную область легкой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 110, или идентичность по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 99% последовательности ее каркасных областей. В некоторых вариантах реализации легкая цепь такого мультиспецифического антитела также содержит домен CL. Можно применять любой домен CL. Пример подходящего домена CL представлен в последовательности аминокислот, представленной в виде SEQ ID

25 NO: 115.

В некоторых вариантах реализации мультиспецифическое антитело может дополнительно содержать Fc-область или ее часть. Такая Fc-область может содержать любую модификацию, известную в данной области техники, такую как, например, но не ограничиваясь перечисленными: модификации для устранения или снижения Fc-эффекторной

30 функции и/или модификации, которые вызывают гетеродимеризацию различных доменов СН3. Можно применять любую Fc-область. Пример подходящей Fc-области представлен в последовательности аминокислот, представленной в виде SEQ ID NO: 116 - 120.



Способ в соответствии с настоящим изобретением можно применять для обнаружения кластеризации по меньшей мере двух различных группировок клеточной поверхности в одном образце, и, в соответствии с настоящим изобретением, в частности, когда кластеризация вызывается агентом, обладающего специфичностью связывания с по меньшей мере двумя различными группировками клеточной поверхности. Полученную посредством этого информацию можно применять для определения того, получает ли пациент пользу от лечения агентом, который способен специфично связываться с указанными двумя различными группировками клеточной поверхности, а следовательно, того, следует ли продолжить, скорректировать или завершить лечение. Например, если вводят лекарственный агент, но кластеризация не наблюдается или ниже некоторого порогового уровня, то может быть принято решение о завершении лечения. Или если наблюдается некоторая кластеризация, но не на желательном уровне, то может быть принято решение о повышении дозы лечения и/или продолжительности лечения. В некоторых вариантах реализации способ в соответствии с настоящим изобретением, следовательно, можно рассматривать как способ отслеживания ответа пациента на конкретное лечение.

Примером агента, способного специфично связываться с указанными двумя различными группировками клеточной поверхности, является, например, мультиспецифическое антитело. Такое мультиспецифическое антитело может представлять собой биспецифическое или триспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые одновременно связываются с обеими группировками клеточной поверхности. У такого мультиспецифического антитела можно наблюдать моновалентное связывание с обеими группировками клеточной поверхности, так что мультиспецифическое антитело содержит отдельный антигенсвязывающий фрагмент для каждой группировки клеточной поверхности. Способ в соответствии с настоящим изобретением можно применять в любой ситуации, в которой две или более группировок клеточной поверхности кластеризуются агентом, который способен специфично связываться с этими двумя или более группировками клеточной поверхности. Агент, который способен специфично связываться с двумя различными группировками клеточной поверхности, следовательно, может связываться с любыми группировками клеточной поверхности, такими как описанные в данной заявке, но не ограниченные ими.

Конкретный пример мультиспецифического антитела, которое связывает две различные группировки клеточной поверхности, и в отношении которого применим способ в

соответствии с настоящим изобретением, представляет собой мультиспецифическое антитело, которое связывается с PD-L1 на опухолевых клетках и с CD137 на Т-клетках. Такое мультиспецифическое антитело может содержать связывающий CD137 домен, содержащий CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 19, 23, 27, 30, 34, 38, 42, 45, 48 или 52, с допустимым присутствием одной, двух или трех замен аминокислот в них. В некоторых вариантах реализации связывающий CD137 домен содержит CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 19, 23, 27, 30, 34, 38, 42, 45, 48 или 52. Связывающий CD137 домен может дополнительно содержать CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 21, 25, 32, 36, 40, 44 или 50, допускающей одну, две или три замены аминокислот, и/или CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 22, 26, 29, 33, 37, 41, 47 или 51, с допустимым присутствием одной, двух или трех замен аминокислот в них. В некоторых вариантах реализации связывающий CD137 домен содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 21, 25, 32, 36, 40, 44 или 50; и/или CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 22, 26, 29, 33, 37, 41, 47 или 51. Возможна любая комбинация HCDR1, HCDR2 и HCDR3. Предпочтительные связывающие CD137 домены содержат комбинацию HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48; или SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 52. Связывающий CD137 домен такого мультиспецифического антитела может содержать переменную область тяжелой цепи, имеющую любую из последовательностей SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 20, 24, 28, 31, 35, 39, 43, 46 или 49, или идентичность по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, предпочтительно на 95% последовательности ее каркасных областей. В некоторых вариантах реализации связывающий CD137 домен такого мультиспецифического

антитела также содержит домен CH1. Можно применять любой домен CH1. Пример подходящего домена CH1 представлен в последовательности аминокислот, представленной в виде SEQ ID NO: 116.

Мультиспецифическое антитело может дополнительно содержать связывающий PD-L1 домен, содержащий CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 56, 58, 61, 72, 76, 80, 84, 88, 91, 95, 99, 102 или 106, с допустимым присутствием одной, двух или трех замен аминокислот в них. В некоторых вариантах реализации связывающий PD-L1 домен содержит CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 56, 58, 61, 72, 76, 80, 84, 88, 91, 95, 99, 102 или 106. Связывающий PD-L1 домен может дополнительно содержать CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 54, 60, 65, 68, 70, 74, 78, 82, 86, 90 или 93, допускающей одну, две или три замены аминокислот, и/или CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 55, 3, 63, 66, 71, 75, 79, 83, 87, 94, 98, 101, 105 или 108, с допустимым присутствием одной, двух или трех замен аминокислот в них. В некоторых вариантах реализации связывающий PD-L1 домен содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 54, 60, 65, 68, 70, 74, 78, 82, 86, 90 или 93; и/или CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 55, 3, 63, 66, 71, 75, 79, 83, 87, 94, 98, 101, 105 или 108. Возможна любая комбинация HCDR1, HCDR2 и HCDR3. Предпочтительные связывающие PD-L1 домены содержат комбинацию HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72; SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76; SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 80; SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83 и SEQ ID NO: 84; SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87 и SEQ ID NO: 88; SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 91; SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94 и SEQ ID NO: 95; SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99; SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 101 и SEQ ID NO: 102; SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 105 и SEQ ID NO: 106; или SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 108 и SEQ ID NO: 88. Связывающий PD-L1 домен такого мультиспецифического антитела может содержать вариабельную область

тяжелой цепи, имеющую любую из последовательностей SEQ ID NO: 53, 57, 59, 62, 64, 67, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 92, 96, 97, 100, 103, 104 или 107, или идентичность по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, предпочтительно на 95% последовательности ее каркасных областей. В некоторых вариантах реализации связывающий PD-L1 домен такого мультиспецифического антитела также содержит домен CH1. Можно применять любой домен CH1. Пример подходящего домена CH1 представлен в последовательности аминокислот, представленной в виде SEQ ID NO: 116.

В некоторых вариантах реализации мультиспецифическое антитело может содержать любую комбинацию связывающих CD137 и PD-L1 доменов, описанных в данной заявке, см., например, таблицу 1. Одно такое мультиспецифическое антитело представляет собой MCLA-145.

В некоторых вариантах реализации мультиспецифическое антитело может дополнительно содержать любую легкую цепь. Пример подходящей легкой цепи содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDR3 легкой цепи (LCDR3) с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 113, допускающей одну, две или три замены аминокислот. В некоторых вариантах реализации переменная область легкой цепи содержит CDR3 легкой цепи (LCDR3) с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 113. Переменная область легкой цепи может дополнительно содержать CDR1 легкой цепи (LCDR1) с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 111, допускающей одну, две или три замены аминокислот, и/или CDR2 легкой цепи (LCDR2) с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 112, допускающей одну, две или три замены аминокислот. В некоторых вариантах реализации переменная область легкой цепи содержит CDR1 легкой цепи (LCDR1) с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 111; и/или CDR2 легкой цепи (LCDR2) с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 112. Переменная область легкой цепи мультиспецифического антитела может содержать переменную область легкой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 110, или идентичность по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 99% последовательности ее каркасных областей. В некоторых вариантах реализации легкая цепь такого мультиспецифического антитела также содержит домен CL. Можно применять любой домен CL. Пример подходящего домена CL представлен в последовательности аминокислот, представленной в виде SEQ ID NO: 115.

В некоторых вариантах реализации мультиспецифическое антитело может дополнительно содержать Fc-область или ее часть. Такая Fc-область может содержать любую модификацию, известную в данной области техники, такую как, например, но не ограничиваясь перечисленными модификациями: модификации для устранения или снижения Fc-эффекторной функции и/или модификации, которые вызывают гетеродимеризацию различных доменов СНЗ. Можно применять любую Fc-область. Пример подходящей Fc-области представлен в последовательности аминокислот, представленной в виде SEQ ID NO: 116 - 120.

Таблица 1. Антитела, содержащие комбинации переменных областей тяжелой цепи, специфичных к CD137, и переменных областей тяжелой цепи, специфичных к PD-L1. Каждую из PB1 - PB252 можно комбинировать с легкой цепью, описанной в данной заявке.

	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 49
SEQ ID NO: 53	PB1	PB2	PB3	PB4	PB5	PB6	PB7	PB8	PB9	PB10	PB11	PB12	PB13	PB14
SEQ ID NO: 57	PB15	PB16	PB17	PB18	PB19	PB20	PB21	PB22	PB23	PB24	PB25	PB26	PB27	PB28
SEQ ID NO: 59	PB29	PB30	PB31	PB32	PB33	PB34	PB35	PB36	PB37	PB38	PB39	PB40	PB41	PB42
SEQ ID NO: 62	PB43	PB44	PB45	PB46	PB47	PB48	PB49	PB50	PB51	PB52	PB53	PB54	PB55	PB56
SEQ ID NO: 64	PB57	PB58	PB59	PB60	PB61	PB62	PB63	PB64	PB65	PB66	PB67	PB68	PB69	PB70
SEQ ID NO: 67	PB71	PB72	PB73	PB74	PB75	PB76	PB77	PB78	PB79	PB80	PB81	PB82	PB83	PB84
SEQ ID NO: 69	PB85	PB86	PB87	PB88	PB89	PB90	PB91	PB92	PB93	PB94	PB95	PB96	PB97	PB98

SEQ ID NO: 73	PB99	PB100	PB101	PB102	PB103	PB104	PB105	PB106	PB107	PB108	PB109	PB110	PB111	PB112
SEQ ID NO: 77	PB113	PB114	PB115	PB116	PB117	PB118	PB119	PB120	PB121	PB122	PB123	PB124	PB125	PB126
SEQ ID NO: 81	PB127	PB128	PB129	PB130	PB131	PB132	PB133	PB134	PB135	PB136	PB137	PB138	PB139	PB140
SEQ ID NO: 85	PB141	PB142	PB143	PB144	PB145	PB146	PB147	PB148	PB149	PB150	PB151	PB152	PB153	PB154
SEQ ID NO: 89	PB155	PB156	PB157	PB158	PB159	PB160	PB161	PB162	PB163	PB164	PB165	PB166	PB167	PB168
SEQ ID NO: 92	PB169	PB170	PB171	PB172	PB173	PB174	PB175	PB176	PB177	PB178	PB179	PB180	PB181	PB182
SEQ ID NO: 96	PB183	PB184	PB185	PB186	PB187	PB188	PB189	PB190	PB191	PB192	PB193	PB194	PB195	PB196
SEQ ID NO: 97	PB197	PB198	PB199	PB200	PB201	PB202	PB03	PB204	PB205	PB206	PB207	PB208	PB209	PB210
SEQ ID NO: 100	PB211	PB212	PB213	PB214	PB215	PB216	PB217	PB218	PB219	PB220	PB221	PB222	PB223	PB224
SEQ ID NO: 104	PB225	PB226	PB227	PB228	PB229	PB230	PB231	PB232	PB233	PB234	PB235	PB236	PB237	PB238
SEQ ID NO: 107	PB239	PB240	PB241	PB242	PB243	PB244	PB245	PB246	PB247	PB248	PB249	PB250	PB251	PB252

В данной заявке термин «содержать» и его спряжения используют в неограниченном смысле для обозначения того, что объекты, следующие за указанным термином, включены, но объекты, конкретно не упомянутые, не исключены.

5       Формы единственного числа в данной заявке используют по отношению к одному или более чем одному (т.е., по меньшей мере одному) грамматическому объекту, упомянутому в форме единственного числа. В качестве примера, “элемент” означает один элемент или более чем один элемент.

10       Приведенная в данной заявке ссылка на патентный документ или другой материал не принимается за допущение того, что указанный документ или материал был известен, или что информация, которую он содержит, была частью известного уровня техники на дату приоритета любого из пунктов формулы изобретения.

Все патентные и литературные ссылочные материалы, цитированные в настоящем описании, настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки.

15       Настоящее изобретение проиллюстрировано в следующих примерах. Эти примеры не ограничивают объем настоящего изобретения.

## ПРИМЕРЫ

### **Пример 1. Получение осадков клеток для анализа VeraTag®.**

20       Флаконы T75 покрывали в течение ночи 2 мкг/мл антитела против CD3 (клон ОКТ3, eBioscience, номер в каталоге 16-0037-85) в ФБР. Затем добавляли Т-клетки Jurkat, экспрессирующие CD137 (Jurkat\_CD137K), при концентрации  $1,8 \times 10^6$  клеток/мл в 50 мл среды (9% ЭБС-НІ RPMI 1640, 2 мМ L-глутамин) и инкубировали в течение 4 часов при 37°C. Клетки Jurkat затем совместно культивировали с клетками CHO-K1, экспрессирующими PD-L1 (CHO-PD-L1), при концентрации  $0,45 \times 10^6$  клеток/мл в 50 мл среды (Jurkat к CHO). Клеткам позволяли взаимодействовать в течение 4 часов, затем добавляли биспецифическое антитело, связывающееся с CD137 и PD-L1, антитело положительного контроля против CD137 или антитело отрицательного контроля, связывающееся с RSV (10 мкг/мл), на следующие 2 часа. Клетки затем собирали из флаконов путем ресуспендирования и соскребания и фиксировали, как описано далее: после центрифугирования в течение 10 мин при 1200 об/мин (125 x g), 4°C, среду сливали и осадок клеток разрыхляли и ресуспендировали в ледяном ФБР.

25

30



Центрифугирование повторяли дважды, после чего ФБР сливали и осадок клеток разрыхляли путем встряхивания на вортексе. После второй промывки осадок ресуспендировали в 30 мл 10% нейтрального забуференного формалина (10% NBF, номер в каталоге 5701, Thermo Fisher Scientific) и плавно вращали в течение ночи при 4°C. После центрифугирования в течение 10 мин при 1500 об/мин, 4°C, формалин удаляли и осадок клеток ресуспендировали в 80% этаноле до концентрации  $25 \times 10^6$  клеток/мл и хранили при 4°C до проведения обработки, как описано ранее (Shi et al, 2009).

Подходящие биспецифические антитела, связывающиеся с CD137 и PD-L1, представляют собой, например, таковые, конкретно описанные в данной заявке.

### **Пример 2. Анализ VeraTag® экспрессии PD-L1.**

Для этого анализа использовали осадки клеток, полученные в Примере 1.  $4,5 \times 10^5$  клеток помещали на положительно заряженные предметные стекла (FisherScientific) и анализировали, применяя технологию VeraTag®, вкратце описанную ниже.

Демаскировку антигенов осуществляли с помощью нагревания, применяя автоклав (Bioscience Medical). После демаскировки антигенов добавляли пары антител и обнаруживали высвобожденные посредством DTT флуоресцентные метки VeraTag с помощью капиллярного электрофореза. Высвобожденные VeraTag нормировали на объем буфера для образца с получением единиц относительной флуоресценции на  $4,5 \times 10^5$  клеток.

Используемые антитела представляли собой МАТ кролика против PD-L1 - E1L3N (Cell Signaling Technology, номер в каталоге 13684) - и гидролизованное пепсином антитело козы против IgG(H+L) кролика (Southern Biotech, номер в каталоге 4052-01), меченые флуоресцентным репортером VeraTag® посредством дисульфидной связи. В эксперименте с изотипическим контролем антитело PD-L1 заменяли на IgG кролика (Cell Signaling Technology, номер в каталоге 3900).

Результаты представлены на фигуре 9. Анализ VeraTag® представляется подходящим средством для обнаружения уровней экспрессии PD-L1. Сходные количества PD-L1 были измерены во всех трех образцах.

### **Пример 3. Анализ VeraTag® экспрессии CD137.**

Для этого анализа использовали осадки клеток, полученные в Примере 1.  $4,5 \times 10^5$  клеток помещали на положительно заряженные предметные стекла (FisherScientific) и анализировали, применяя технологию VeraTag®, вкратце описанную ниже.

5 Демаскировку антигенов осуществляли с помощью нагревания, применяя автоклав (Bioscare Medical). После демаскировки антигенов добавляли пары антител и обнаруживали высвобожденные посредством DTT флуоресцентные метки VeraTag с помощью капиллярного электрофореза. Высвобожденные VeraTag нормировали на объем буфера для образца с получением единиц относительной флуоресценции на  $4,5 \times 10^5$  клеток.

10 Оценивали два различных первичных антитела: МАТ мыши против CD137 - M127 (BD Pharmingen, номер в каталоге 552532) - и МАТ мыши против CD137 - BBK2 (ThermoFisher, номер в каталоге MS-621). Вторичное антитело козы против IgG мыши (Jackson ImmunoResearch, номер в каталоге 115-005-146), конъюгированное с VeraTag, спаривали с первичным антителом. В эксперименте с изотипическим контролем, антитело против CD137  
15 заменяли на IgG мыши (BD Pharmingen, номер в каталоге 554121).

Результаты представлены на фигуре 10. Анализ VeraTag® представляется подходящим средством для обнаружения уровней экспрессии CD137. Сходные количества CD137 были измерены во всех трех образцах для обоих первичных анализируемых антител.

#### 20 **Пример 4. Анализ VeraTag® кластеризации CD137.**

Для этого анализа использовали осадки клеток, полученные в Примере 1.  $4,5 \times 10^5$  клеток помещали на положительно заряженные предметные стекла (FisherScientific) и анализировали, применяя технологию VeraTag®, вкратце описанную ниже.

25 Демаскировку антигенов осуществляли с помощью нагревания, применяя автоклав (Bioscare Medical). После демаскировки антигенов добавляли пары антител, и обнаруживали высвобожденные флуоресцентные метки VeraTag с помощью капиллярного электрофореза. Высвобожденные VeraTag нормировали на объем буфера для образца с получением единиц относительной флуоресценции на  $4,5 \times 10^5$  клеток.

30 Оценивали два различных первичных антитела: МАТ мыши против CD137 - M127 (BD Pharmingen, номер в каталоге 552532) - и МАТ мыши против CD137 - BBK2 (ThermoFisher,

номер в каталоге MS-621). Равные концентрации антител против CD137 метили либо флуоресцентным репортером VeraTag, либо биотином.

Результаты представлены на фигуре 11. Анализ VeraTag® представляется подходящим средством для обнаружения кластеризации CD137. Сигнал VeraTag® оказался сильнее, когда в качестве первичного анализируемого антитела применяли антитело ВВК, по сравнению с антителом M127.

#### **Пример 5. Анализ VeraTag® сближения CD137-PD-L1 .**

10 Для этого анализа использовали осадки клеток, полученные в Примере 1.  $4,5 \times 10^5$  клеток помещали на положительно заряженные предметные стекла (FisherScientific) и анализировали, применяя технологию VeraTag®, вкратце описанную ниже.

Демаскировку антигенов осуществляли с помощью нагревания, применяя автоклав (Biocare Medical). После демаскировки антигенов добавляли пары антител и обнаруживали 15 высвобожденные флуоресцентные метки VeraTag с помощью капиллярного электрофореза. Высвобожденные VeraTag нормировали на объем буфера для образца с получением единиц относительной флуоресценции на  $4,5 \times 10^5$  клеток.

Сближение CD137-PD-L1 измеряли по зависящему от сближения высвобождению репортера VeraTag из МАТ мыши против CD137 - M127 (BD Pharmingen, номер в каталоге 20 552532, эктодомен) - или МАТ мыши - ВВК2 (ThermoFisher, номер в каталоге MS-621, эктодомен), - спаренного с МАТ кролика против PD-L1 - E1L3N (Cell Signaling Technology, номер в каталоге 13684, С-конец) и биотинилированным вторичным антителом козы против IgG кролика (Rockland Immunochemicals, номер в каталоге 611-101-122). В эксперименте с изотипическим контролем антитело против PD-L1 заменяли на IgG кролика (Cell Signaling 25 Technology, номер в каталоге 3900). Результаты представлены на фигуре 12. Анализ VeraTag® представляется подходящим средством для обнаружения комплекса CD137-PD-L1. В образце В выявили наиболее сильный сигнал VeraTag для обоих первичных анализируемых антител. Это свидетельствует о том, что биспецифическое антитело CD137xPD-L1 одновременно связывается с CD137 и PD-L1 и кластеризует эти антигены, а следовательно, и клетки, 30 экспрессирующие эти антигены.

**ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ**

SEQ ID NO: 1: Вариабельная область тяжелой цепи

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNFAMNWVRRAPGQGLEWMGWINTNTGNPT  
5 YAQGFTGRFVFLDTSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDWGVIGGHYMDVWGKGTVT  
VSS

SEQ ID NO: 2: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 1  
NFAMN

10

SEQ ID NO: 3: HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 1  
WINTNTGNPTYAQGFTG

SEQ ID NO: 4: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 1  
15 DWGVIGGHYMDV

SEQ ID NO: 5: Вариабельная область тяжелой цепи

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTN  
YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSDGYGPKAFDYWGQGLVT  
20 VSS

SEQ ID NO: 6: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 5  
SYGIS

25 SEQ ID NO: 7: HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 5  
WISAYNGNTNYAQKLQG

SEQ ID NO: 8: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 5  
DSDGYGPKAFDY

30

SEQ ID NO: 9: Вариабельная область тяжелой цепи

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPDDSDTRYS  
PSFQGGVTTISADKSSSTAYLQWSSLKASDTAMYYCASFYTGIVGATGAFDVWGQGTTVTV  
SS

5 SEQ ID NO: 10: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 9  
SYWIG

SEQ ID NO: 11 : HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 9  
IYPDDSDTRYSPSFQG

10

SEQ ID NO: 12: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 9  
FYTGIVGATGAFDV

SEQ ID NO: 13: Вариабельная область тяжелой цепи

15 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSDAISWVRQAPGQGLEWMGGMIPILGTANY  
AQKFQGRVTITADRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCVRGATYYYGSGTYYSINWFDPWGQ  
GTLVTVSS

SEQ ID NO: 14: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 13

20 SDAIS

SEQ ID NO: 15: HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 13  
GMIPILGTANYAQKFQG

25 SEQ ID NO: 16: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 13  
GATYYYGSGTYYSINWFDP

SEQ ID NO: 17: Вариабельная область тяжелой цепи

30 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCRASGYTFTNFAMTWVRQAPGQGPEYMGWINTNTGNPT  
YAQGFTGRFVFLDTSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDWASVMVRGDLDYWGQGTLLV  
TVSS

SEQ ID NO: 18: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 17

NFAMT

SEQ ID NO: 19: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 17

DWASVMVRGDLDY

5

SEQ ID NO: 20: Вариабельная область тяжелой цепи

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTLSELSIHWVRQAPGKGVEWMGGFYPEDVEPIY  
ARKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELNSLRSEDTAVYYCAAEGFDNYGSGIRGNWFDPWGQG  
TLVTVSS

10

SEQ ID NO: 21: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 20

ELSIH

SEQ ID NO: 22: HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 20

15 GFYPEDVEPIYARKFQG

SEQ ID NO: 23: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 20

EGFDNYGSGIRGNWFDP

20 SEQ ID NO: 24: Вариабельная область тяжелой цепи

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTLTELSMHWVRQSPGKGLEWMGSFYFYPEDGETIY  
AQKFQGRITMTEDTSADTAYMELSSLRSEDTAVYYCATEGVGVIRGNWFDPWGQGTLVTV  
SS

25 SEQ ID NO: 25: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 24

ELSMH

SEQ ID NO: 26: HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 24

SFYFYPEDGETIYAQKFQG

30

SEQ ID NO: 27: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 24

EGVGVIRGNWFDP

SEQ ID NO: 28: Вариабельная область тяжелой цепи

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIFPDDSDTRYS  
PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKPSDTAMYVCVRLGGYSGYAEDFVDFWQGTLTVS

5 S

SEQ ID NO: 29: HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 28

IIFPDDSDTRYSPSFQG

10 SEQ ID NO: 30: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 28

LGGYSGYAEDFVDF

SEQ ID NO: 31: Вариабельная область тяжелой цепи

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYTLTKLSMHWVRQAPGKGLEWMGGFEPEDGETI  
15 NAQKFQGRVTMTEDTSTDYAYMELSSLRSEDTAVYYCATDLRLGASYYYSYMDVWGRGT  
MVTVSS

SEQ ID NO: 32: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 31

KLSMH

20

SEQ ID NO: 33 : HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 31

GFEPEDGETINAQKFQG

SEQ ID NO: 34: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 31

25 DLRLGASYYYSYMDV

SEQ ID NO: 35: Вариабельная область тяжелой цепи

QITLKESGPTLVKPTQTLTSLCTFSGFSLSTSGMMSGWIRQPPGKALEWLALIYWNDDKYFS  
PSLKSRLTITKDTSKNQVVLTLTNMDPVDATYCAHTLWGSDDVFDVWQGQTMVTVSS

30

SEQ ID NO: 36: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 35

TSGMSVG

SEQ ID NO: 37: HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 35  
LIYWNDDKYFSPSLKS

5 SEQ ID NO: 38: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 35  
TLWGSDDVFDV

SEQ ID NO: 39: Вариабельная область тяжелой цепи  
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKVSGYSFTNYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY  
10 SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWHTLTKASDTAMYCARHQGYSFSGSHIDYWGQGLVT  
VSS

SEQ ID NO: 40: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 39  
NYWIG

15  
SEQ ID NO: 41 : HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 39  
IIYPGDS DTRYSPSFQG

SEQ ID NO: 42: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 39  
20 HQGYSFSGSHIDY

SEQ ID NO: 43: Вариабельная область тяжелой цепи  
EVQLVQSGAEVRKPGESLKISCKGSGYSFTTYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY S  
PSFQGQVTISADKSISTVYLQWSSLKASDTAMYCARHAGFIITSQNIDYWGQGLVTVSS  
25 SEQ ID NO: 44: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 43  
TYWIG

SEQ ID NO: 45: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 43  
HAGFIITSQNIDY

30  
SEQ ID NO: 46: Вариабельная область тяжелой цепи



EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNFAMNWVRQAPGQGLEWMGWINTNTGNPT  
YAQDFTGRFVFLDTSNGNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDWGLVAIGYFDYWGQGLVTV  
SS

5 SEQ ID NO: 47: HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 46  
WINTNTGNPTYAQDFTG

SEQ ID NO: 48: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 46  
DWGLVAIGYFDY

10

SEQ ID NO: 49: Варибельная область тяжелой цепи  
QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTTGVGWNWIRQPPGEALEWLALIYWNDDTYYSS  
PSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCAHEGIIIGFLGGNWFDPWGQGLVTV  
SS

15

SEQ ID NO: 50: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 49  
TTGVGVN

SEQ ID NO: 51: HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 49  
20 LIYWNDDTYYSPSLKS

SEQ ID NO: 52: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 49  
EGIIIGFLGGNWFDP

25 SEQ ID NO: 53: Варибельная область тяжелой цепи  
QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSHAMNWVRQAPGQGLEWMGWINPNTGNPT  
YAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDRKYVTNWVFAEDFQHWGQGT  
LVTVSS

30 SEQ ID NO: 54: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 53  
SHAMN

SEQ ID NO: 55: HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 53  
WINPNTGNPTYAQGFTG

5 SEQ ID NO: 56: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 53  
DRKYVTNWVFAEDFQH

SEQ ID NO: 57: Вариабельная область тяжелой цепи  
QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSHAMNWVRQAPGQGLEWMGWINPNTGNPT  
YAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAIDRGYMSNWVFAEYFPHWGQGT  
10 LVTVSS

SEQ ID NO: 58: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 57  
DRGYMSNWVFAEYFPH

15 SEQ ID NO: 59: Вариабельная область тяжелой цепи  
QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMNWVRQAPGQGLEWMGWINTNTGNPT  
YAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCATDRGYISSWVFAEDFQHWGQGT  
VTVSS

20 SEQ ID NO: 60: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 59  
SYAMN

SEQ ID NO: 61: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 59  
DRGYISSWVFAEDFQH

25  
SEQ ID NO: 62: Вариабельная область тяжелой цепи  
QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTSYAMNWVRQAPGQRLEWVNPNTGSPT  
YAQGSTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDRKYVTNWVFAEDFQHWGHG  
TLVTVSS

30  
SEQ ID NO: 63: HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 62  
CVNPNTGSPTYAQGSTG

SEQ ID NO: 64: Варибельная область тяжелой цепи

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAMNWVRQAPGQGLEWMGWMNPNTGN  
PTYAQGSTGRFVVS LDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDRKYVTNWVFAEDFQHWGR  
5 GTLVTVSS

SEQ ID NO: 65: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 64  
NYAMN

10 SEQ ID NO: 66: HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 64  
WMNPNTGNPTYAQGSTG

SEQ ID NO: 67: Варибельная область тяжелой цепи

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAINWVRQAPGQGLEWMGWINPNTGNPT  
15 YAQGF TGRFVVS LDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDRKYVTNWVFAEDFQHWGRGT  
LVTVSS

SEQ ID NO: 68: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 67  
NYAIN

20 SEQ ID NO: 69: Варибельная область тяжелой цепи  
EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFNTYSITWVRQAPGQGLEWMGSIVPIFGTINNA  
QKFQGRVTITADKSANTAYMELSSLRSED TAVYYCARDNTMVRGV DYYYMDVWGKGT M  
VTVSS

25 SEQ ID NO: 70: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 69  
TYSIT

SEQ ID NO: 71 : HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 69  
30 SIVPIFGTINNAQKFQG

SEQ ID NO: 72: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 69

DNTMVRGVDYYYYMDV

SEQ ID NO: 73: Вариабельная область тяжелой цепи

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGIFSTY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFDTPNYA  
5 QKFQGRVTITADKSTSTAYMDLSSLRSED TAVYYCAKNVRGYSAYDL DYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 74: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 73  
TYAIS

10 SEQ ID NO: 75: HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 73  
GIPIFDTPNYA QKFQG

SEQ ID NO: 76: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 73  
NVRGYSAYDL DY

15 SEQ ID NO: 77: Вариабельная область тяжелой цепи  
EVQLVQSGAEVKNPGSSVKVSKATGGTFNTYGTNWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANY  
A QKFQGRVTITADKSTTTAYMEVSSLRSED TAVYYCARGGADMGTLDYWGQGLTVTVSS

20 SEQ ID NO: 78: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 77  
TYGTN

SEQ ID NO: 79: HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 77  
GIPIFGTANYA QKFQG

25 SEQ ID NO: 80: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 77  
GGADMGTLDY

SEQ ID NO: 81: Вариабельная область тяжелой цепи

EVQLVQSGAEVMRPGSSVKVSCKASGGIFNTYTHIWRQAPGQGLEWMGGIPIFDTPNFAQ  
30 KFQGRLTITADKSTNTAYMELTSLRSED TAVYYCAREGCNHGVCYPYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 82: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 81

TYTH

SEQ ID NO: 83: HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 81

GIPIFDTPNFAQKFQG

5

SEQ ID NO: 84: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 81

EGCNHGVCPY

SEQ ID NO: 85: Варибельная область тяжелой цепи

10 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFRSYGITWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTTNYA  
QKFQGRVTITADKSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARRRGYSNPHWLDPWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 86: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 85

SYGIT

15

SEQ ID NO: 87: HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 85

GIPIFGTTNYAQKFQG

SEQ ID NO: 88: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 85

20 RRGYSNPHWLDP

SEQ ID NO: 89: Варибельная область тяжелой цепи

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGILWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYA  
QKFQGRVTITADISTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGGGNYEYFVYWGQGLTVTVSS

25

SEQ ID NO: 90: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 89

TYGIL

SEQ ID NO: 91: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 89

30 GGGNYEYFVY

SEQ ID NO: 92: Варибельная область тяжелой цепи

EVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSKASGGTFNTYAINWVRQAPGQGLEWVGRIPFDTANYA  
QKFQGRVTISADKSTTTAYMELSSLRSEDTAVFYCAKDETGYSSSNFQHWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 93: HCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 92

5 TYAIN

SEQ ID NO: 94: HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 92

RIPFDTANYAQKFQG

10 SEQ ID NO: 95: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 92

DETYSSSNFQH

SEQ ID NO: 96: Варибельная область тяжелой цепи

15 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTNYAINWVRQAPGQGLEWMGWNPNTGNPT  
YAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISLKAEDTAVYYCARDRKYVTNWVFAEDFQHWGQGL  
LTVTVSS

SEQ ID NO: 97: Варибельная область тяжелой цепи

20 QVQLVQSGAEVVKRPGSSVKVSKASGGTFNTYSITWVRQAPGQGLEWMGGIIPVFGTSKY  
AQKFQDRVTITADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPSFSSSSGWFDPWGQGLVTVS  
S

SEQ ID NO: 98: HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 97

25 GIIPVFGTSKYAQKFQD

SEQ ID NO: 99: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 97

DPSFSSSSGWFDP

SEQ ID NO: 100: Варибельная область тяжелой цепи

30 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFNTYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPFDTANY  
AQRQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVFYCAKDQTYSSSTLFDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 101: HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 100  
GIPIFDTANYAQRFG

5 SEQ ID NO: 102: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 100  
DQTGYSSTLFDY

SEQ ID NO: 103: Вариабельная область тяжелой цепи  
QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSHAMNWVRQAPGQGLEWMGWINPNTGNPT  
YAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAIDRGYMSNWVFAEYFPHWGQGT  
10 LVTVSS

SEQ ID NO: 104: Вариабельная область тяжелой цепи  
EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYAIWVRQAPGQGLEWMGWIPIFDTGNYA  
QKIQGRVTITADKSTSTAYMELTSLRSEDVAVYYCARHDTNTVDAFDIWDGQGMVTVSS

15 SEQ ID NO: 105: HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 104  
WIPIFDTGNYAQKIQG

SEQ ID NO: 106: HCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 104  
HDYTNTVDAFDI

20 SEQ ID NO: 107: Вариабельная область тяжелой цепи  
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFRSYGITWVRQAPGQGLEWMGGIIPVFGTTNY  
AQKFQGRVTITADKSTSTVFMELNSLRSEDVAVYYCARRRGYSNPHWLDPWGQGLTVTS  
S

25 SEQ ID NO: 108 : HCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 107  
GIIPVFGTTNYAQKFQG

30 SEQ ID NO: 109: Последовательность аминокислот общей легкой цепи человека IGKV1-  
39/jk1  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS  
GSGSGTDFLTLSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 110: Последовательность аминокислот вариабельного домена общей легкой цепи

5 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS  
GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 111: LCDR1 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 110

RASQSISSYLN

10

SEQ ID NO: 112: LCDR2 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 110

AASSLQS

SEQ ID NO: 113: LCDR3 согласно нумерации Кабата из SEQ ID NO: 110

15 QQSYSTPPT

SEQ ID NO: 114: Последовательность аминокислот константного домена общей легкой цепи

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

SEQ ID NO: 115: Последовательность аминокислот константного домена легкой цепи

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

25 SEQ ID NO: 116: Последовательность аминокислот CH1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL  
YLSLVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV

SEQ ID NO: 117: Последовательность аминокислот шарнира

30 EPKSCDKTHTCPPCP

SEQ ID NO: 118: Последовательность аминокислот CH2



APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

SEQ ID NO: 119: Последовательность аминокислот CH3 с мутациями KK

5 GQPREPQVYTKPPSREEMTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS  
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 120: Последовательность аминокислот CH3 с мутациями DE

10 GQPREPQVYTDPPSREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS  
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ обнаружения присутствия в образце кластеризации по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности, включающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, причем указанный способ включает:

приведение в контакт образца, в котором указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности были подвергнуты воздействию агента, обладающего специфичностью связывания в отношении по меньшей мере указанных первой и второй группировок клеточной поверхности, с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, и второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, причем по меньшей мере одна из первой связывающей молекулы и второй связывающей молекулы содержит молекулярную метку, которая не обнаруживается, если указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности не находятся вблизи друг от друга; и

обнаружение присутствия или отсутствия молекулярной метки для обнаружения присутствия в образце кластеризации первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности.

2. Способ количественной оценки присутствия в образце кластеризации по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности, включающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, причем указанный способ включает:

приведение в контакт образца, в котором указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности были подвергнуты воздействию агента, обладающего специфичностью связывания в отношении по меньшей мере указанных первой и второй группировок клеточной поверхности, с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, и второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, причем по меньшей мере одна из первой связывающей молекулы и второй связывающей молекулы содержит молекулярную метку, которая не обнаруживается, если указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности не находятся вблизи друг от друга; и

измерение количества молекулярной метки для количественной оценки присутствия в образце кластеризации первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности.

5 3. Способ по п. 1 или 2, где указанный способ включает:

- а) приведение в контакт образца с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, и второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности,

10 где указанная первая связывающая молекула содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная вторая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку; или

б) приведение в контакт образца с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, и второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности,

15 где указанная вторая связывающая молекула содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная первая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку;

20 - индукцию отщепления молекулярной метки; и

- обнаружение присутствия или отсутствия, или измерение количества, высвобожденной молекулярной метки, с осуществлением за счет этого обнаружения или количественной оценки кластеризации первой группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности в образце.

25

4. Способ по п. 1 или 2, причем указанный способ включает:

- а) приведение в контакт образца с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, и третьей связывающей молекулой,

30

где указанная первая связывающая молекула содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная третья связывающая молекула

связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку; или

b) приведение в контакт образца с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, и третьей связывающей молекулой,

где указанная вторая связывающая молекула содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная третья связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку; или

c) приведение в контакт образца с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, и третьей связывающей молекулой,

где указанная первая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку, и указанная третья связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером; или

d) приведение в контакт образца с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, и третьей связывающей молекулой,

где указанная вторая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку, и указанная третья связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером;

- индукцию отщепления молекулярной метки; и  
- обнаружение присутствия или отсутствия, или измерение количества, высвобожденной молекулярной метки, с осуществлением за счет этого обнаружения или количественной оценки кластеризации первой группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности в образце.

5. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что указанный способ включает:

- а) приведение в контакт образца с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, третьей связывающей молекулой и четвертой связывающей молекулой,

5 где указанная третья связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, и указанная четвертая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку; или

10 б) приведение в контакт образца с первой связывающей молекулой, которая специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, второй связывающей молекулой, которая специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, третьей связывающей молекулой и четвертой связывающей молекулой,

15 где указанная третья связывающая молекула связывается с указанной первой связывающей молекулой и содержит индуцирующую расщепление группировку; и указанная четвертая связывающая молекула связывается с указанной второй связывающей молекулой и содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером,

- индукцию отщепления молекулярной метки; и

20 - обнаружение присутствия или отсутствия, или измерение количества, высвобожденной молекулярной метки, с осуществлением за счет этого обнаружения или количественной оценки кластеризации первой группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности в образце.

25 6. Способ по любому из пп. 1 - 5, отличающийся тем, что образец представляет собой образец ткани, образец крови или культивированные клетки, предпочтительно из организма субъекта или пациента.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что образец представляет собой свежий образец или фиксированный образец.

30

8. Способ по любому из пп. 1 - 7, отличающийся тем, что образец представляет собой образец биопсии опухоли из организма субъекта, имеющего рак.

9. Способ обнаружения экспрессии в образце по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности, включающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, причем указанный способ включает

5           приведение в контакт образца биопсии опухоли из организма субъекта, имеющего рак, с по меньшей мере одной связывающей молекулой, которая обнаруживает первую группировку клеточной поверхности, и с по меньшей мере одной связывающей молекулой, которая обнаруживает вторую группировку клеточной поверхности,

10           где по меньшей мере одна связывающая молекула, которая обнаруживает указанную первую группировку клеточной поверхности, и по меньшей мере одна связывающая молекула, которая обнаруживает указанную вторую группировку клеточной поверхности, содержат молекулярную метку;

и

15           обнаружение присутствия или отсутствия указанных молекулярных меток для обнаружения экспрессии в образце первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности.

10. Способ количественной оценки экспрессии в образце по меньшей мере двух группировок клеточной поверхности, включающих первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, причем указанный способ

20           включает приведение в контакт образца биопсии опухоли из организма субъекта, имеющего рак, с по меньшей мере одной связывающей молекулой, которая обнаруживает первую группировку клеточной поверхности, и с по меньшей мере одной связывающей молекулой,

25           которая обнаруживает вторую группировку клеточной поверхности, где по меньшей мере одна связывающая молекула, которая обнаруживает указанную первую группировку клеточной поверхности, и по меньшей мере одна связывающая молекула, которая обнаруживает указанную вторую группировку клеточной поверхности, содержат молекулярную метку;

30           и

измерение количества указанных молекулярных меток, чтобы количественно оценить экспрессию первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности в образце.

5           11. Способ по любому из пп. 1 - 10, отличающийся тем, что указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности экспрессируются одной клеткой или одним типом клеток.

10           12. Способ по любому из пп. 1 - 10, отличающийся тем, что указанные первая и вторая группировки клеточной поверхности экспрессируются различными клетками или различными типами клеток.

15           13. Способ по любому из пп. 1 - 10, отличающийся тем, что указанная первая группировка клеточной поверхности экспрессируется иммунной эффекторной клеткой, в частности, NK-клеткой, Т-клеткой, В-клеткой, моноцитом, макрофагом, дендритной клеткой или нейтрофильным гранулоцитом, а указанная вторая группировка клеточной поверхности экспрессируется опухолевой клеткой или иммунной клеткой.

20           14. Способ по любому из пп. 1 - 13, отличающийся тем, что по меньшей мере одна группировка клеточной поверхности представляет собой CD137 или другую костимулирующую группировку эффекторных иммунных клеток.

25           15. Способ по любому из пп. 1 - 14, отличающийся тем, что по меньшей мере одна группировка клеточной поверхности представляет собой PD-L1 или другую ассоциированную с опухолью группировку или группировку контрольной точки.

30           16. Способ по любому из пп. 1 - 15, отличающийся тем, что по меньшей мере одна группировка клеточной поверхности представляет собой CD137 или другую костимулирующую группировку эффекторных иммунных клеток, и по меньшей мере одна группировка клеточной поверхности представляет собой PD-L1 или другую ассоциированную с опухолью группировку или группировку контрольной точки.

17. Способ по любому из пп. 1 - 8 и 11 - 16, отличающийся тем, что агент, который способен специфично связываться с указанными группировками клеточной поверхности, представляет собой мультиспецифическое антитело, такое как биспецифическое или триспецифическое антитело.

5

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что мультиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело, которое связывается с CD137 или другой костимулирующей молекулой эффекторных иммунных клеток и PD-L1 или другой ассоциированной с опухолью группировкой или группировкой иммунной контрольной точки.

10

19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что связывающий домен биспецифического антитела, которое связывается с CD137, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 19, 23, 27, 30, 34, 38, 42, 45, 48 или 52, с допустимым присутствием одной, двух или трех замен аминокислот в них, предпочтительно одной замены аминокислоты.

15

20. Способ по п. 18 или 19, отличающийся тем, что связывающий домен биспецифического антитела, которое связывается с CD137, содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 21, 25, 32, 36, 40, 44 или 50, с допустимым присутствием одной, двух или трех замен аминокислот в них, предпочтительно одной замены аминокислоты; и/или CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 22, 26, 29, 33, 37, 41, 47 или 51, с допустимым присутствием одной, двух или трех замен аминокислот в них, предпочтительно одной замены аминокислоты.

20

25

21. Способ по любому из пп. 18 - 20, отличающийся тем, что связывающий домен биспецифического антитела, которое связывается с CD137, содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую любую из последовательностей SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 20, 24, 28, 31, 35, 39, 43, 46 или 49, или по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 99% идентичность последовательности с ними, в частности, по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 99% идентичность последовательности с их каркасными областями.

30



22. Способ по любому из пп. 18 - 21, отличающийся тем, что связывающий домен биспецифического антитела, которое связывается с PD-L1, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 56, 58, 61, 72, 76, 80, 84, 88, 91, 95, 99, 102 или 106, с допустимым присутствием одной, двух или трех замен аминокислот в них, предпочтительно одной замены аминокислоты.

23. Способ по любому из пп. 18 - 22, отличающийся тем, что связывающий домен биспецифического антитела, которое связывается с PD-L1, содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 54, 60, 65, 68, 70, 74, 78, 82, 86, 90 или 93, с допустимым присутствием одной, двух или трех замен аминокислот в них, предпочтительно одной замены аминокислоты; и/или CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 55, 3, 63, 66, 71, 75, 79, 83, 87, 94, 98, 101, 105 или 108, с допустимым присутствием одной, двух или трех замен аминокислот в них, предпочтительно одной замены аминокислоты.

24. Способ по любому из пп. 18 - 23, отличающийся тем, что связывающий домен биспецифического антитела, которое связывается с PD-L1, содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую любую из последовательностей SEQ ID NO: 53, 57, 59, 62, 64, 67, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 92, 96, 97, 100, 103, 104 или 107, или по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 99% идентичность последовательности с ними, в частности, по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 99% идентичность последовательности с их каркасными областями.

25. Способ прогнозирования способности субъекта, в частности, имеющего рак пациента, отвечать на агент или агенты, связывающие первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, в частности, группировку, экспрессируемую на иммунной эффекторной клетке, и молекулу, экспрессируемую на опухолевой клетке или иммунной клетке, причем указанный способ включает:

- обнаружение уровней экспрессии первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности в биологическом образце из организма субъекта;

- определение того, являются ли уровни экспрессии первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности в образце из организма субъекта более высокими или более низкими, чем пороговый уровень; и

5 - прогнозирование того, что субъект вероятно ответит на агент или агенты, связывающие первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, если уровни экспрессии первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности в образце из организма субъекта равны или выше порогового уровня.

10 26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что уровни экспрессии первой группировки клеточной поверхности и второй группировки клеточной поверхности измеряют с применением способа по любому из пп. 9 - 16.

15 27. Способ лечения нуждающегося в этом субъекта, в частности, имеющего рак субъекта, причем указанный способ включает:

- прогнозирование способности субъекта отвечать на агент или агенты, связывающие первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности, с применением способа по п. 25 или 26; и

20 - введение агента или агентов, связывающих указанную первую группировку клеточной поверхности и указанную вторую группировку клеточной поверхности, субъекту, у которого вероятно будет ответ.

25 28. Способ по любому из пп. 25 - 27, отличающийся тем, что по меньшей мере одна группировка клеточной поверхности представляет собой CD137 или другую костимулирующую группировку эффекторных иммунных клеток.

29. Способ по любому из пп. 25 - 28, отличающийся тем, что по меньшей мере одна группировка клеточной поверхности представляет собой PD-L1 или другую ассоциированную с опухолью группировку или группировку контрольной точки.

30. Способ по любому из пп. 25 - 29, отличающийся тем, что по меньшей мере одна группировка клеточной поверхности представляет собой CD137 и по меньшей мере одна группировка клеточной поверхности представляет собой PD-L1.

5 31. Способ по любому из пп. 25 - 30, отличающийся тем, что агент, связывающий группировки клеточной поверхности, представляет собой мультиспецифическое антитело, такое как биспецифическое или триспецифическое антитело, в частности, биспецифическое антитело, которое специфично связывается с CD137 или другой костимулирующей группировкой эффекторных иммунных клеток и PD-L1 или другой ассоциированной с опухолью группировкой или группировкой иммунной контрольной точки, по любому из пп. 10 17 - 24.

32. Способ определения эффективности агента, где указанный агент содержит по меньшей мере связывающий домен, который специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, и связывающий домен, который специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, причем указанный способ включает обнаружение кластеризации первой группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности в биологическом образце из организма субъекта, проходящего лечение указанным агентом, с применением способа по любому из пп. 1 - 24.

20 33. Способ определения эффективности агента, где указанный агент содержит по меньшей мере связывающий домен, который специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, и связывающий домен, который специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, причем указанный способ включает количественную оценку кластеризации первой группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности в биологическом образце из организма субъекта, проходящего лечение указанным агентом, с применением способа по любому из пп. 1 - 24.

30 34. Способ подтверждения механизма действия агента, где указанный агент содержит по меньшей мере связывающий домен, который специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, и связывающий домен, который специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, причем указанный способ

включает обнаружение кластеризации первой группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности в биологическом образце из организма субъекта, проходящего лечение указанным агентом, с применением способа по любому из пп. 1 - 24.

5           35. Способ подтверждения механизма действия агента, где указанный агент содержит по меньшей мере связывающий домен, который специфично связывается с первой группировкой клеточной поверхности, и связывающий домен, который специфично связывается со второй группировкой клеточной поверхности, причем указанный способ  
10 включает количественную оценку кластеризации первой группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности в биологическом образце из организма субъекта, проходящего лечение указанным агентом, с применением способа по любому из пп. 1 - 24.

15           36. Способ по п. 34 или 35, отличающийся тем, что механизм действия представляет собой одновременное связывание агента с первой и второй группировками клеточной поверхности.

20           37. Способ по п. 34 или 35, отличающийся тем, что механизм действия представляет собой кластеризацию двух или более группировок клеточной поверхности.

            38. Способ по п. 37, отличающийся тем, что происходит кластеризация двух или более группировок клеточной поверхности, экспрессируемых на иммунной эффекторной клетке, в частности, кластеризация двух или более белков CD137.

25           39. Способ лечения нуждающегося в этом субъекта, в частности, имеющего рак субъекта, причем указанный способ включает:

            -лечение субъекта агентом, связывающим первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности;

30           -анализ эффективности агента или механизма действия агента с применением способа по любому из пп. 32 - 38.

40. Способ по п. 39, дополнительно включающий продолжение или корректировку лечения на основании результата анализа или подтверждения.

41. Способ скрининга одного или более исследуемых агентов на способность вызывать кластеризацию по меньшей мере первой группировки клеточной поверхности со второй группировкой клеточной поверхности, причем указанный способ включает:

- приведение в контакт одной или более исследуемых культур клеток с исследуемым агентом,

где исследуемая культура клеток содержит клетку, экспрессирующую первую группировку клеточной поверхности, и клетку, экспрессирующую вторую группировку клеточной поверхности;

- обнаружение или количественную оценку уровня кластеризации указанных первой и второй группировок клеточной поверхности с применением способа по любому из пп. 1 - 24; и

- сравнение указанного уровня кластеризации с уровнем кластеризации, обнаруживаемом для кластеризации в контрольной культуре клеток, которую не приводили в контакт с исследуемым агентом или приводили в контакт с контрольным агентом,

причем контрольная культура клеток содержит первую группировку клеточной поверхности и вторую группировку клеточной поверхности.

42. Способ по п. 41, дополнительно включающий выбор исследуемого агента, который вызывает равный или более высокий уровень кластеризации, чем уровень кластеризации в контрольной культуре клеток.

43. Способ по п. 41 или 42, отличающийся тем, что по меньшей мере одна группировка клеточной поверхности представляет собой CD137 или другую костимулирующую группировку эффекторных иммунных клеток.

44. Способ по любому из пп. 41 - 43, отличающийся тем, что по меньшей мере одна группировка клеточной поверхности представляет собой PD-L1 или другую ассоциированную с опухолью группировку или молекулу контрольной точки.

5 45. Способ по любому из пп. 41 - 44, отличающийся тем, что по меньшей мере одна группировка клеточной поверхности представляет собой CD137, и по меньшей мере одна группировка клеточной поверхности представляет собой PD-L1.

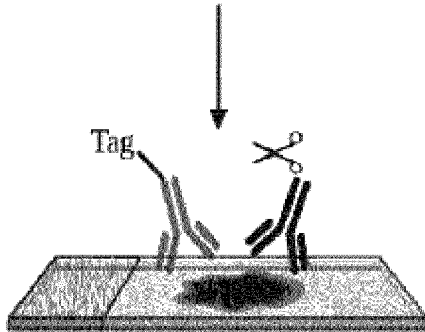
10 46. Способ по любому из пп. 41 - 45, отличающийся тем, что референсный агент представляет собой мультиспецифическое антитело, которое специфично связывается с CD137 или другой костимулирующей группировкой эффекторных иммунных клеток и PD-L1 или другой ассоциированной с опухолью группировкой или группировкой иммунной контрольной точки, по любому из пп. 17 - 24.

15 47. Набор, содержащий по меньшей мере две связывающие молекулы, которые специфично связываются с первой и второй группировками клеточной поверхности, необязательно где одна из указанных связывающих молекул содержит молекулярную метку, присоединенную к ней расщепляемым линкером, а другая связывающая молекула содержит индуцирующую расщепление группировку, и инструкции по приведению в контакт образца из  
20 организма пациента с указанными по меньшей мере двумя связывающими молекулами, опционально с индукцией расщепления молекулярной метки; и по обнаружению присутствия или отсутствия сигнала, индуцированного приведением в контакт образца из организма пациента с указанными по меньшей мере двумя связывающими молекулами.

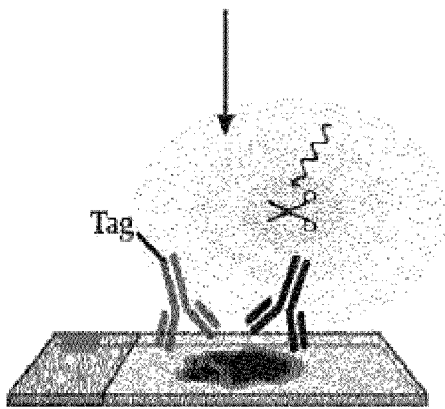
# Фигура 1



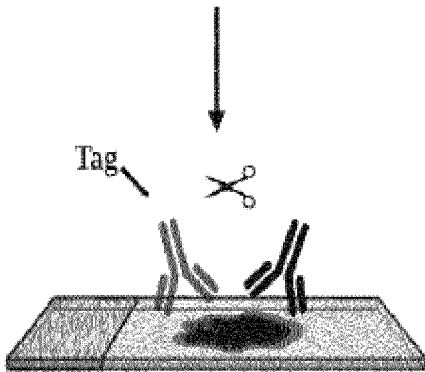
Демаскировка антигенов



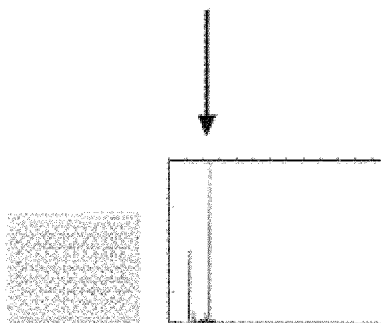
Инкубация с антителом



Фотоактивация  
индуцирующей расщепление  
группировки

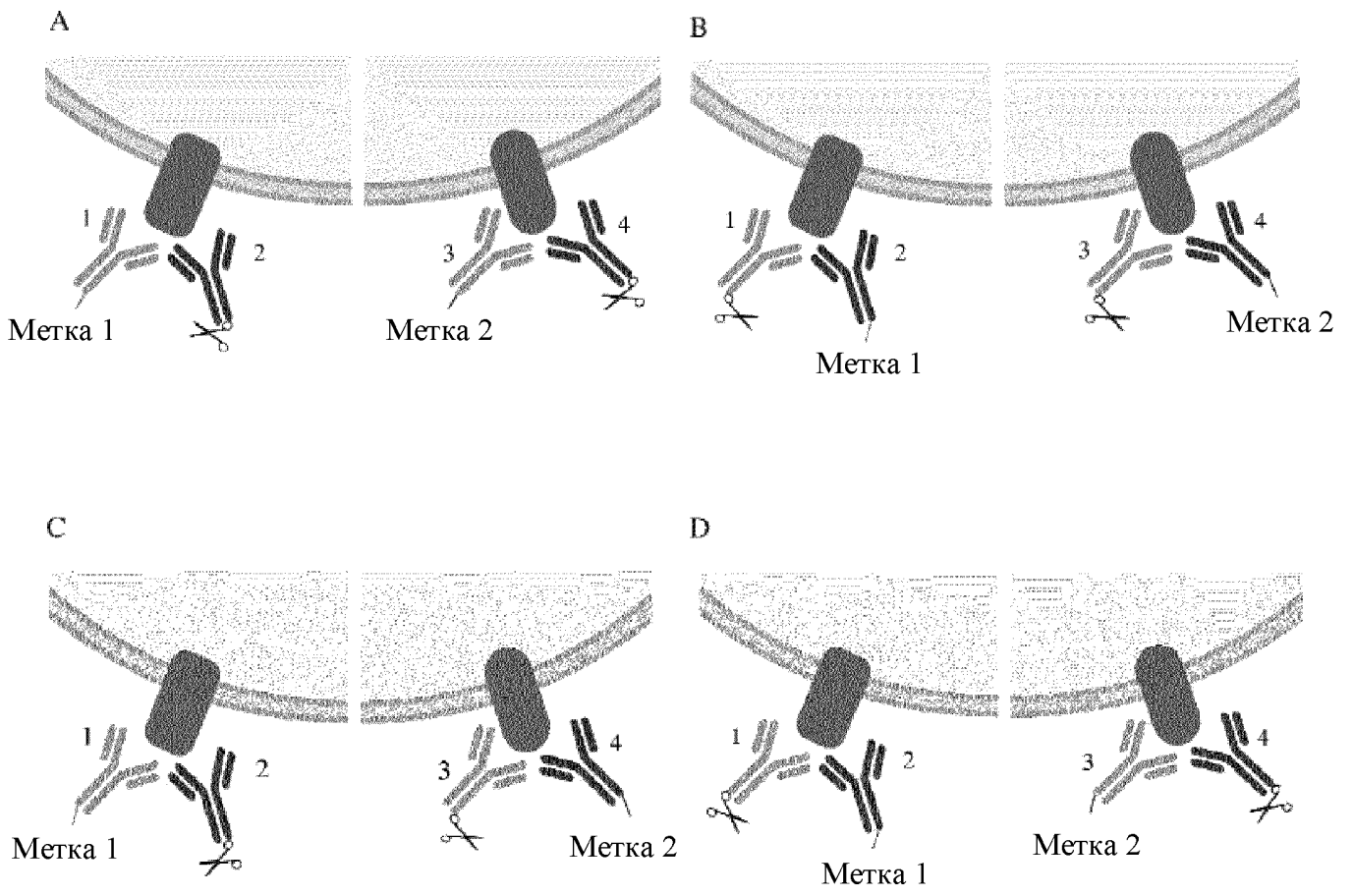


Высвобождение VeraTag



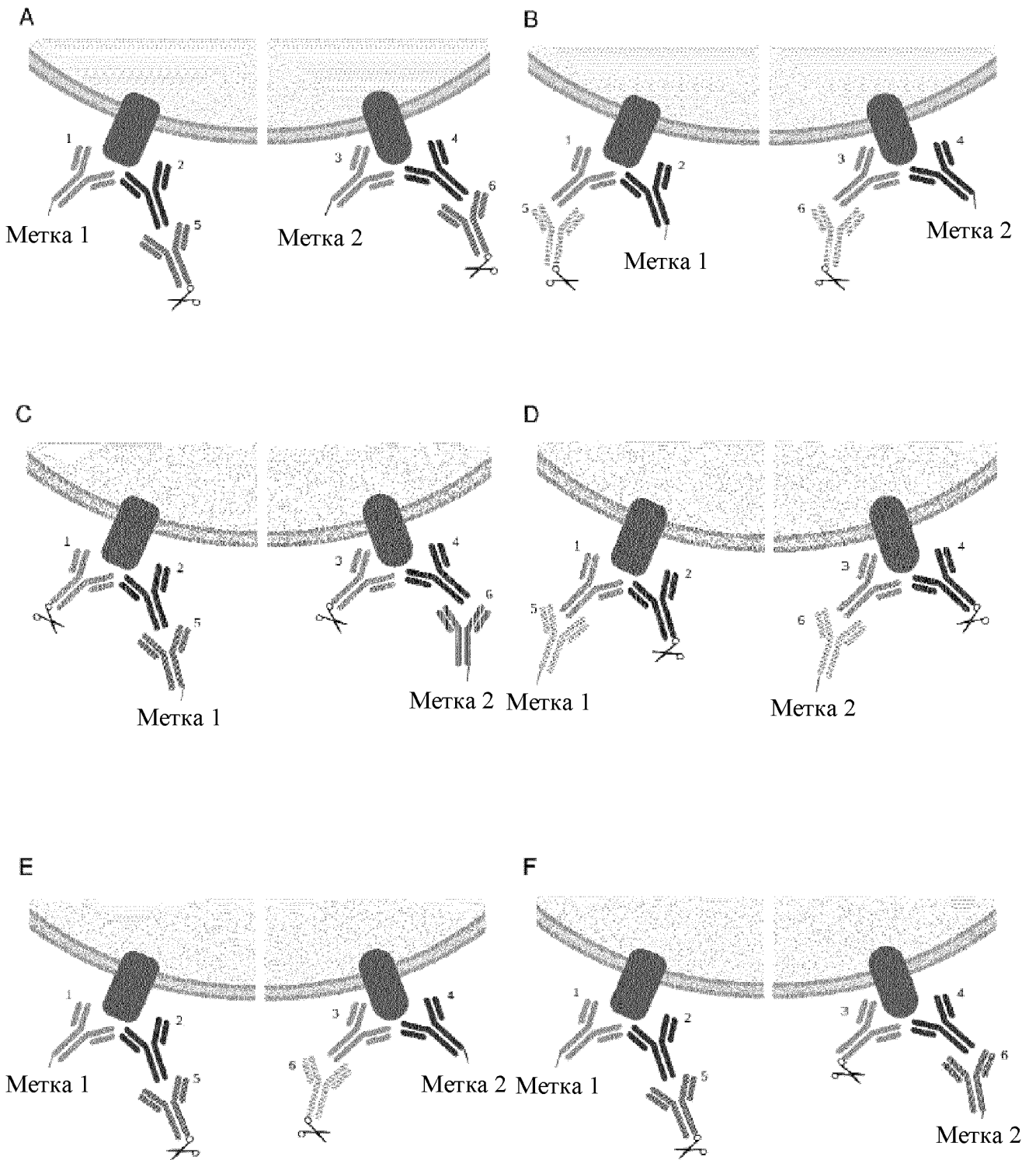
Количественный анализ  
VeraTag на КЭ

# Фигура 2

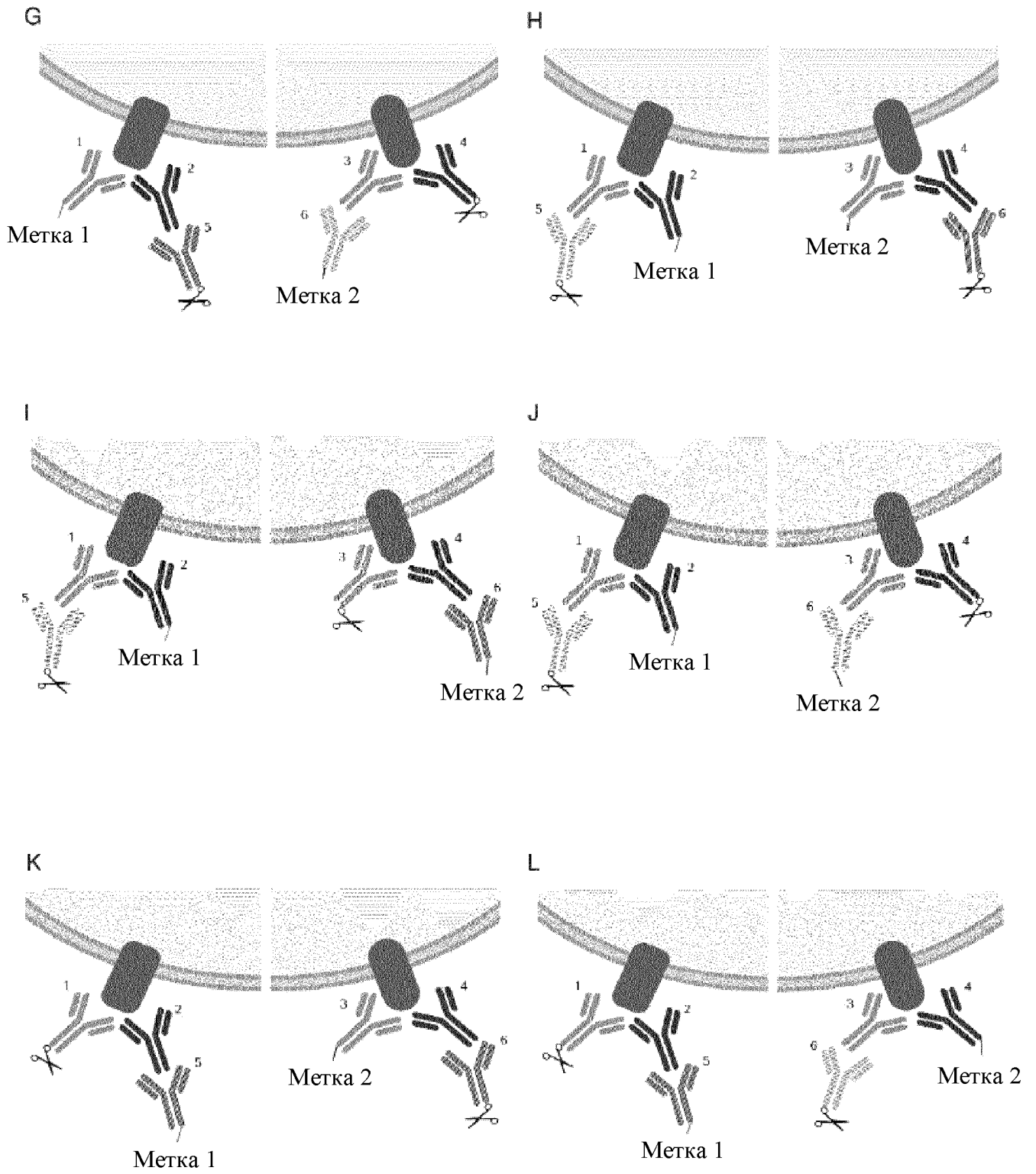




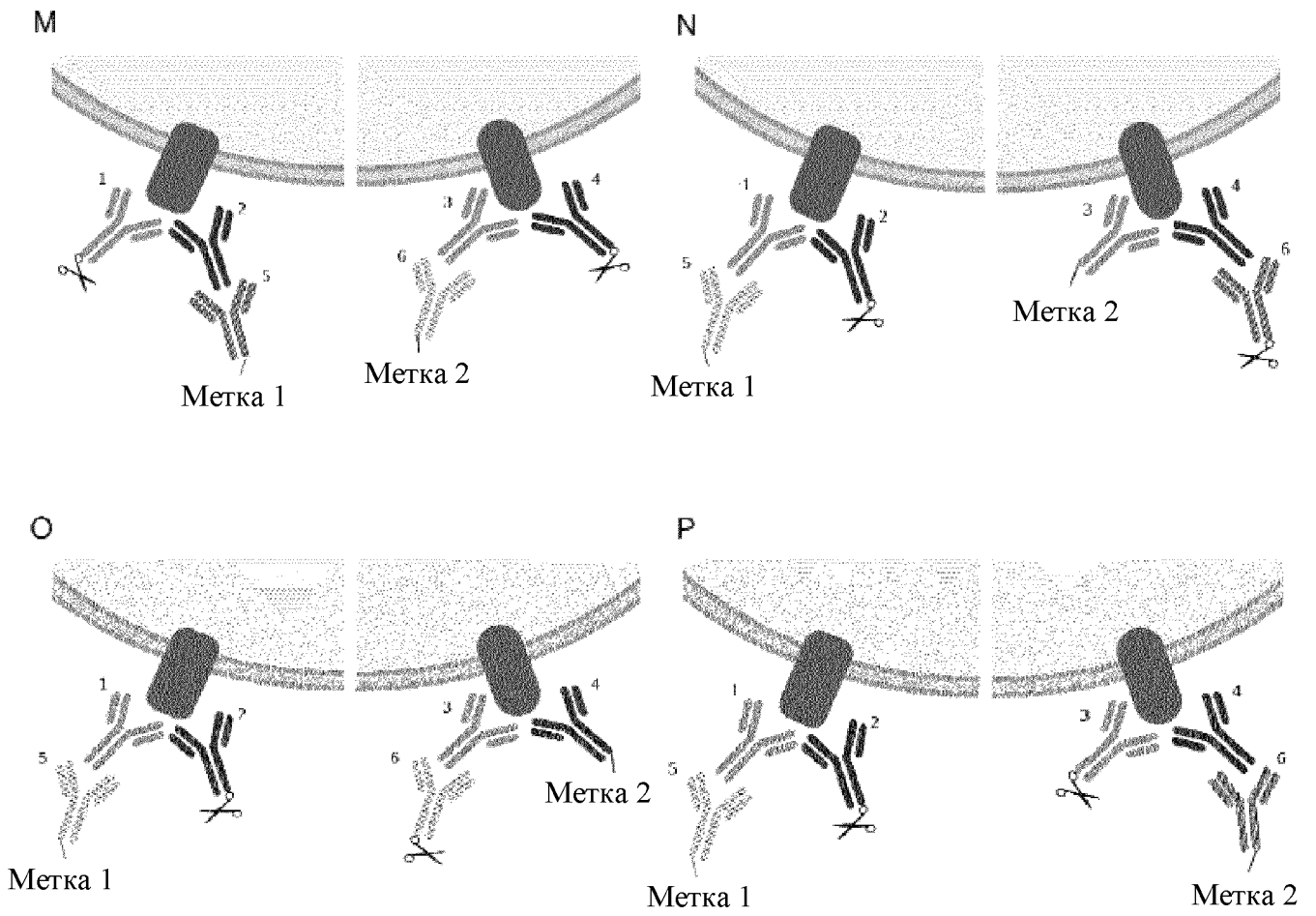
Фигура 3



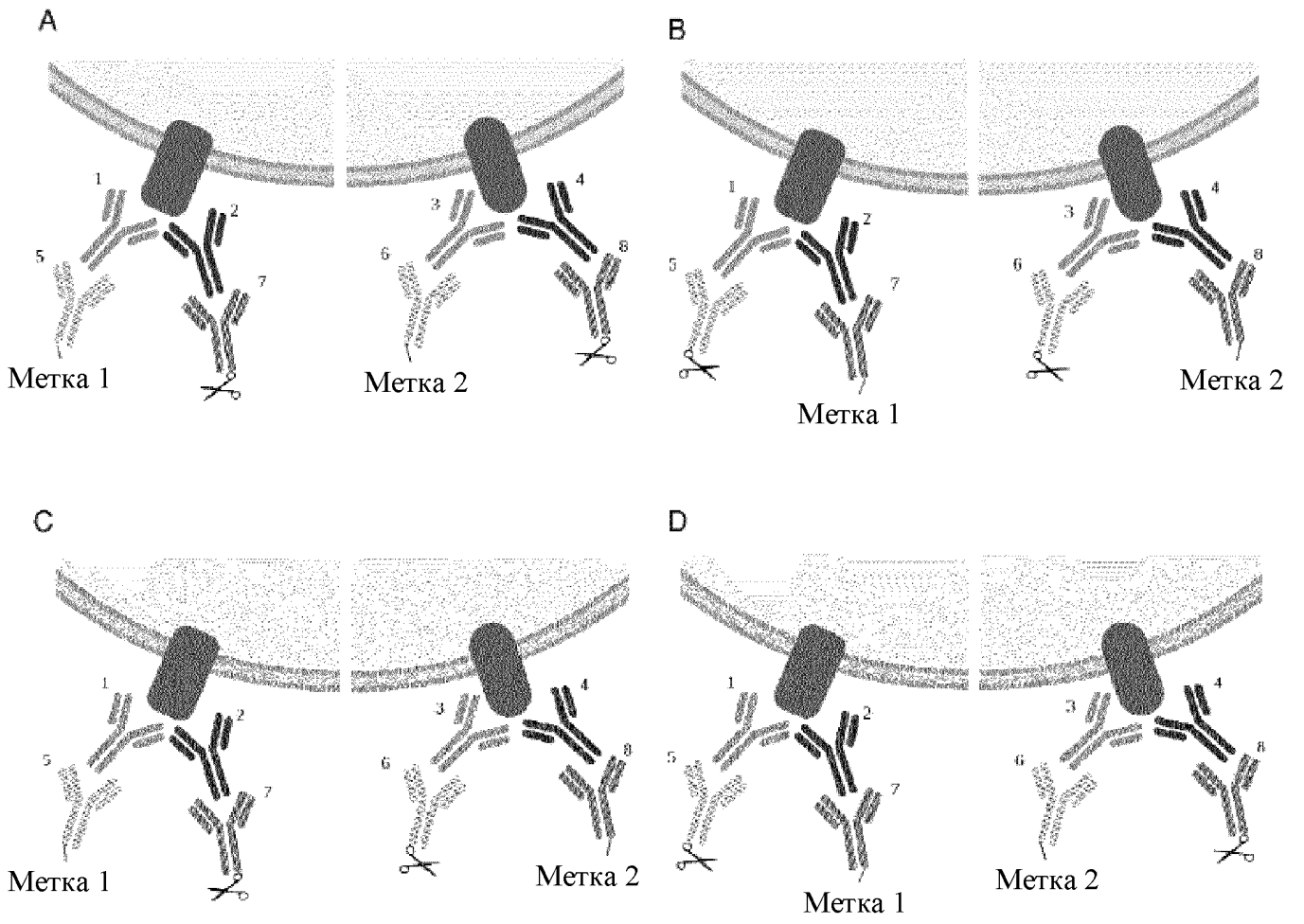
## Фигура 3 (продолжение)



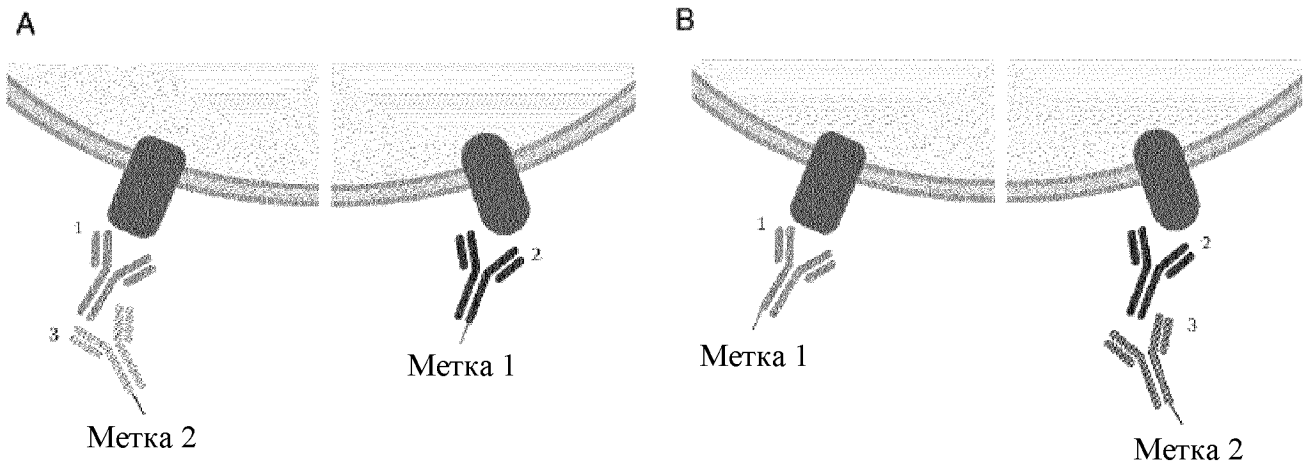
### Фигура 3 (продолжение)



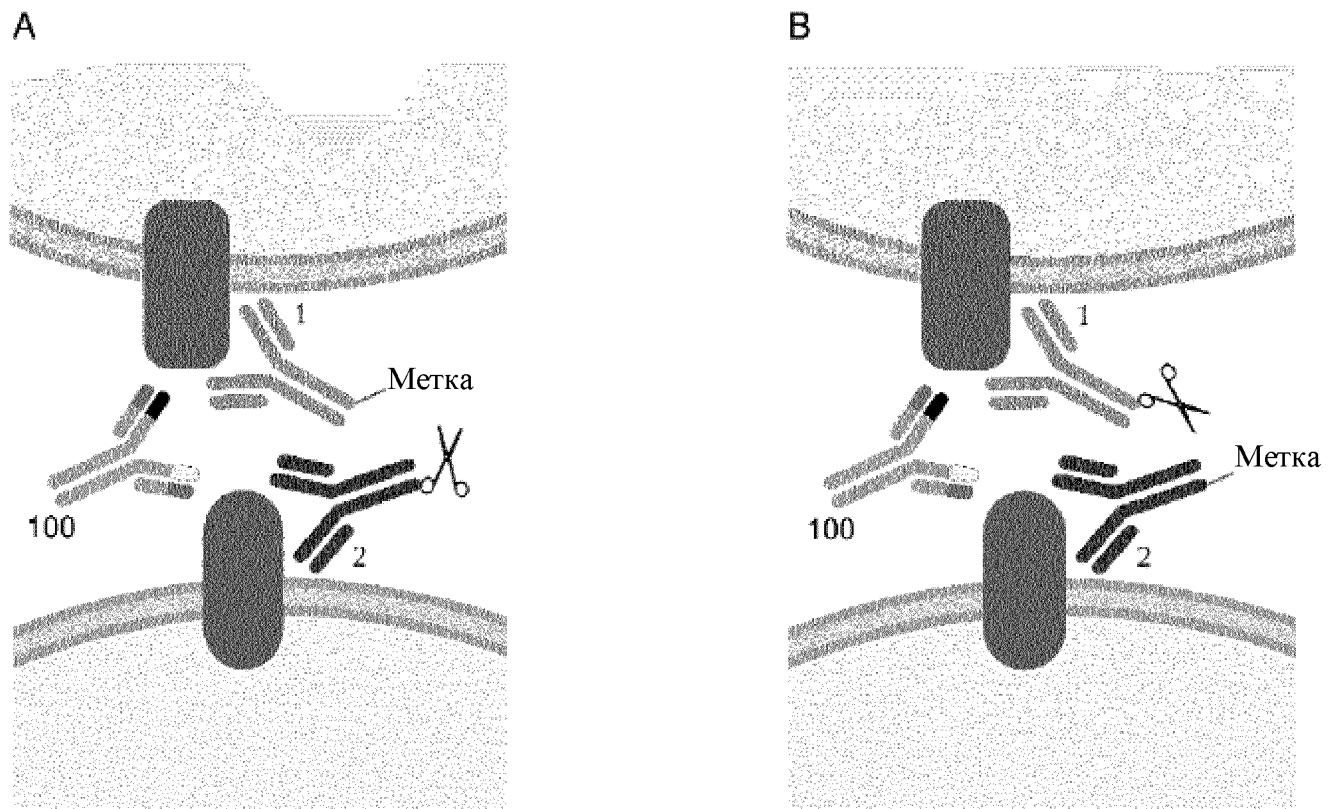
Фигура 4



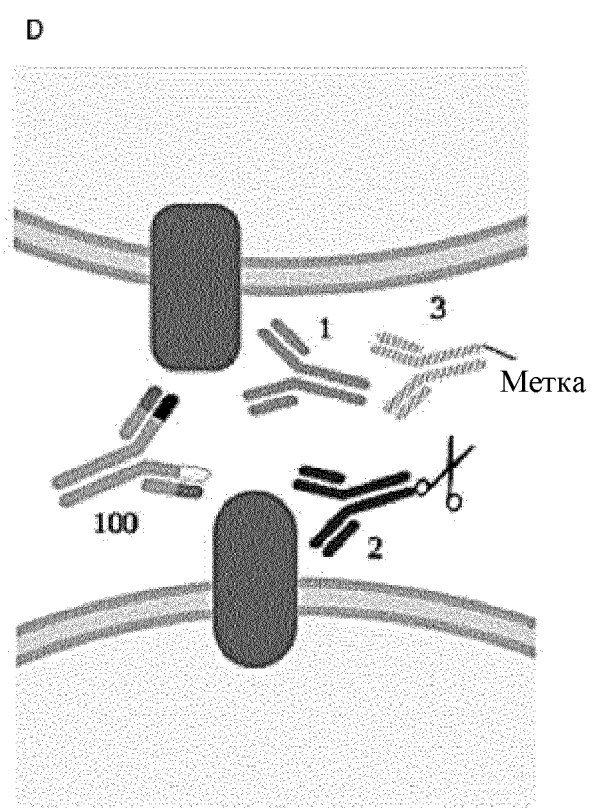
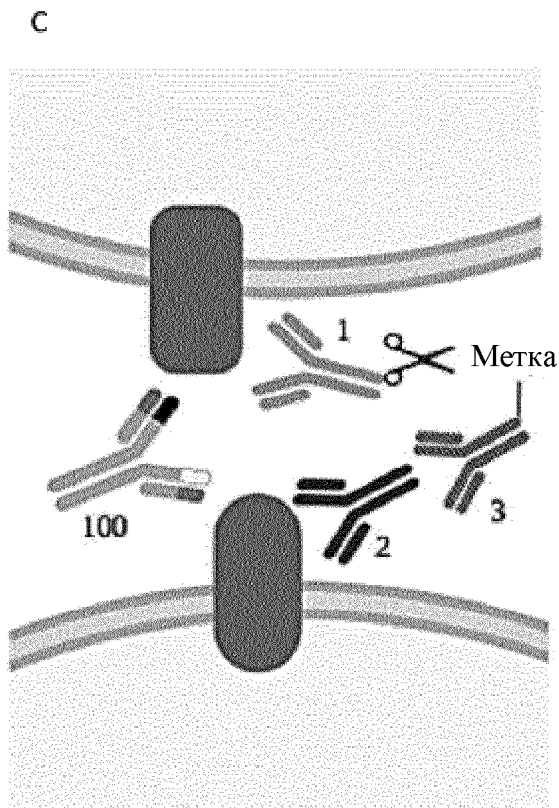
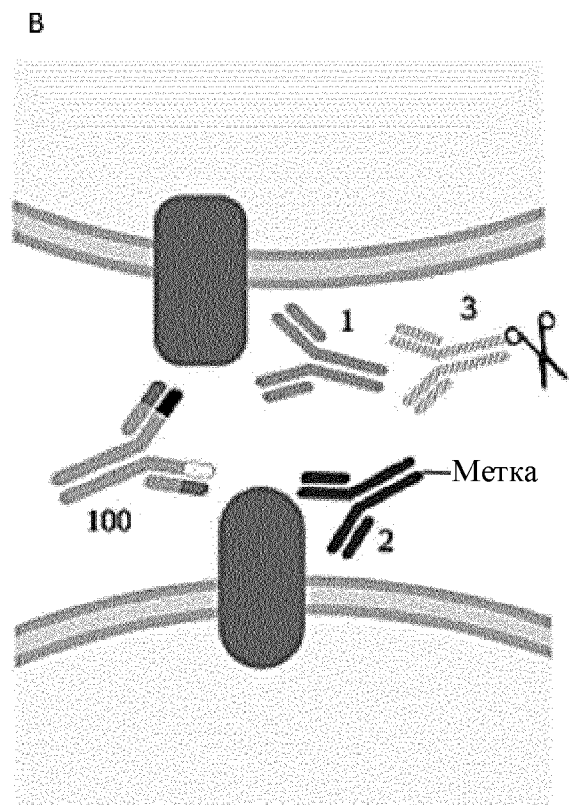
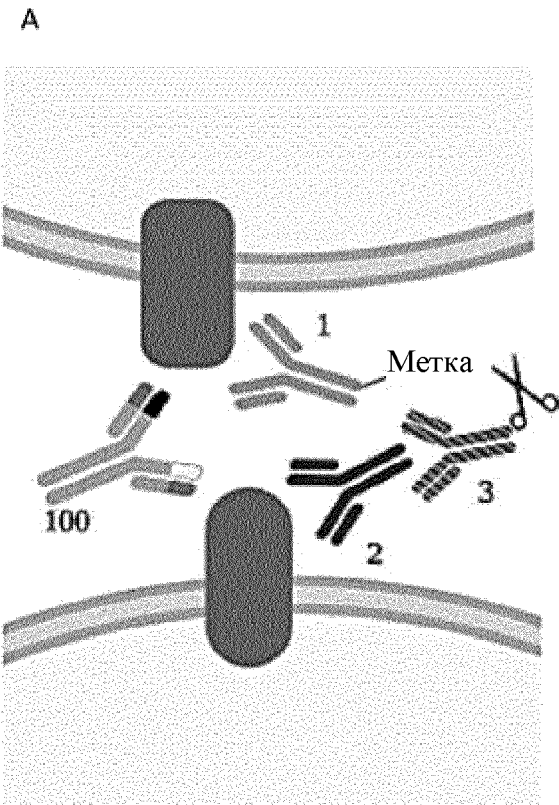
**Фигура 5**



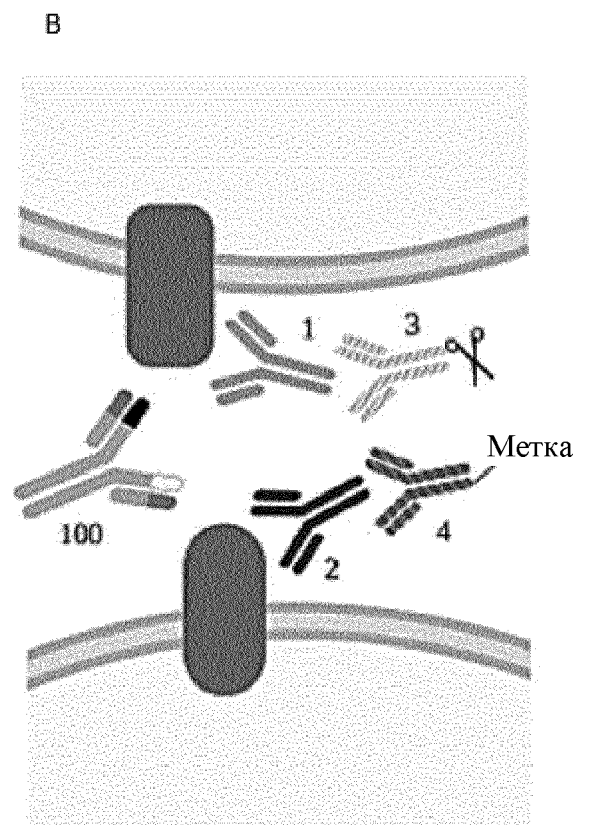
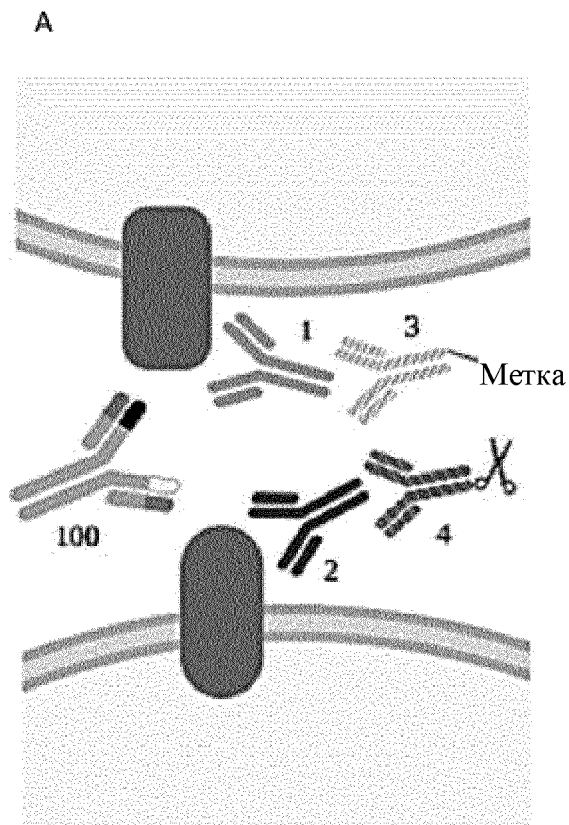
**Фигура 6**



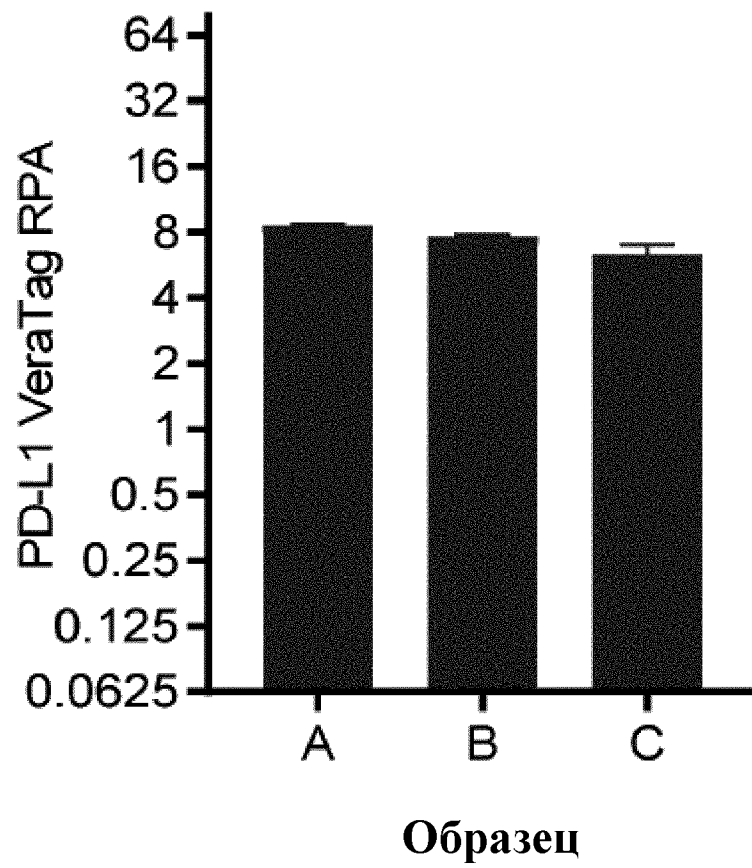
Фигура 7



# Фигура 8

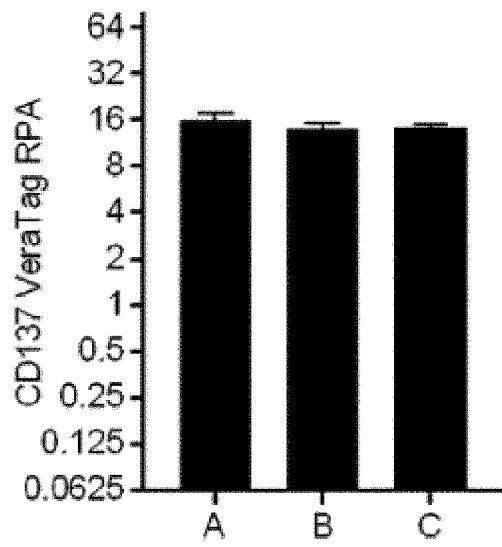


Фигура 9

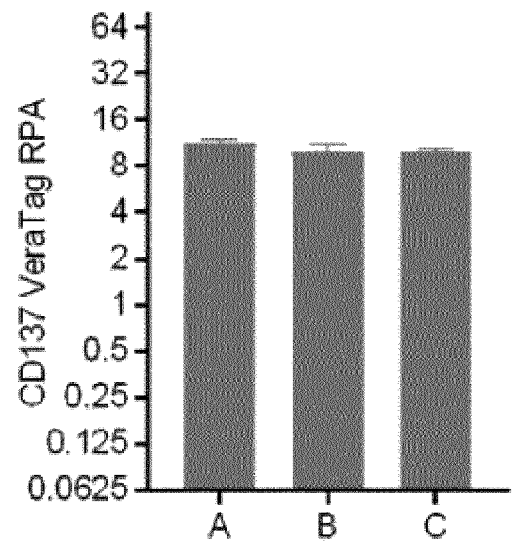




Фигура 10

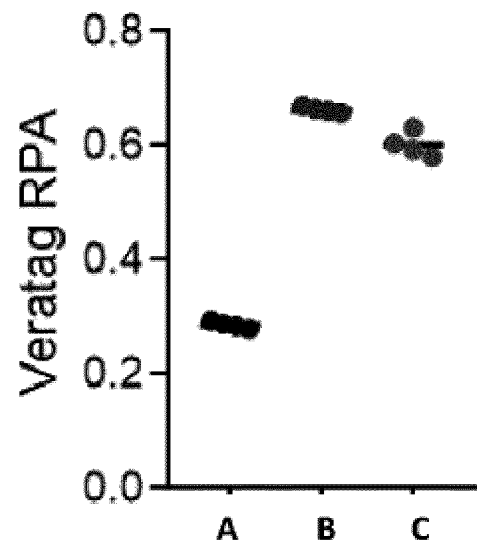
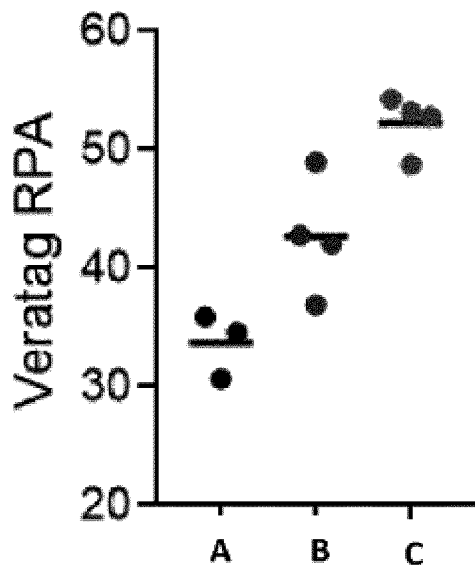


Образец

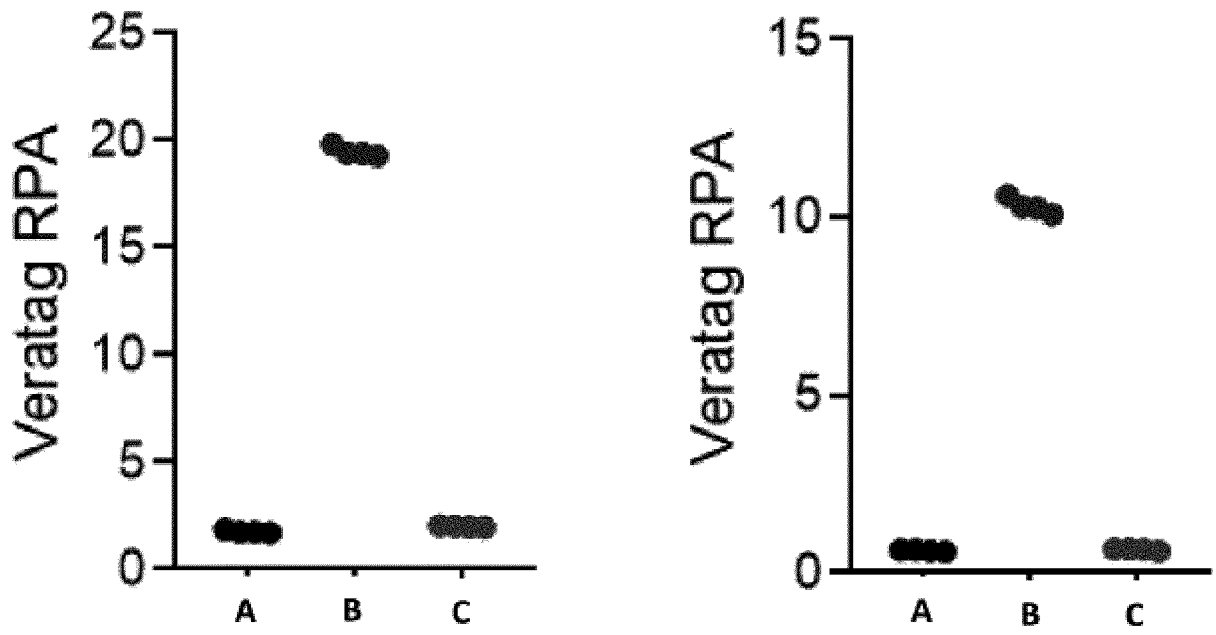


Образец

Фигура 11

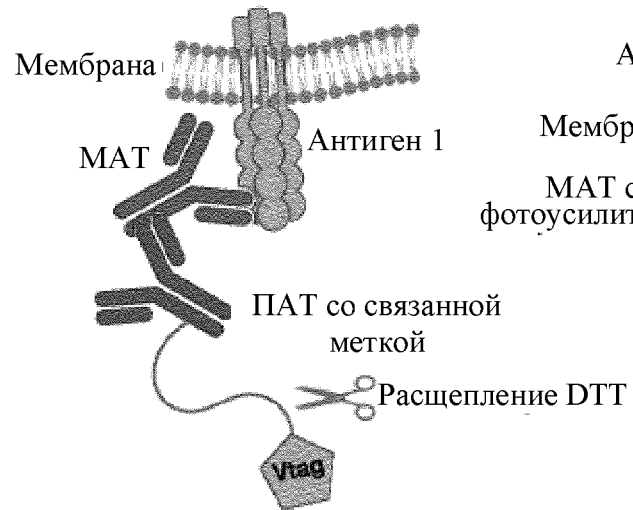


Фигура 12

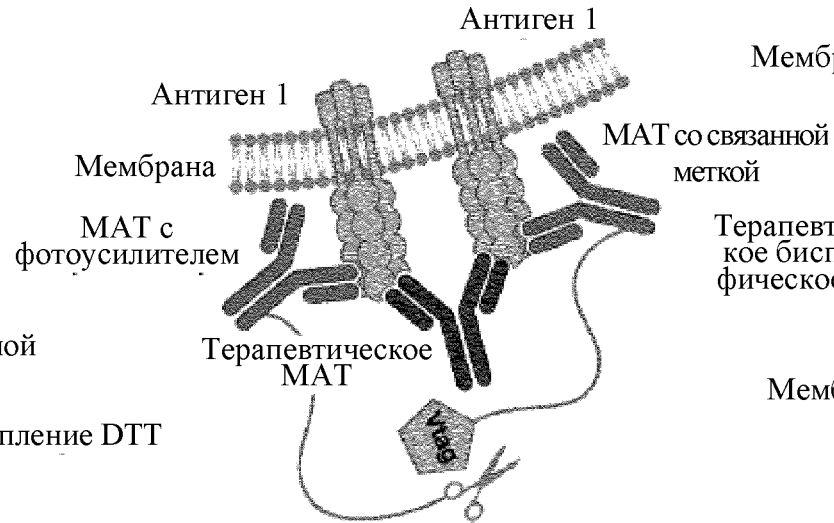


## Фигура 13

### А. Экспрессия рецептора



### В. Близость рецепторов *in cis* (кластеризация)



### С. Близость рецепторов *in trans* (синапс)

