

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392503** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.12.13**

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

(22) Дата подачи заявки  
**2022.03.09**

---

(54) **МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ АГЕНТЫ ПРОТИВ CD40 И CD137 В ТЕРАПИИ**

---

(31) **63/158,633**

(32) **2021.03.09**

(33) **US**

(86) **PCT/EP2022/056021**

(87) **WO 2022/189498 2022.09.15**

(71) Заявитель:

**ГЕНМАБ А/С (DK); БИОНТЕХ СЕ  
(DE)**

(72) Изобретатель:

**Фу Яли, Адамс Гомер, Баджадж  
Гаурав (US)**

(74) Представитель:

**Фелицына С.Б. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение в целом относится к области мультиспецифических связывающих агентов для применения в терапии, в частности для применения при лечении злокачественного заболевания, где связывающие агенты связываются с CD40 человека и CD137 человека.

**A1**

**202392503**

**202392503**

**A1**

## МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ АГЕНТЫ ПРОТИВ CD40 И CD137 В ТЕРАПИИ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее раскрытие в целом относится к области мультиспецифических связывающих агентов для применения в терапии, в частности для применения при лечении онкологических заболеваний, где связывающие агенты связываются с CD40 человека и CD137 человека.

Предшествующий уровень техники

CD40 является представителем семейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNF) (TNFR) и известен как костимулирующий белок, обнаруженный в различных типах клеток. CD40 конститутивно экспрессируется антигенпрезентирующими клетками (АПК), включая дендритные клетки (ДК), В-клетки и макрофаги. CD40 также может экспрессироваться эндотелиальными клетками, тромбоцитами, гладкомышечными клетками, фибробластами и эпителиальными клетками. В соответствии с его широко распространенной экспрессией на нормальных клетках, CD40 также экспрессируется в широком спектре опухолевых клеток.

Презентация пептидных антигенов в контексте молекул МНС класса II антигенспецифическим CD4<sup>+</sup> Т-клеткам вместе с костимулирующими сигналами (CD80 и/или CD86) приводит к активации CD4<sup>+</sup> Т-клеток и положительной регуляции факторов лицензирования ДК, лиганда CD40 (CD40L) и лимфотоксина- $\alpha 1\beta 2$  (LT $\alpha 1\beta 2$ ). Экспрессия CD40L и LT LT $\alpha 1\beta 2$  на активированных антигенспецифических CD4<sup>+</sup> Т-клетках индуцирует передачу сигналов через CD40 и LT $\beta$ -рецептор (LT $\beta$ R), и это дает ДК разрешение на индуцирование CD8<sup>+</sup> Т-клеточных ответов. Передача сигналов CD40 приводит к выработке интерлейкина-12 (IL-12) и положительной регуляции CD70, CD86, лиганда 4-1BB (4-1BBL), лиганда OX40 (OX40L) и лиганда GITR (GITRL), тогда как передача сигналов LT $\beta$ R приводит к выработке интерферонов I типа (IFN). Сигнальная система, контролирующая активность ядерного фактора каппаВ (NF- $\kappa$ B), реагирует практически на всех представителей суперсемейства TNFR. Молекулярные паттерны, связанные с патогенами (PAMP), и молекулярные паттерны, связанные с повреждением (DAMP), также способствуют этим событиям. Примирование CD8<sup>+</sup> Т-клеток пептидами, ограниченными МНС класса I, приводит к усилению регуляции CD27, 4-1BB, OX40 и глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка (GITR). Стимуляция этих рецепторов на CD8<sup>+</sup> Т-клетках когнатными им лигандами суперсемейства TNF в сочетании с IL-12 и IFN типа I приводит к сильной активации, пролиферации и

эффекторной функции CD8<sup>+</sup> Т-клеток, а также к образованию и поддержанию CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти. Антитела к CD40 могут оказывать различное действие, такое как уничтожение экспрессирующих CD40 опухолевых клеток путем индукции антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ), комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ) или антитело-зависимого клеточно-опосредованного фагоцитоза (АЗКФ), индукции передачи сигналов клеткам для индукции прямого апоптоза или остановки роста, а также, независимо от экспрессии CD40 на опухолевых клетках, путем лицензирования АПК для стимуляции противоопухолевого иммунного ответа. Антитела, связывающиеся с CD40, могут запускать CD40 на АПК для запуска эффекторных цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) и индуцировать высвобождение IL-2 этими клетками, а также косвенно активировать NK-клетки. Антитела, стимулирующие CD40, были описаны в уровне техники и включают CP-870893, человеческое антитело IgG2 (WO 03/040170); дацетузумаб, гуманизированное антитело IgG1 (WO 00/075348) и Chi Lob 7/4, химерное антитело IgG1 (US 2009/0074711). Кроме того, было раскрыто антагонистическое антитело к CD40, лукатумумаб, человеческое антитело IgG1 (WO 02/028481).

CD137 (4-1BB) также является представителем семейства TNFR. CD137 является костимулирующей молекулой CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток, регуляторных Т-клеток (Treg), Т-клеток естественных киллеров (NK(Т)-клеток), В-клеток и нейтрофилов. На Т-клетках CD137 не экспрессируется конститутивно, но индуцируется при активации Т-клеточного рецептора (TCR) (например, на инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (TIL) (Gros et al., J. Clin Invest 2014;124(5):2246-59)). Стимуляция через природный лиганд 4-1BBL или антитела-агонисты приводит к передаче сигналов с использованием TRAF-2 и TRAF-1 в качестве адаптеров. Ранняя передача сигналов с помощью CD137 включает реакции полиубиквитинирования K-63, которые в конечном итоге приводят к активации ядерного фактора (NF)-κB и путей митогенактивируемой протеин (MAP)-киназы. Передача сигналов приводит к усилению костимуляции Т-клеток, пролиферации, продуцированию цитокинов, созреванию и пролонгированному выживанию CD8<sup>+</sup> Т-клеток. В различных доклинических моделях было показано, что агонистические антитела против CD137 способствуют противоопухолевому контролю со стороны Т-клеток (Murillo et al., Clin Cancer Res 2008;14(21):6895-906). Антитела, стимулирующие CD137, могут индуцировать выживание и пролиферацию Т-клеток, тем самым усиливая противоопухолевый иммунный ответ. Антитела, стимулирующие CD137, были описаны в предшествующем уровне техники и включают урелумаб, человеческое антитело IgG4 (AU 2004279877) и утомилумаб, человеческое антитело IgG2 (Fisher et al., 2012, Cancer Immunol. Immunother.

61: 1721-1733).

Westwood JA, et al., Leukemia Research 38 (2014), 948-954 раскрывают «Комбинированную терапию анти-CD137 и анти-CD40 антителами при мышинном гемабластозе, вызванном Мус». В WO 2018/011421 представлены связывающие агенты, такие как биспецифические антитела, связывающие CD40 человека и связывающие CD137 человека.

Однако, несмотря на эти достижения в данной области, существует значительная потребность в улучшенных методах лечения, нацеленных на CD40 и CD137.

#### Сущность изобретения

В первом аспекте в настоящем изобретении предлагается связывающий агент для применения в способе уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли или лечения онкологического заболевания у субъекта, где указанный способ включает введение указанному субъекту связывающего агента в подходящем количестве, при этом связывающий агент содержит первую область связывания, связывающуюся с CD40 человека, таким как CD40 человека, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, и вторую область связывания, связывающуюся с CD137 человека, таким как CD137 человека, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, и вторую область связывания, связывающуюся с CD137 человека, таким как CD137 человека, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38.

В одном воплощении первого аспекта подходящее количество связывающего агента представляет собой терапевтически эффективное и безопасное количество. Например, подходящее количество связывающего агента составляет около 0,04-2,5 мг/кг массы тела или около 3-200 мг в общей сложности; и/или около  $0,25 \times 10^{-9}$ - $16,9 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела или около  $20 \times 10^{-9}$ - $1350 \times 10^{-9}$  моль в общей сложности.

В одном воплощении первого аспекта связывающий агент вводят системно, предпочтительно внутривенно.

Во втором аспекте настоящее изобретение предлагает композицию, содержащую связывающий агент, содержащий первую область связывания, связывающуюся с CD40 человека, и вторую область связывания, связывающуюся с CD137 человека, где количество связывающего агента в композиции составляет около 3-200 мг или около  $20 \times 10^{-9}$  -  $1350 \times 10^{-9}$  моль.

В третьем аспекте настоящее изобретение предлагает композицию второго аспекта для применения в способе уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли или лечения злокачественной опухоли у субъекта.

В четвертом аспекте настоящее изобретение предлагает способ уменьшения или



предотвращения прогрессирования опухоли или лечения злокачественной опухоли у субъекта, где указанный способ включает введение указанному субъекту связывающего агента в подходящем количестве, при этом связывающий агент содержит первую область связывания с CD40 человека, например, CD40 человека, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, и вторую область связывания, связывающуюся с CD137 человека, например, CD137 человека, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38.

В пятом аспекте настоящее изобретение предлагает способ уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли или лечения рака у субъекта, где указанный способ включает введение указанному субъекту композиции, содержащей связывающий агент в количестве от около 3 до 200 мг или около  $20 \times 10^{-9}$  -  $1350 \times 10^{-9}$  моль, где связывающий агент содержит первую область связывания, связывающуюся с CD40 человека, например, CD40 человека, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, и вторую область связывания, связывающуюся с CD137 человека, например, CD137 человека, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Схематическое изображение предполагаемого способа действия.

Схематическое изображение предполагаемого способа действия биспецифического антитела CD40x4-1BB GEN1042. CD40 экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках (АПК), а также на опухолевых клетках. CD137 экспрессируется на активированных Т-клетках. DuoBody-CD40x4-1BB (GEN1042) представляет собой биспецифическое антитело, которое перекрестно связывает CD40 на антигенпрезентирующих клетках (АПК) с 4-1BB на активированных Т-клетках, тем самым индуцируя условную стимуляцию и костимулирующую активность в обоих типах клеток. Таким образом, ожидается, что биспецифические антитела CD40x4-1BB улучшат лицензирование ДК, клональную экспансию Т-клеток, продуцирование цитокинов, выживаемость Т-клеток и цитотоксичность, опосредованную Т-клетками и НК-клетками.

Фиг. 2. Схематическое изображение плана клинического исследования

Схематическое изображение части фазы 1 немаскированного исследования безопасности GEN1042 при повышении дозы, впервые проводимого на людях (FII) у субъектов с полностью солидными злокачественными опухолями. Уровни доз в диапазоне от 0,1 мг до 400 мг исследовали с использованием фазы ускоренного титрования, состоящей из когорт из одного субъекта, за которыми следовали более крупные когорты, информированные с помощью модифицированного способа непрерывной повторной

оценки (mCRM) и схемы эскалации с контролем передозировки (EWOC). В mCRM взаимосвязь между вероятностью DLT и уровнем дозы описывалась с помощью модели байесовской логистической регрессии (BLRM) и использовалась для разработки рекомендаций по дозе и для оценки максимально переносимой дозы (MTD).

Фиг. 3. Предварительная клиническая активность, изменение целевых поражений с течением времени – лепестковая диаграмма

Повышение дозы; лучшее изменение размера опухоли по сравнению с исходным уровнем у пациентов с НМРЛ. Прекращение сбора данных: 8 января 2021 г. NA, недоступно; NE, не поддается оценке; PD, прогрессирующее заболевание; SD – стабильное заболевание; PR, частичный ответ; uPR, неподтвержденный частичный ответ; CR, полный ответ; uCR, неподтвержденный полный ответ. График процентного изменения размеров опухоли с течением времени у 39 поддающихся оценке пациентов, включенных в фазу 1 повышения дозы исследования GCT1042-01, которые прошли хотя бы одну оценку поражения после исходного уровня.

Фиг. 4. Физиологическая фармакокинетика/фармакодинамическое моделирование

Модель спрогнозировала площадь под кривой процентных уровней тримеров после 1-го цикла по отношению к дозе, заданной как Q3W, в А) опухоли, В) лимфатических узлах (LN) и С) печени. Синяя полоса указывает на рекрутирование 4-1BB на CD8+ Т-клетках, а красная (или перекрытие серого) указывает на рекрутирование CD40 на АПК (макрофаги, В-клетки или зДК). На фиг. 4А, 4В и 4С показана AUC для прогнозируемых уровней тримеров в зависимости от дозы. Максимальное рекрутирование 4-1BB на Т-клетках наблюдалось в диапазоне 100–200 мг в опухолях и ЛУ и около 50–200 мг в печени. Рекрутирование CD40 на АПК наблюдалось с такой же интенсивностью. Увеличение дозы > 200 мг приводило к снижению образования тримеров. Кроме того, согласно имеющимся клиническим фармакодинамическим данным, более высокая степень и постоянная модуляция периферических фармакодинамических конечных точек (IFN $\gamma$  и пролиферирующие Ki67+ эффекторные CD8+ Т-клетки памяти) наблюдались при дозах до 200 мг. Учитывая прогнозы моделирования РВПК/PD и доступные клинические данные, было спрогнозировано, что оптимальная доза GEN1042 будет находиться в диапазоне 100 мг 1Q3W.

Фиг. 5. Увеличение INF- $\gamma$  и TARC

Уровни циркулирующих в крови INF- $\gamma$  (фиг. 5А) и TARC (фиг. 5В) измеряли в образцах сыворотки на исходном уровне и в различные моменты времени после введения GEN1042 в цикле 1 и цикле 2 (дни 1 [до, через 2 часа и между 4-6 часами после введения], 2, 3, 8 и 15) и до введения дозы для циклов 3 и далее. Промежуточные данные

ограничивают полные данные во все моменты времени, поэтому максимальное  $n$ , доступное для каждой дозы TARC, составляло (0,1 мг = [1]; 0,3 мг = [1]; 1 мг = [2]; 3 мг = [2]; 10 мг = [6]; 30 мг = [6]; 60 мг = [0]; 100 мг = [5]; 200 мг = [3]; 400 мг = [0]). Уровни TARC в образцах сыворотки определяли с помощью мультиплексного иммунного анализа Meso Scale Discovery (MSD).

Сокращения: пг = пикограммы, мл = миллилитры, ч = часы, мг = миллиграммы, SEM = стандартная ошибка среднего, pre = до введения дозы.

Референсный диапазон теста: TARC (пг/мл) <513

DCO (data cut off - конец сбора данных) = 22 января 2021 г.

Фиг. 6. Миграция/скопление Т- и В-клеток

На фиг. 6 показана индукция временной миграции/скопления CD8 Т-клеток (фиг. 6А) и В-клеток (фиг. 6В) при введении GEN1042. Иммунофенотипирование периферической крови проводили на цельной крови, собранной на исходном уровне и в различные моменты времени после введения GEN1042 в цикле 1 и цикле 2 (дни 1, 2, 3, 8 и 15) и до введения дозы для циклов 3 и далее. Промежуточные данные ограничивают полные данные во все моменты времени, поэтому максимальное  $n$ , доступное для каждой дозы, составляло (0,1 мг = [1]; 0,3 мг = [1]; 1 мг = [2]; 3 мг = [4]; 10 мг = [6]; 30 мг = [9]; 60 мг = [3]; 100 мг = [6]; 200 мг = [6]; 400 мг = [3]). Частоту CD8 Т-клеток оценивали в образцах цельной крови проточной цитометрией.

Сокращения: мкл = микролитры, час = часы, мг = миллиграммы, SEM = стандартная ошибка среднего, pre = до введения дозы.

DCO = 22 января 2021 г.

Фиг. 7. Созревание/экспансия Т-клеток

Иммунофенотипирование периферической крови проводили на цельной крови, собранной на исходном уровне и в различные моменты времени после введения GEN1042 в цикле 1 и цикле 2 (дни 1, 2, 3, 8 и 15) и до введения дозы для циклов 3 и далее. Промежуточные данные ограничивают полные данные во все моменты времени. Значения площади под кривой (AUC) рассчитывали для каждого пациента с использованием нормализованных к исходному уровню значений до 2-го дня 15-го цикла для CD4 и CD8-наивных или эффекторных Т-клеток памяти (T<sub>em</sub>). Затем рассчитывали среднее значение AUC для пациентов в пределах каждого уровня дозы и рассчитывали разницу между наивными и T<sub>em</sub>-клетками в популяциях CD4 или CD8. Значения, нанесенные серыми столбцами, обозначают разницу между наивной популяцией и популяцией T<sub>em</sub>, а размеры выборки представлены в нижней части каждого графика. Частоту наивных и эффекторных Т-клеток памяти оценивали в образцах цельной крови проточной цитометрией.

DCO = 22 января 2021 г.

#### Фиг. 8. Пролиферация Т-клеток

На фиг. 8 показана пролиферация всех CD8<sup>+</sup> Т-клеток (фиг. 8А) и эффекторных Т-клеток памяти CD8<sup>+</sup> (фиг. 8В), измеренная по увеличению частоты популяций %Ki67<sup>+</sup> после введения GEN1042. Иммунофенотипирование периферической крови проводили на цельной крови, собранной на момент включения в исследование и в различные моменты времени после введения GEN1042 в цикле 1 и цикле 2 (дни 1, 2, 3, 8 и 15) и до введения дозы для циклов 3 и далее. Промежуточные данные ограничивают полные данные во все моменты времени, поэтому максимальное n, доступное для каждой дозы, составляло (0,1 мг = [1]; 0,3 мг = [1]; 1 мг = [2]; 3 мг = [4]; 10 мг = [6]; 30 мг = [9]; 60 мг = [3]; 100 мг = [6]; 200 мг = [6]; 400 мг = [3]). Частоту CD8 Т-клеток и эффекторных Т-клеток памяти, а также уровень их пролиферации (%Ki67<sup>+</sup>) оценивали в образцах цельной крови проточной цитометрией.

Сокращения: SEM = стандартная ошибка среднего, Tem = эффекторные Т-клетки памяти, мг = миллиграммы, pre = до введения дозы.

DCO = 22 января 2021 г.

#### Фиг. 9. Активация Т-клеток

На фиг. 9 показана активация общего числа CD8<sup>+</sup> Т-клеток (фиг. 9А) и эффекторных CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти (фиг. 9В), измеренная по увеличению частоты % популяций 4-1BB<sup>+</sup> после введения GEN1042. Иммунофенотипирование периферической крови проводили на цельной крови, собранной на момент включения в исследование и в различные моменты времени после введения GEN1042 в цикле 1 и цикле 2 (дни 1, 2, 3, 8 и 15) и до введения дозы для циклов 3 и далее. Промежуточные данные ограничивают полные данные во все моменты времени, поэтому максимальное n, доступное для каждой дозы, составляло (0,1 мг = [1]; 0,3 мг = [1]; 1 мг = [2]; 3 мг = [4]; 10 мг = [6]; 30 мг = [9]; 60 мг = [3]; 100 мг = [6]; 200 мг = [6]; 400 мг = [3]). Частоту CD8 Т-клеток и эффекторных Т-клеток памяти, а также уровень их активации (%4-1BB<sup>+</sup>) оценивали в образцах цельной крови проточной цитометрией.

Сокращения: SEM = стандартная ошибка среднего, Tem = эффекторные Т-клетки памяти, мг = миллиграммы, pre = до введения дозы.

DCO = 22 января 2021 г.

Таблица 1. Последовательности

Название	Тип	Последовательность	SEQ ID
Антитело CD40-001 (мышь)	VH CDR1	GYTFTEYI	1
	VH CDR2	IPNNGGT	2
	VH CDR3	TRREVYGRNYYALDY	3

	VL CDR1	QGINNY	4
	VL CDR2	YTS	5
	VL CDR3	QQYSNLPYT	6
	VH	<u>EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKTSGYTFTE</u> <u>YIMHWVKQSHGKSLEWIGGIIPNNGGTSYNQ</u> KFKDKATMTVDKSSSTGYMELRSLTSEDSA VYYCTRREVYGRNYYALDYWGQGLVTVS S	7
	VL	<u>DIQMTQTTSSLSASLGDRVTITCSASQGINNY</u> LNWYQQKPDGTVKLLIYTSSLHSGVPSRFS GSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSNLP YTFGGGTKLEIK	8
	VH гуманизи- рованный	<u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKTSGYTFTE</u> <u>YIMHWVRQAPGQGLEWMGGIIPNNGGTSYN</u> QKFQGRVTMTVDKSTSTGYMELSSLRSEDT AVYYCTRREVYGRNYYALDYWGQGLVTV SS	9
	VL гуманизи- рованный	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQGINNY</u> LNWYQQKPGKAVKLLIYTSSLHSGVPSRFS GSGSGTDYFTISSLQPEDIAATYYCQQYSNLP YTFGGGTKVEIK	10
Антитело CD137 клон 009 (кролик)	VH CDR1	GFSLNNDYW	11
	VH CDR2	IDVGGSL	12
	VH CDR3	ARGGLTYGFDL	13
	VL CDR1	EDISSY	14
	VL CDR2	GAS	15
	VL CDR3	HYYATISGLGVA	16
	VH	<u>QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLNNDY</u> <u>WMSWVRQAPGKGLEWIGYIDVGGSLYYAS</u> WAKGRFTISRTSTTVDLKMTSLTTEDTATYF CARGGLTYGFDLWGPGTLVTVSS	17
	VL	<u>DIVMTQTPASVSEPVGGTVTINCQASEDISSY</u> LAWYQQKPGQRPKRLIYGASDLASGVPSRFS ASGSGTEYALTISDLESADAATYYCHYYATIS GLGVAFGGGTEVVVK	18
	VH гуманизи- рованный	<u>EVQLVESGGGLVQPGRSRLSCTASGFSLNNDY</u> <u>YWMSWVRQAPGKGLEWVGYIDVGGSLYYA</u> ASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTA VYYCARGGLTYGFDLWGQGLVTVSS	19
	VL гуманизи- рованный	<u>DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCQASEDISSYL</u> AWYQQKPGKAPKRLIYGASDLASGVPSRFS SAGSGTDYFTISSLQPEDIAATYYCHYYATISGL GVAFGGGTKVEIK	20
IgG1-Fc		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV	21

		MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
IgG1-Fc_F405L		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	22
IgG1-Fc_K409R		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	23
IgG1-Fc_FEA		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	24
IgG1-FEAL-Fc		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	25
IgG1-FEAR-Fc		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	26
Kanna-C		RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF	27

		YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	
Лямбда-С		GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS	28
IgG1-Fc без С- концевого Lys		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	29
IgG1-Fc_F405L без С-концевого Lys		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG	30
IgG1-Fc_K409R без С-концевого Lys		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	31
IgG1-Fc_FEA без С-концевого Lys		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	32
IgG1-FEAL-Fc без С-концевого Lys		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS	33

		VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC VMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
IgG1-FEAR-Fc без С-концевого Lys		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGL YLSLVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVA <sub>1</sub> VSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCSCV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	34
Предшественник CD40 человека		MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQ YLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPC GESEFLDTWNRETHCHQHKEYCDPNLGLRVQ QKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHR SCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSS AFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVC GPQDRLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVA KKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAP VQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ	35
Зрелый белок CD40 человека		EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDC TEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKEY CDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTS EACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEP CPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQ AGTNKTDVVCGPQDRLRALVVIPIIFGILFAIL LVLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPD DLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRI SVQERQ	36
Предшественник CD137 человека		MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNC PAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCD ICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCL GAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTF NDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERD VCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQII SFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKLL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CEL	37
Зрелый белок CD137 человека		LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSS AGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAEC DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKG CKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVL VNGTKERDVCGPSPADLSPGASSVTPPAPA REPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSV VKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCEL	38

Подробное описание изобретения

Хотя настоящее изобретение более подробно описано ниже, следует понимать, что это изобретение не ограничивается конкретными методологиями, протоколами и



реагентами, описанными в настоящей заявке, поскольку их можно менять. Также следует понимать, что используемая в данной заявке терминология предназначена только для описания конкретных воплощений и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, которое будет ограничено только прилагаемой формулой изобретения. Если иное не определено, все технические и научные термины, использованные в данной заявке, имеют те же смыслы, которые вкладываются в них обычным специалистом в данной области.

Далее элементы настоящего изобретения будут описаны более подробно. Эти элементы перечислены применительно к конкретным воплощениям, однако следует понимать, что их можно объединять любым способом и в любом количестве с созданием дополнительных воплощений. Различные описанные примеры и предпочтительные воплощения не должны толковаться как ограничивающие настоящее раскрытие только явно описанными воплощениями. Следует понимать, что описание поддерживает и охватывает воплощения, которые объединяют ясно описанные воплощения с любым количеством раскрытых и/или предпочтительных воплощений. Кроме того, любые перестановки и комбинации всех описанных элементов в данной заявке следует рассматривать как раскрытые описанием настоящей заявки до тех пор, пока из контекста не следует иное. Например, если в предпочтительном воплощении связывающего агента, используемого в настоящей заявке, первая тяжелая цепь содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26 или 34 [IgG1-Fc\_FEAR], и в другом предпочтительном воплощении используемого в данном документе связывающего агента, вторая тяжелая цепь содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 25 или 33 [IgG1-Fc\_FEAL], затем в дополнительном предпочтительном воплощении связывающего агента, используемого в данном документе, первая тяжелая цепь содержит или по существу состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26 или 34 [IgG1-Fc\_FEAR], а вторая тяжелая цепь содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 25 или 33 [IgG1-Fc\_FEAL].

Предпочтительно, чтобы используемые в данной заявке термины были определены, как описано в «A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)», H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland, (1995).

При практическом осуществлении настоящего изобретения будут использоваться, если не указано иное, методы традиционной химии, биохимии, клеточной биологии,

иммунологии и рекомбинантных ДНК, которые объясняются в литературе в данной области (см., например, Organikum, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1990; Streitwieser/Heathcook, «Organische Chemie», VCH, 1990; Beyer/Walter, «Lehrbuch der Organischen Chemie», S. Hirzel Verlag Stuttgart, 1988; Carey/Sundberg, «Organische Chemie», VCH, 1995; March, «Advanced Organic Chemistry», John Wiley & Sons, 1985; Römpp Chemie Lexikon, Falbe/Regitz (Hrsg.), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1989; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989.

Во всем этом описании и последующей формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово «содержать» и его варианты, такие как «содержит» и «содержащий», будут пониматься как подразумевающие включение указанного элемента, целого числа, стадии или группы элементов, целых чисел или стадий, но не исключение любого другого элемента, целого числа или стадии или группы элементов, целых чисел или стадий. Термин «состоящий в основном из» означает исключение других элементов, целых чисел или стадий, имеющих какое-либо существенное значение. Термин «содержащий» включает термин «состоящий по существу из», который, в свою очередь, включает термин «состоящий из». Таким образом, при каждом появлении в настоящей заявке термин «содержащий» может быть заменен термином «состоящий по существу из» или «состоящий из». Аналогичным образом, при каждом появлении в настоящей заявке термин «состоящий по существу из» может быть заменен термином «состоящий из».

Термины в единственном числе (прим.: сопровождаемые «a», «an» и «the» в исходном тексте на английском языке) и аналогичные ссылки, используемые в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте формулы изобретения), должны толковаться как охватывающие как единственное, так и множественное число, если не указано иное в данной заявке или нет явного противоречия контексту. Перечисление интервалов в данной заявке предназначено всего лишь для того, чтобы служить в качестве способа сокращения для индивидуального обозначения каждого отдельного значения, попадающего в интервал. До тех пор, пока в данной заявке не указано иное, каждое индивидуальное значение включено в описание, как если бы оно было индивидуально перечислено в данной заявке. Все способы, описанные в настоящей заявке, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в настоящей заявке или иным образом явно не противоречит контексту. Использование любых и всех примеров или примерной формулировки (например, «такой как»), представленных в настоящей заявке, предназначено только для того, чтобы лучше проиллюстрировать настоящее раскрытие, и не налагает ограничения на объем настоящего изобретения, заявленного

иным образом. Никакая формулировка в описании не должна быть истолкована как указывающая на какой-либо не заявленный элемент, существенный для практического применения настоящего изобретения.

При использовании в данной заявке, «и/или» в контексте настоящего изобретения следует понимать как конкретное раскрытие каждой из двух указанных функций или компонентов вместе или без друг друга. Например, «X и/или Y» следует понимать как конкретное раскрытие каждого из (i) X, (ii) Y и (iii) X и Y, как если бы каждый из них изложен в настоящей заявке отдельно.

В контексте настоящего изобретения термин «около» обозначает интервал точности, который будет понятен специалисту с обычными навыками, чтобы обеспечить технический эффект рассматриваемого признака. Термин обычно указывает на отклонение от указанного числового значения на  $\pm 5\%$ ,  $\pm 4\%$ ,  $\pm 3\%$ ,  $\pm 2\%$ ,  $\pm 1\%$ ,  $\pm 0,9\%$ ,  $\pm 0,8\%$ ,  $\pm 0,7\%$ ,  $\pm 0,6\%$ ,  $\pm 0,5\%$ ,  $\pm 0,4\%$ ,  $\pm 0,3\%$ ,  $\pm 0,2\%$ ,  $\pm 0,1\%$ ,  $\pm 0,05\%$  и, например,  $\pm 0,01\%$ . Как будет понятно специалисту в данной области, конкретное такое отклонение числового значения для данного технического эффекта будет зависеть от характера технического эффекта. Например, естественный или биологический технический эффект, как правило, может иметь большее отклонение, чем эффект, вызванный человеком, или инженерно-технический эффект.

Перечисление интервалов в данной заявке предназначено всего лишь для того, чтобы служить в качестве способа сокращения для индивидуального обозначения каждого отдельного значения, попадающего в интервал. До тех пор, пока в данной заявке не указано иное, каждое индивидуальное значение включено в описание, как если бы оно было индивидуально перечислено в данной заявке.

Несколько документов цитируется по всему тексту данного описания. Каждый из документов, процитированных в данной заявке (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, описания от производителя, инструкции и т.д.), будь то выше или ниже, настоящим полностью включен путем отсылки. Ничто в настоящем описании не должно быть истолковано как признание того, что изобретение не имеет права предшествовать такому раскрытию в силу предшествующего изобретения.

#### Определения

Далее будут предоставлены определения, которые применяются ко всем аспектам настоящего изобретения. Следующие термины имеют следующие значения, если не указано иное. Любой из неопределенных терминов имеет свое признанное в области значение.

Термин «связывающий агент» в контексте настоящего изобретения относится к

любому агенту, способному связываться с искомыми антигенами. В некоторых воплощениях настоящего изобретения связывающий агент представляет собой антитело, фрагмент антитела или его конструкцию. Связывающий агент также может содержать синтетические, модифицированные или неприродные фрагменты, в частности непептидные фрагменты. Такие фрагменты могут, например, связывать искомые антигенсвязывающие функциональные группы или области, такие как антитела или фрагменты антител. В одном воплощении связывающий агент представляет собой синтетическую конструкцию, содержащую антигенсвязывающие CDR или переменные области.

Термин «иммуноглобулин» относится к белкам надсемейства иммуноглобулинов, предпочтительно к антигенным рецепторам, таким как антитела или В-клеточный рецептор (BCR). Иммуноглобулины характеризуются структурным доменом, то есть доменом иммуноглобулина, имеющим характерную укладку иммуноглобулина (Ig). Термин охватывает мембраносвязанные иммуноглобулины, а также растворимые иммуноглобулины. Связанные с мембраной иммуноглобулины также называют поверхностными иммуноглобулинами или мембранными иммуноглобулинами, которые обычно являются частью BCR. Растворимые иммуноглобулины обычно называют антителами.

Структура иммуноглобулинов хорошо охарактеризована. См., например, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Вкратце, иммуноглобулины обычно содержат несколько цепей, обычно две идентичные тяжелые цепи и две идентичные легкие цепи, которые связаны дисульфидными связями. Эти цепи в основном состоят из доменов или областей иммуноглобулина, таких как  $V_L$  или домен/область  $V_L$  (переменная область легкой цепи),  $C_L$  или домен/область  $C_L$  (константная область легкой цепи),  $V_H$  или домен/область  $V_H$  (переменная область тяжелой цепи), и  $C_H$  или домены/области  $C_H$  (константная область тяжелой цепи)  $C_{H1}$  ( $C_{H1}$ ),  $C_{H2}$  ( $C_{H2}$ ),  $C_{H3}$  ( $C_{H3}$ ), и  $C_{H4}$  ( $C_{H4}$ ). Константная область тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$ . Шарнирная область представляет собой область между доменами  $C_{H1}$  и  $C_{H2}$  тяжелой цепи и обладает высокой гибкостью. Дисульфидные связи в шарнирной области являются частью взаимодействий между двумя тяжелыми цепями в молекуле IgG. Каждая легкая цепь обычно состоит из  $V_L$  и  $C_L$ . Константная область легкой цепи обычно состоит из одного домена,  $C_L$ . Области  $V_H$  и  $V_L$  могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или форме структурно определяемых петель), также их называют

областями, отвечающими за комплементарность связывания (CDR), между которыми расположены области, которые являются более консервативными, называемые каркасными областями (FR). Каждая VH и VL обычно состоит из трех CDR и четырех FR, располагающихся от N-конца к С-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (см., также Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). Если иное не указано или не противоречит контексту, последовательности CDR в данном документе идентифицируются в соответствии с правилами IMGT с использованием DomainGapAlign (Lefranc MP., Nucleic Acids Research 1999; 27: 209-212 и Ehrenmann F., Kaas Q. and Lefranc M.-P. Nucleic Acids Res., 38, D301-307 (2010); см. также в сети интернет [http-адрес www.irmgt.org/i](http://www.irmgt.org/i). Если иное не указано или не противоречит контексту, ссылки на положения аминокислот в константных областях в настоящем раскрытии соответствуют нумерации EU (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1969 May;63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. 1991 NIH Publication No. 91-3242).

Существует пять типов тяжелых цепей иммуноглобулинов млекопитающих, то есть  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ , которые соответствуют различным классам антител, то есть IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. В отличие от тяжелых цепей растворимых иммуноглобулинов, тяжелые цепи мембранных или поверхностных иммуноглобулинов содержат трансмембранный домен и короткий цитоплазматический домен на их карбокси-конце. У млекопитающих есть два типа легких цепей: лямбда и каппа. Цепи иммуноглобулина содержат варибельную область и константную область. Константная область по существу консервативна в различных изоформах иммуноглобулинов, при этом варибельная часть весьма разнообразна и отвечает за распознавание антигена.

Термины «аминокислота» и «аминокислотный остаток» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо, и их не следует понимать как ограничивающие. Аминокислоты представляют собой органические соединения, содержащие аминные ( $-NH_2$ ) и карбоксильные ( $COOH$ ) функциональные группы, а также боковую цепь (группу R), специфичную для каждой аминокислоты. В контексте настоящего изобретения аминокислоты могут быть классифицированы на основе структуры и химических характеристик. Таким образом, классы аминокислот могут быть отражены в одной или обеих таблицах ниже:

Таблица 2. Основная классификация, основанная на строении и общей химической характеристике группы R.

Класс	Аминокислота
Кислые остатки	D и E
Основные остатки	K, R и H

Гидрофильные незаряженные остатки	S, T, N и Q
Алифатические незаряженные остатки	G, A, V, L и I
Неполярные незаряженные остатки	C, M и P
Ароматические остатки	F, Y и W

Таблица 3. Альтернативные физические и функциональные классификации аминокислотных остатков

Класс	Аминокислота
Остатки, содержащие гидроксильную группу	S и T
Алифатические остатки	I, L, V и M
Циклоалкенил-ассоциированные остатки	F, H, W и Y
Гидрофобные остатки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W и Y
Отрицательно заряженные остатки	D и E
Полярные остатки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S и T
Положительно заряженные остатки	H, K и R
Малые остатки	A, C, D, G, N, P, S, T и V
Очень малые остатки	A, G и S
Остатки, участвующие в формировании поворота	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P и T
Гибкие остатки	Q, T, K, S, G, P, D, E и R

Для целей настоящего изобретения «варианты» аминокислотной последовательности (пептид, белок или полипептид) включают варианты с вставкой аминокислот, варианты с добавлением аминокислот, варианты с делецией аминокислот и/или варианты с заменой аминокислот. Термин «вариант» включает все мутанты, варианты сплайсинга, варианты, модифицированные после трансляции, конформации, изоформы, аллельные варианты, видовые варианты и видовые гомологи, в частности те, которые встречаются в природе. Термин «вариант» включает, в частности, фрагменты аминокислотной последовательности.

Аминокислотные варианты со вставкой включают вставки одной или двух или более аминокислот в конкретную аминокислотную последовательность. В случае вариантов аминокислотной последовательности, имеющих вставку, один или несколько аминокислотных остатков вставляются в конкретный сайт в аминокислотной последовательности, хотя также возможна случайная вставка с соответствующим скринингом полученного продукта.

Варианты присоединения аминокислот включают слияния на амино- и/или карбокси-конце с одной или несколькими аминокислотами, например, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 или большим количеством аминокислот.

Варианты с делецией аминокислот характеризуются удалением одной или нескольких аминокислот из последовательности, например, удалением 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30,

50 или большего количества аминокислот. Делеции могут находиться в любом положении белка. Варианты с делецией аминокислот, которые содержат делецию на N-конце и/или C-конце белка, также называются вариантами с укорочением на N-конце и/или C-конце.

Аминокислотные варианты с заменой характеризуются тем, что, по меньшей мере, один остаток в последовательности удаляется, а другой остаток вставляется на его место. Замена одной аминокислоты на другую может быть классифицирована как консервативная или неконсервативная замена. Предпочтение отдается модификациям в положениях в аминокислотной последовательности, которые не являются консервативными между гомологичными белками или пептидами, и/или замене аминокислот другими, имеющими аналогичные свойства. Предпочтительно, аминокислотные изменения в пептидных и белковых вариантах представляют собой консервативные аминокислотные изменения, то есть замены одинаково заряженных или незаряженных аминокислот. Консервативная замена аминокислот включает замену одной из семейства аминокислот, которые похожи в своих боковых цепях. В контексте настоящего изобретения «консервативная замена» представляет собой замену одной аминокислоты на другую аминокислоту, имеющую аналогичные структурные и/или химические характеристики, такую замену одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток того же класса, что и определенные в любой из двух таблиц выше: например, лейцин может быть заменен изолейцином, поскольку они оба являются алифатическими разветвленными гидрофобами. Точно так же аспарагиновая кислота может быть заменена глутаминовой кислотой, поскольку они обе представляют собой небольшие отрицательно заряженные остатки. Встречающиеся в природе аминокислоты также можно разделить на четыре семейства: кислые (аспартат, глутамат), основные (лизин, аргинин, гистидин), неполярные (аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан) и незаряженные полярные (глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин) аминокислоты. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют совместно как ароматические аминокислоты. В одном воплощении консервативные аминокислотные замены включают замены в следующих группах:

- глицин, аланин;
- валин, изолейцин, лейцин;
- аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота;
- аспарагин, глутамин;
- серин, треонин;
- лизин, аргинин; и

- фенилаланин, тирозин.

Термин «аминокислота, соответствующая положению...», используемый в настоящей заявке, относится к номеру положения аминокислоты в тяжелой цепи IgG1 человека. Соответствующие положения аминокислот в других иммуноглобулинах можно найти путем сопоставления с IgG1 человека. Таким образом, аминокислота или сегмент в одной последовательности, которая «соответствует» аминокислоте или сегменту в другой последовательности, является аминокислотой или сегментом, который выравнивается с другой аминокислотой или сегментом с использованием стандартной программы выравнивания последовательностей, такой как ALIGN, ClustalW или аналогичной, обычно с настройками по умолчанию и имеет идентичность по меньшей мере 50%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% с тяжелой цепью IgG1 человека. В данной области техники хорошо известно, как выравнивать последовательность или сегмент в последовательности и тем самым определить соответствующее положение в последовательности для положения аминокислоты согласно настоящему изобретению.

Термин «антитело» (Ab) в контексте настоящего изобретения относится к молекуле иммуноглобулина, фрагменту молекулы иммуноглобулина или производному любого из них, которые обладают способностью специфически связываться с антигеном в типичных физиологических условиях с полувыведением в течение значительных периодов времени, например, по меньшей мере, около 30 минут, по меньшей мере, около 45 минут, по меньшей мере, около одного часа, по меньшей мере, около двух часов, по меньшей мере, около четырех часов, по меньшей мере, около 8 часов, по меньшей мере около 12 часов, около 24 часов или более, около 48 часов или более, около 3, 4, 5, 6, 7 или более дней и т.д. или любого другого соответствующего функционально определенного периода (например, времени, достаточного для того, чтобы вызвать, стимулировать, усиливать и/или модулировать физиологический ответ, связанный со связыванием антитела с антигеном, и/или времени, достаточного для того, чтобы антитело задействовало эффекторную активность). В частности, термин «антитело» относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Термин «антитело» включает моноклональные антитела, рекомбинантные антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела и комбинации любых из вышеперечисленных. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Переменные области и константные области также упоминаются в данной заявке как переменные домены и константные домены,



соответственно. Области VH и VL могут быть далее подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), с вкраплениями областей, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. CDR VH обозначаются HCDR1, HCDR2 и HCDR3, CDR VL обозначаются LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные области антитела включают константную область тяжелой цепи (CH) и константную область легкой цепи (CL), где CH можно дополнительно подразделить на константный домен CH1, шарнирную область и константные домены CH2 и CH3 (расположенные от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: CH1, CH2, CH3). Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q. Антитела могут представлять собой интактные иммуноглобулины, полученные из природных источников или из рекомбинантных источников, и могут представлять собой иммуноактивные части интактных иммуноглобулинов. Антитела обычно представляют собой тетрамеры молекул иммуноглобулинов. Антитела могут существовать в различных формах, включая, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, Fv, Fab и F(ab)<sub>2</sub>, а также одноцепочечные антитела и гуманизированные антитела.

Вариабельные области тяжелой и легкой цепей молекулы иммуноглобулина включают домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Термин «антигенсвязывающая область», используемый в данном документе, относится к области, которая взаимодействует с антигеном и включает как область VH, так и область VL. Антитело, используемое в настоящей заявке, включает не только моноспецифические антитела, но также и мультиспецифические антитела, которые содержат множество, например, два или более, например, три или более, различных антигенсвязывающих областей.

Как указано выше, термин «антитело» в данном документе, если не указано иное или явно не противоречит контексту, включает фрагменты антитела, которые являются антигенсвязывающими фрагментами, т.е. сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществлена с помощью фрагментов полноразмерного антитела. Примеры антигенсвязывающих фрагментов, охватываемых термином «антитело», включают (i) Fab'

или Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, или моновалентное антитело, описанное в WO 2007/059782 (Genmab); (ii) фрагменты F(ab')<sub>2</sub>, двухвалентные фрагменты, содержащие два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий по существу из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий по существу из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), который по существу состоит из домена VH, и также называемый доменными антителами (Holt et al; Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):484-90); (vi) молекулы верблюдовых антител или нанотела (Revets et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5(1):111-24); и (vii) выделенную область, определяющую комплементарность (CDR). Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с использованием рекомбинантных способов с помощью синтетического линкера, который позволяет создавать их в виде единой белковой цепи, в которой VL и пара областей VH с образованием одновалентных молекул (известных как одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), см., например, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) and Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Такие одноцепочечные антитела охвачены термином антитело пока не определено иное или очевидно не указано контекстом. Хотя такие фрагменты, как правило, включены в обозначение антитела, они все вместе или по отдельности представляют собой уникальные признаки настоящего изобретения, демонстрирующие различные биологические свойства и применимость. Эти и другие полезные фрагменты антител в контексте настоящего изобретения, а также биспецифические форматы таких фрагментов обсуждаются ниже. Также следует понимать, что термин антитело, пока не определено иное, также включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAb), антитело-подобные полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела, и антительные фрагменты, сохраняющие способность специфического связывания с антигеном (антигенсвязывающие фрагменты), полученные с помощью известных методов, таких как ферментативное расщепление, пептидный синтез и рекомбинантные методы.

Полученное антитело может обладать любым изотипом. Используемый в данном документе термин «изотип» относится к классу иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. Когда конкретный изотип, например, IgG1 упоминается в настоящей заявке, этот термин не ограничивается конкретной последовательностью изотипа, например, определенную последовательность IgG1, но используется для указания того, что антитело по последовательности ближе к этому изотипу, например, IgG1, чем к

другим изотипам. Таким образом, например, антитело IgG1, раскрытое в настоящей заявке, может представлять собой вариант последовательности встречающегося в природе антитела IgG1, включая вариации константных областей.

Термин «мультиспецифическое антитело» в контексте настоящего изобретения относится к антителу, имеющему по меньшей мере две разные антигенсвязывающие области, определяемые разными последовательностями антитела. В некоторых воплощениях указанные разные антигенсвязывающие области связывают разные эпитопы одного и того же антигена. Однако в предпочтительных воплощениях указанные разные антигенсвязывающие области связывают разные антигены-мишени. В одном воплощении мультиспецифическое антитело представляет собой «биспецифическое антитело» или «bs». Мультиспецифическое антитело, такое как биспецифическое антитело, может иметь любой формат, включая любой из форматов биспецифического или мультиспецифического антитела, описанных ниже.

Термин «полноразмерный», когда он используется в контексте антитела, указывает, что антитело не является фрагментом, а содержит все домены конкретного изотипа, обычно встречающиеся для этого изотипа в природе, например, домены VH, CH1, CH2, CH3, шарнир, VL и CL для антитела IgG1.

Термин «человеческое антитело», используемый в данном документе, предназначен для включения антител, имеющих переменные и каркасные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека и константного домена иммуноглобулина человека. Человеческие антитела, раскрытые в настоящей заявке, могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, вставки или делеции, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*). Однако используемый в данном документе термин «человеческое антитело» не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида, не относящегося к человеку, такого как мышь, были привиты в каркасные последовательности человека.

Термин «химерное антитело», используемый в настоящей заявке, относится к антителу, в котором переменная область получена из вида, отличного от человека (например, полученного от грызунов), а константная область получена из другого вида, такого как человек. Химерные антитела могут быть получены с помощью конструирования антител. «Конструирование антител» представляет собой термин, используемый в общем для различных видов модификаций антител, и процессы

конструирования антител хорошо известны специалистам. В частности, химерное антитело может быть получено с использованием стандартных методов ДНК, как описано в Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ch. 15. Таким образом, химерное антитело может быть рекомбинантным антителом, полученным путем генетической или ферментативной инженерии. Специалисту в данной области техники известно, как получить химерное антитело, и, таким образом, создание химерного антитела может быть осуществлено другими способами, отличными от описанных в настоящей заявке. Химерные моноклональные антитела для терапевтического применения у людей разрабатываются для снижения ожидаемой иммуногенности антител нечеловеческого происхождения, например, антител грызунов. Обычно они могут содержать нечеловеческие (например, мышинные или кроличьи) переменные области, которые специфичны в отношении интересующего антигена, а также константные домены тяжелой и легкой цепи человеческого антитела. Термины «переменная область» или «переменный домен», используемые в контексте химерных антител, относятся к области, которая включает CDR и каркасные области как тяжелой, так и легкой цепей иммуноглобулина, как описано ниже.

Термин «гуманизованное антитело», используемый в данном документе, относится к антителу нечеловеческого происхождения, полученному с помощью генетической инженерии, которое содержит константные домены человеческого антитела и переменные домены нечеловеческого происхождения, модифицированные так, чтобы они содержали высокий уровень гомологии последовательностей с переменными доменами человека. Этого можно достичь путем трансплантации шести определяющих комплементарность областей (CDR) нечеловеческого антитела, которые вместе образуют сайт связывания антигена, на гомологичную человеческую акцепторную каркасную область (FR) (см. WO 92/22653 и EP 0 629 240). Чтобы полностью восстановить аффинность связывания и специфичность исходного антитела, может потребоваться замена каркасных остатков исходного антитела (то есть нечеловеческого антитела) в человеческих каркасных областях (обратные мутации). Моделирование структурной гомологии может помочь идентифицировать аминокислотные остатки в каркасных областях, которые важны для связывающих свойств антитела. Таким образом, гуманизованное антитело может содержать нечеловеческие CDR-последовательности, в первую очередь человеческие каркасные области, необязательно содержащие одну или несколько обратных мутаций аминокислот в нечеловеческой аминокислотной последовательности, и полностью человеческие константные области. Необязательно,

дополнительные модификации аминокислот, которые необязательно являются обратными мутациями, могут быть применены для получения гуманизованного антитела с предпочтительными характеристиками, такими как аффинность и биохимические свойства.

В настоящем документе белок, который «происходит из» другого белка, например, родительского белка, означает, что одна или несколько аминокислотных последовательностей белка идентичны или сходны с одной или несколькими аминокислотными последовательностями в другом или родительском белке. Например, в антителе, в связывающем плече, антигенсвязывающей области, константной области или т.п., которое получено из другого или родительского антитела, связывающего плеча, антигенсвязывающей области или константной области, одна или несколько аминокислотных последовательностей являются идентичными или сходными с таковыми другого или родительского антитела, связывающего плеча, антигенсвязывающей области или константной области. Примеры таких одной или нескольких аминокислотных последовательностей включают, без ограничения указанным, последовательности CDR VH и VL и/или одну или несколько или все каркасные области, области VH, VL, CL, шарнир или CH. Например, гуманизованное антитело может быть описано в данном документе как «полученное из» родительского антитела, не являющегося человеческим, что означает, что по меньшей мере последовательности CDR в VL и VH идентичны или сходны с последовательностями CDR в VH и VL указанного родительского антитела, не являющегося человеческим. Химерное антитело может быть описано в данном документе как «полученное из» исходного антитела, не являющегося человеком, что означает, что обычно последовательности VH и VL могут быть идентичными или сходными с последовательностями исходного антитела, не являющегося человеческим. Другим примером является связывающее плечо или антигенсвязывающая область, которая может быть описана в настоящей заявке как «полученная из» конкретного родительского антитела, что означает, что указанное связывающее плечо или антигенсвязывающая область обычно содержит CDR из VH и/или VL, или последовательности VH и/или VL идентичные или подобные связывающему плечу или антигенсвязывающей области указанного родительского антитела. Однако, как описано где-либо в настоящей заявке, модификации аминокислот, такие как мутации, могут быть выполнены в CDR, константных областях или где-либо еще в антителе, связывающем плече, антигенсвязывающей области и т.п. для придания искомым характеристик. При использовании в контексте одной или нескольких последовательностей, полученных из первого или родительского белка, «похожая» аминокислотная последовательность

предпочтительно имеет идентичность последовательности по меньшей мере около 50%, например, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 97%, 98% или 99%.

Не являющиеся человеческими антитела могут вырабатываться у ряда различных видов, таких как мышь, кролик, курица, морская свинка, лама и коза.

Моноклональные антитела можно получать различными методами, включая общепринятую методику получения моноклональных антител, например, стандартную методику гибридизации соматических клеток по Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975). Могут быть использованы и другие методы получения моноклональных антител, например, вирусная или онкогенная трансформация В-лимфоцитов или методы фагового дисплея с использованием библиотек генов антител, и такие методы хорошо известны специалисту в данной области.

Получение гибридом у таких видов, отличных от человека, является хорошо отработанной процедурой. Протоколы иммунизации и способы выделения спленоцитов иммунизированных животных/видов, отличных от человека, для слияния известны в данной области техники. Партнеры слияния (например, мышинные миеломные клетки) и процедуры слияния также известны.

При использовании в настоящей заявке, если это не противоречит контексту, термин «Fab-плечо» или «плечо» относится к одной паре тяжелая цепь-легкая цепь и используется в данном документе взаимозаменяемо с «полумолекулами».

Термин «связывающее плечо, содержащее антигенсвязывающую область» означает молекулу или фрагмент антитела, которая содержит антигенсвязывающую область. Таким образом, связывающее плечо может содержать, например, шесть последовательностей CDR VH и VL, последовательности VH и VL, Fab или Fab'-фрагмент или Fab-плечо.

При использовании в настоящей заявке, если это не противоречит контексту, термин «область Fc» относится к области антитела, состоящей из двух последовательностей Fc тяжелых цепей иммуноглобулина, где указанные последовательности Fc содержат по меньшей мере шарнирную область, домен CH2 и домен CH3. В одном воплощении термин «область Fc», используемый в настоящей заявке, относится к области, содержащей в направлении от N-концевого конца антитела к C-концу, по меньшей мере, шарнирную область, область CH2 и область CH3. Область Fc антитела может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента.

В контексте настоящего изобретения термин «индуцировать Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени», используемый в отношении антитела, включая мультиспецифическое антитело, означает, что антитело индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию, где такая функция, в частности, представляет собой выбранные из списка связывания IgG Fc-рецептора (FcγR), связывания C1q, АЗКЦ или КЗЦ, в меньшей степени по сравнению с человеческим антителом IgG1, содержащим (i) те же самые последовательности CDR, в частности содержащие одни и те же первый и второй антиген-связывающие области, такие как указанное антитело, и (ii) две тяжелые цепи, содержащие области шарнира, CH2 и CH3 IgG1 человека.

Fc-опосредованную эффекторную функцию можно измерить путем связывания с FcγR, связывания с C1q или индукции Fc-опосредованного перекрестного сшивания через FcγR.

Термин «шарнирная область», используемый в настоящей заявке, относится к шарнирной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, шарнирная область человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 216-230 согласно нумерации EU, как указано Kabat (Kabat, E.A. et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662,680,689 (1991)). Однако шарнирная область также может относиться к любому из других подтипов, описанных в данном документе.

Термин «область CH1» или «домен CH1», используемый в настоящей заявке, относится к области CH1 тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, область CH1 человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 118-215 согласно нумерации EU, как у Kabat (там же). Однако область CH1 также может относиться к любому из других подтипов, как описано в данном документе.

Термин «область CH2» или «домен CH2», используемый в настоящей заявке, относится к области CH2 тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, область CH2 человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 231-340 согласно нумерации EU, как у Kabat (там же). Однако область CH2 также может представлять собой любую из других подтипов, как описано в данном документе.

Термин «область CH3» или «домен CH3», используемый в настоящей заявке, относится к области CH3 тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, область CH3 человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 341-447 в соответствии с нумерацией EU, как у Kabat (там же). Однако область CH3 также может представлять собой любую из других подтипов, как описано в данном документе.

Термин «моновалентное антитело» в контексте настоящего изобретения означает,

что молекула антитела способна связывать одну молекулу антигена и, таким образом, не способна к перекрестному сшиванию антигена.

«Антитело к CD40» или «анти-CD40 антитело» представляет собой описанное выше антитело, которое специфически связывается с антигеном CD40.

«Антитело к CD137» или «анти-CD137 антитело» представляет собой описанное выше антитело, которое специфически связывается с антигеном CD137.

«Антитело CD40xCD137» или «анти-CD40xCD137 антитело» представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит две разные антигенсвязывающие области, одна из которых специфически связывается с антигеном CD40, а другая специфически связывается с антигеном CD137.

Используемые в данном документе термины «связывание» или «способность к связыванию» в контексте связывания антитела с заданным антигеном или эпитопом обычно означают связывание со аффинностью, соответствующей  $K_D$  около  $10^{-7}$  М или менее, например, около  $10^{-8}$  М или меньше, например, около  $10^{-9}$  М или меньше, около  $10^{-10}$  М или меньше или около  $10^{-11}$  М или даже меньше, при определении с помощью биослойной интерферометрии (BLI) или, например, при определении с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIAcore 3000 с использованием антигена в качестве лиганда и антитела в качестве аналита. Антитело связывается с заранее определенным антигеном со аффинностью, соответствующей  $K_D$ , которая по меньшей мере в десять раз ниже, например, по меньшей мере в 100 раз ниже, например, по меньшей мере в 1000 раз ниже, например, по меньшей мере в 10000 раз ниже, например, по меньшей мере в 100 000 раз ниже, чем его  $K_D$  для связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от заданного антигена или близкородственного антигена. Величина, при которой аффинность выше, зависит от  $K_D$  антитела, так что, когда  $K_D$  антитела очень низко (т.е. антитело высокоспецифично), тогда степень, в которой аффинность к антигену ниже, чем аффинность к неспецифическому антигену, может быть по меньшей мере в 10000 раз.

Термин « $k_a$ » ( $\text{сек}^{-1}$ ), используемый в данном документе, относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Указанное значение также называется значением  $k_{\text{off}}$ .

Используемый в данном документе термин « $K_D$ » (М) относится к константе равновесия диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Два антитела имеют «одинаковую специфичность», если они связываются с одним и тем же антигеном и одним и тем же эпитопом. Узнает ли тестируемое антитело тот же эпитоп, что и определенное антигенсвязывающее антитело, т.е. связываются ли антитела с



одним и тем же эпитопом, можно проверить различными методами, хорошо известными специалисту в данной области.

Конкуренцию между антителами можно обнаружить с помощью анализа перекрестного блокирования. Например, конкурентный анализ ELISA можно использовать в качестве анализа перекрестного блокирования. Например, антиген-мишень может быть нанесен в лунки микротитровального планшета и могут быть добавлены антигенсвязывающее антитело и конкурирующее тестируемое антитело-кандидат. Количество антигенсвязывающего антитела, связанного с антигеном в лунке, косвенно коррелирует со способностью связывания конкурирующего тестируемого антитела-кандидата, которое конкурирует с ним за связывание с тем же эпитопом. В частности, чем выше аффинность конкурирующего тестируемого антитела-кандидата к одному и тому же эпитопу, тем меньше количество антигенсвязывающего антитела, связанного с лункой, покрытой антигеном. Количество антигенсвязывающего антитела, связанного с лункой, можно измерить путем мечения антител детектируемыми и измеряемыми метящими веществами.

Антитело, конкурирующее за связывание с антигеном с другим антителом, например, антителом, содержащим переменные области тяжелой и легкой цепи, как описано в настоящей заявке, или антителом, обладающим специфичностью к антигену другого антитела, например, антителом, содержащим переменные области тяжелой и легкой цепи области, как описано в настоящей заявке, может представлять собой антитело, содержащее варианты указанных переменных областей тяжелой и/или легкой цепи, как описано в настоящей заявке, например, модификации CDR и/или определенную степень идентичности, как описано в настоящей заявке.

Термин «выделенное биспецифическое антитело» в контексте настоящего описания предназначен для обозначения биспецифического антитела, которое по существу не включает других антител, обладающих другой антигенной специфичностью (например, выделенное биспецифическое антитело, которое специфически связывается с CD40 и CD37, по существу не включает моноспецифических антител, которые специфично связываются с CD40 или CD37).

Термин «моноклональное антитело», используемый в настоящем описании, относится к препарату молекул антител с одномолекулярной композицией. Композиция моноклонального антитела демонстрирует уникальную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу.

При использовании в данном документе термин «гетеродимерное взаимодействие между первой и второй областями СН3» относится к взаимодействию между первой

областью СНЗ первой Fc-области и второй областью СНЗ второй Fc-области в гетеродимерном антителе первого СНЗ/второго СНЗ.

При использовании в данной заявке термин «гомодимерные взаимодействия первой и второй областей СНЗ» относится к взаимодействию между первой областью СНЗ и другой первой областью СНЗ в гомодимерном антителе первая СНЗ/первая СНЗ и взаимодействию между второй областью СНЗ и еще одной второй областью СНЗ в гомодимерном антителе вторая СНЗ/вторая СНЗ.

При использовании в данной заявке термин «гомодимерное антитело» относится к антителу, содержащему два первых Fab-плеча или полумолекулы, где аминокислотная последовательность указанных Fab-плеч или полумолекул является одинаковой.

При использовании в данной заявке термин «гетеродимерное антитело» относится к антителу, содержащему первое и второе Fab-плечи или полумолекулу, где аминокислотные последовательности указанных первого и второго Fab-плеч или полумолекулы различны. В частности, область СНЗ, или антигенсвязывающая область, или область СНЗ и антигенсвязывающая область указанных первого и второго Fab-плечей/полумолекул различны.

Термин «восстанавливающие условия» или «восстанавливающая среда» относится к состоянию или среде, в которой субстрат, такой как остаток цистеина в шарнирной области антитела, с большей вероятностью станет восстановленным, чем окисленным.

Настоящее изобретение также описывает мультиспецифические антитела, такие как биспецифические антитела, содержащие функциональные варианты областей VL, областей VH или одной или нескольких CDR биспецифических антител из примеров. Функциональный вариант VL, VH или CDR, используемый в контексте биспецифического антитела, по-прежнему позволяет каждой антигенсвязывающей области биспецифического антитела сохранять по меньшей мере значительную часть (по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более) аффинности и/или специфичности/селективности исходного биспецифического антитела, и в некоторых случаях такое биспецифическое антитело может быть связано с большей аффинностью, селективностью и/или специфичностью, чем исходное биспецифическое антитело.

Такие функциональные варианты обычно сохраняют значительную идентичность последовательности с родительским биспецифическим антителом. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией числа идентичных положений совместно с последовательностями (т.е. % гомологии = числу идентичных положений/общее число положений x100), принимая во внимание число делеций и длину каждой делеции, которые должны появляться для оптимального выравнивания двух

последовательностей. Процент идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями, может быть определен, например, с помощью алгоритма E. Meyers and W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11-17 (1988), который включен в программу «ALIGN» (версия 2.0) с использованием таблицы масс остатков PAM120, штрафа за длину разрыва, равного 12, и штрафа за разрыв, равного 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с помощью алгоритма Needleman и Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 444453 (1970).

В контексте настоящего изобретения для описания мутации, если не указано иное, используются следующие обозначения: i) замена аминокислоты в заданном положении записывается, например, K409R, что означает замену лизина в положении 409 белка на аргинин; и ii) для специфических вариантов используются специфические трех- или однобуквенные коды, включая коды Хаа и X для обозначения любого аминокислотного остатка. Так, замена лизина на аргинин в положении 409 обозначается как: K409R, а замена лизина на любой аминокислотный остаток в положении 409 обозначается как K409X. В случае делеции лизина в положении 409 это обозначено как K409\*.

Типичные варианты включают те, которые отличаются от VH, и/или VL, и/или CDR родительских последовательностей главным образом консервативными заменами; например, 12, такие как 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1, замен в варианте представляют собой замены консервативных аминокислотных остатков.

В контексте настоящего изобретения консервативные замены могут определяться заменами внутри классов аминокислот, как определено в таблицах 2 и 3.

Термин «CD40», используемый в данной заявке, относится к CD40, также называемому 5 представителем суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF5), который является рецептором для лиганда TNFSF5/CD40L. Известно, что CD40 передает сигналы, опосредованные TRAF6 и MAP3K8, которые активируют ERK в макрофагах и В-клетках, что приводит к индукции секреции иммуноглобулина В-клетками. Другие синонимы, используемые для CD40, включают, без ограничения указанным, поверхностный антиген В-клеток CD40, Bp50, рецептор CD40L и CDw40. В одном воплощении CD40 представляет собой человеческий CD40, имеющий учетный номер UniProt P25942. Последовательность человеческого CD40 также показана в SEQ ID NO: 35. Аминокислоты 1-20 SEQ ID NO: 35 соответствуют сигнальному пептиду CD40 человека; тогда как аминокислоты 21-193 SEQ ID NO: 35 соответствуют внеклеточному домену CD40 человека; и остатку белка; т.е. из аминокислот 194-215 и 216-277 SEQ ID NO: 35 представляет собой трансмембранный и цитоплазматический домен, соответственно.

Термин «CD137», используемый в данной заявке, относится к CD137 (4-1BB), также называемому 9 представителем суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF9), который является рецептором для лиганда TNFSF9/4-1BBL. Считается, что CD137 (4-1BB) участвует в активации Т-клеток. Другие синонимы CD137 включают, без ограничения указанным, лигандный рецептор 4-1BB, CDw137, гомолог Т-клеточного антигена 4-1BB и Т-клеточный антиген IIA. В одном воплощении CD137 (4-1BB) представляет собой человеческий CD137 (4-1BB), имеющий учетный номер UniProt Q07011. Последовательность человеческого CD137 также показана в SEQ ID NO: 37. Аминокислоты 1-23 SEQ ID NO: 37 соответствуют сигнальному пептиду CD137 человека; тогда как аминокислоты 24-186 SEQ ID NO: 37 соответствуют внеклеточному домену CD137 человека; а остальная часть белка, т.е. аминокислоты 187-213 и 214-255 SEQ ID NO: 37, представляют собой трансмембранный и цитоплазматический домен, соответственно.

«Цикл лечения» в данной заявке определяется как период времени, в течение которого эффекты отдельных доз связывающего агента усиливаются или по существу аддитивны из-за фармакодинамики связывающего агента, или, другими словами, период времени, после которого введенный связывающий агент по существу выводится из организма субъекта. Несколько небольших доз в небольшом временном окне, например, в течение 2–24 часов, например, 2–12 часов или в тот же день, может быть эквивалентно более крупной разовой дозе.

В данном контексте термин «лечение», «лечить» или «терапевтическое вмешательство» относится к ведению и уходу за объектом с целью борьбы с таким состоянием, как заболевание или расстройство. Термин предназначен для включения полного спектра лечения данного состояния, от которого страдает субъект, например, введение терапевтически эффективного соединения для облегчения симптомов или осложнений, для замедления прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, до облегчения или ослабления симптомов и осложнений и/или лечения или устранения заболевания, расстройства или состояния, а также предотвращения состояния, при этом предотвращение должно пониматься как ведение и уход за индивидуумом с целью борьбы с заболеванием, состоянием или расстройством и включает введение активных соединений для предотвращения появления симптомов или осложнений. В одном воплощении «лечение» относится к введению эффективного количества терапевтически активного связывающего агента, такого как терапевтически активное антитело по настоящему изобретению, с целью ослабления, улучшения, купирования или искоренения (излечения) симптомов или болезненных состояний.

Устойчивость к лечению, отсутствие ответа и/или рецидив после обработки связывающим агентом по настоящему изобретению можно определить в соответствии с критериями оценки ответа при солидных опухолях; версия 1.1 (Критерии RECIST v1.1). Критерии RECIST изложены в таблице ниже (LD: самое длинное измерение).

Таблица 4. Определение ответа (критерии RECIST v1.1)

	Категория	Критерии
На основе целевых поражений	Полный ответ (CR)	Исчезновение всех целевых поражений. Любые патологические лимфатические узлы должны иметь уменьшение по короткой оси до <10 мм.
	Частичный ответ (PR)	Снижение суммы LD целевых поражений на $\geq 30\%$ , относительно исходной суммы LD.
	Стабильное заболевание (SD)	Ни достаточного снижения, чтобы претендовать на PR, ни достаточного увеличения, чтобы претендовать на PD, относительно наименьшей суммы LD с момента начала лечения.
	Прогрессирующее заболевание (PD)	Увеличение суммы LD целевых поражений на $\geq 20\%$ , принимая за основу наименьшую сумму LD, зарегистрированную с момента начала лечения или появления одного или нескольких новых поражений.
На основе нецелевых поражений	CR	Исчезновение всех нецелевых поражений и нормализация уровня онкомаркеров. Все лимфатические узлы должны быть непатологическими по размеру (короткая ось < 10 мм).
	SD	Сохранение одного или нескольких нецелевых поражений и/или поддержание уровня онкомаркеров выше нормальных пределов.
	PD	Появление одного или нескольких новых поражений и/или явное прогрессирование существующих нецелевых поражений.

«Лучший общий ответ» — это лучший ответ, зарегистрированный с начала лечения до прогрессирования/рецидива заболевания (наименьшие измерения, зарегистрированные с момента начала лечения, будут использоваться в качестве референсного значения для PD). Считается, что субъекты с CR или PR имеют объективный ответ. Субъекты с CR, PR или SD считаются находящимися под контролем заболевания. Субъекты с NE считаются не отвечающими на обработку. Наилучшим общим ответом является лучший ответ, зарегистрированный с начала лечения до прогрессирования/рецидива заболевания (наименьшие измерения, зарегистрированные с момента начала лечения, будут использоваться в качестве референсного значения для PD).

«Продолжительность ответа (DOR)» применяется только к субъектам, у которых подтвержденный лучший общий ответ — CR или PR, и определяется как время от первого документирования объективного ответа опухоли (CR или PR) до даты первого PD или смерти из-за онкологического заболевания.

«Выживаемость без прогрессирования (PFS)» определяется как количество дней от 1-го дня цикла 1 до первого документально подтвержденного прогрессирования или

смерти по любой причине.

«Общая выживаемость (OS)» определяется как количество дней от 1-го дня цикла 1 до смерти по любой причине. Если неизвестно, умер ли субъект, то OS будет оцениваться по последней дате, когда было известно, что субъект жив (на дату окончания или до нее).

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

Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения искомого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество связывающего агента (такого как мультиспецифическое, например, биспецифическое антитело) можно варьировать в зависимости от таких факторов, как заболевание, подлежащее лечению, состояние заболевания, тяжесть заболевания, индивидуальные параметры пациента (включая возраст, пол, физиологическое состояние, диету и массу пациента), продолжительность лечения, тип сопутствующей терапии (если присутствует), конкретный путь введения, способность связывающего агента (например, мультиспецифического, например, биспецифического антитела), чтобы вызвать искомый ответ у пациента, и подобные факторы. Соответственно, вводимые дозы агентов, описанных в данном документе, могут зависеть от множества таких параметров. Терапевтически эффективным количеством является также такое количество, в котором любые токсические или вредные эффекты связывающего агента (такого как мультиспецифическое, например, биспецифическое антитело) или его фрагмента перевешиваются терапевтически полезными эффектами. В случае, когда реакция пациента недостаточна при исходной дозе, могут использоваться более высокие дозы (или эффективно более высокие дозы, достигнутые с помощью другого более точно локализованного пути введения). В случае возникновения нежелательных побочных эффектов у пациента при применении определенной дозы можно использовать более низкие дозы (или фактически более низкие дозы, достигаемые другим, более локализованным путем введения).

Используемый в данной заявке термин «онкологическое заболевание»/«рак» включает заболевание, характеризующееся aberrантно регулируемым клеточным ростом, пролиферацией, дифференцировкой, адгезией и/или миграцией. Под «раковой клеткой» подразумевают аномальную клетку, которая растет за счет быстрой, неконтролируемой клеточной пролиферации и продолжает расти после прекращения действия стимулов, инициировавших новый рост.

Термин «онкологическое заболевание»/«рак» согласно настоящему изобретению включает лейкозы, семиномы, меланомы, тератомы, лимфомы, нейробластомы, глиомы, рак прямой кишки, рак эндометрия, рак почки, рак надпочечников, рак щитовидной железы, гемобластоз, рак кожи, рак головного мозга, рак шейки матки, рак кишечника, рак печени, рак толстой кишки, рак желудка, рак кишечника, рак головы и шеи, рак желудочно-кишечного тракта, рак лимфатических узлов, рак пищевода, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак уха, носа и горла (ЛОР), рак молочной железы, рак предстательной железы, рак матки, рак яичника и рак легкого и их метастазы. Примеры включают карциномы легкого, карциномы молочной железы, карциномы ободочной кишки, почечноклеточные карциномы, карциномы шейки матки или метастазы данных типов злокачественных опухолей или опухолей, описанных выше.

Термин «онкологическое заболевание»/«рак» согласно настоящему изобретению также включает метастазы злокачественной опухоли. Под «метастазированием» понимают распространение раковых клеток из места своего происхождения в другую часть организма. Образование метастаз представляет собой очень сложный процесс и зависит от отделения злокачественных клеток от первичной опухоли, инвазии внеклеточного матрикса, проникновения через эндотелиальную базальную мембрану для входа в брюшную полость и в сосуды, и затем при транспортировке с помощью кровотока от инфильтрации органов-мишеней. Наконец, рост новой опухоли, т.е. вторичной опухоли или метастатической опухоли в месте-мишени зависит от ангиогенеза. Опухолевое метастазирование часто происходит даже после удаления первичной опухоли, так как опухолевые клетки или компоненты могут оставаться и развивать метастатический потенциал. В одном воплощении термин «метастаз» согласно настоящему изобретению относится к «отдаленным метастазам», которые относятся к метастазам, удаленным от первичной опухоли и системы регионарных лимфатических узлов.

Такие термины, как «уменьшать» или «ингибировать», используемые в данной заявке, означают способность вызывать общее снижение, например, на около 5% или более, на около 10% или более, на около 15% или более, на около 20% или более, на около 25% или больше, на около 30% или более, на около 40% или более, на около 50% или более или на около 75% или более на уровне. Термин «ингибирует» или ему подобные выражения включает полное или по существу полное ингибирование, т.е. снижение до нуля или по существу до нуля.

Такие термины, как «увеличение» или «усиление» в одном воплощении, относятся к увеличению или усилению, по меньшей мере, на около 10%, по меньшей мере, на около 20%, по меньшей мере, на около 30%, по меньшей мере, на около 40%, по меньшей мере,

на около 50%, по меньшей мере на около 80% или по меньшей мере на около 100%.

Используемый в данной заявке термин «физиологический рН» относится к рН около 7,5.

В настоящем изобретении «% по массе» относится к массовым процентам, которые представляют собой единицу концентрации, измеряющую количество вещества в граммах (г), выраженное в процентах от общей массы всей композиции в граммах (г).

Термин «замораживание» относится к затвердеванию жидкости, обычно с отводом тепла.

Термин «лиофилизировать» или «лиофилизация» относится к сушке замораживанием вещества путем его замораживания и последующего снижения окружающего давления (например, ниже 15 Па, например, ниже 10 Па, ниже 5 Па или 1 Па или менее), чтобы обеспечить возможность сублимации замороженной среды в веществе непосредственно из твердой фазы в газовую фазу. Таким образом, термины «лиофилизировать» и «сушить замораживанием» используются в данной заявке взаимозаменяемо.

Термин «рекомбинантный» в контексте настоящего изобретения означает «полученный с помощью генной инженерии». В одном воплощении «рекомбинантный объект» в контексте настоящего изобретения не встречается в природе.

Термин «природный» при использовании в данной заявке обозначает тот факт, что объект может быть обнаружен в естественной среде. Например, пептид или нуклеиновая кислота, которая присутствует в организме (включая вирусы) и может быть выделена из источника в естественной среде и которая не была специально модифицирована человеком в лаборатории, является природной. Термин «найденный в природе» означает «присутствующий в природе» и включает известные объекты, а также объекты, которые еще не были обнаружены и/или выделены из природного окружения, но которые могут быть обнаружены и/или выделены в будущем из природного источника.

В соответствии с настоящим раскрытием термин «пептид» включает олиго- и полипептиды и относится к веществам, которые содержат около двух или более, около 3 или более, около 4 или более, около 6 или более, около 8 или более, около 10 или более, около 13 или более, около 16 или более, около 20 или более и вплоть до около 50, около 100 или около 150 последовательных аминокислот, связанных друг с другом пептидными связями. Термин «белок» относится к большим пептидам, в частности пептидам, имеющим по меньшей мере около 151 аминокислоту, но термины «пептид» и «белок» используются в данной заявке обычно как синонимы.

«Терапевтический белок» оказывает положительное или благоприятное действие на состояние или болезненное состояние объекта, когда предоставляется субъекту в



терапевтически эффективным количестве. В одном воплощении терапевтический белок обладает лечебными или паллиативными свойствами и может вводиться для улучшения, облегчения, смягчения, обращения, отсрочки наступления или уменьшения тяжести одного или нескольких симптомов заболевания или расстройства. Терапевтический белок может обладать профилактическими свойствами и может использоваться для отсрочки начала заболевания или для уменьшения тяжести такого заболевания или патологического состояния. Термин «терапевтический белок» включает полные белки или пептиды, а также может относиться к их терапевтически активным фрагментам. Он также может включать терапевтически активные варианты белка. Примеры терапевтически активных белков включают, без ограничения указанным, антигены для вакцинации и иммуностимуляторы, такие как цитокины.

Термин «участок» относится к части. По отношению к конкретной структуре, такой как аминокислотная последовательность или белок, термин его «участок» может означать непрерывную или дискретную часть указанной структуры.

Термины «часть» и «фрагмент» используются в данной заявке взаимозаменяемо и относятся к непрерывному элементу. Например, часть структуры, такой как аминокислотная последовательность или белок, относится к непрерывному элементу указанной структуры. При использовании в контексте композиции термин «часть» означает часть композиции. Например, часть композиции может составлять от 0,1% до 99,9% (например, 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 50%, 90% или 99%) указанной композиции.

«Фрагмент» со ссылкой на аминокислотную последовательность (пептид или белок) относится к части аминокислотной последовательности, то есть последовательности, которая представляет аминокислотную последовательность, укороченную на N-конце и/или C-конце. Фрагмент, укороченный на C-конце (N-концевой фрагмент), можно получить, например, путем трансляции укороченной открытой рамки считывания, в которой отсутствует 3'-конец открытой рамки считывания. Фрагмент, укороченный на N-конце (C-концевой фрагмент), может быть получен, например, путем трансляции укороченной открытой рамки считывания, в которой отсутствует 5'-конец открытой рамки считывания, при условии, что укороченная открытая рамка считывания содержит стартовый кодон, служащий для инициации трансляции. Фрагмент аминокислотной последовательности содержит, например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% аминокислотных остатков аминокислотной последовательности. Фрагмент аминокислотной последовательности предпочтительно содержит по меньшей мере 6, в частности, по меньшей мере 8, по меньшей мере 12, по меньшей мере 15, по меньшей

мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 50 или по меньшей мере 100 последовательных аминокислот из аминокислотной последовательности.

В соответствии с настоящим изобретением часть или фрагмент пептида или белка предпочтительно обладает по меньшей мере одним функциональным свойством пептида или белка, из которого она получена. Такие функциональные свойства включают фармакологическую активность, взаимодействие с другими пептидами или белками, ферментативную активность, взаимодействие с антителами и избирательное связывание нуклеиновых кислот. Например, фармакологически активный фрагмент пептида или белка обладает по меньшей мере одной из фармакологических активностей пептида или белка, из которого получен этот фрагмент. Часть или фрагмент пептида или белка предпочтительно содержит последовательность из по меньшей мере 6, в частности, по меньшей мере 8, по меньшей мере 10, по меньшей мере 12, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30 или по меньшей мере 50 последовательных аминокислот пептида или белка. Часть или фрагмент пептида или белка предпочтительно содержит последовательность до 8, в частности до 10, до 12, до 15, до 20, до 30 или до 55 последовательных аминокислот пептида или белка.

Под «вариантом» в данной заявке подразумевается аминокислотная последовательность, которая отличается от исходной аминокислотной последовательности на основании по меньшей мере одной модификации аминокислоты. Исходная аминокислотная последовательность может быть аминокислотной последовательностью природного или дикого типа (WT) или может быть модифицированной версией аминокислотной последовательности дикого типа. Предпочтительно вариантная аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с исходной аминокислотной последовательностью, например, от 1 до около 20 аминокислотных модификаций, и предпочтительно от 1 до около 10 или от 1 до около 5 аминокислотных модификаций по сравнению с исходной.

Под «диким типом», «WT» или «нативной» в данной заявке подразумевается аминокислотная последовательность, которая встречается в природе, включая аллельные варианты. Аминокислотная последовательность дикого типа, пептид или белок имеет аминокислотную последовательность, которая не была намеренно модифицирована.

Предпочтительно степень сходства, предпочтительно идентичности между данной аминокислотной последовательностью и аминокислотной последовательностью, которая является вариантом указанной данной аминокислотной последовательности, будет составлять по меньшей мере около 60%, 65%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%,

87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99%. Степень сходства или идентичности дается предпочтительно для аминокислотной области, которая составляет по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере, около 70%, по меньшей мере, около 80%, по меньшей мере, около 90% или около 100% всей длины референсной аминокислотной последовательности. Например, если референсная аминокислотная последовательность состоит из 200 аминокислот, то степень сходства или идентичности дается предпочтительно для по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 120, по меньшей мере около 140, по меньшей мере около 160, по меньшей мере около 180 или по меньшей мере около 200 аминокислот, в некоторых воплощениях непрерывных аминокислот. В некоторых воплощениях степень сходства или идентичности указана для всей длины референсной аминокислотной последовательности. Выравнивание для определения сходства последовательностей, предпочтительно идентичности последовательностей, может быть выполнено с помощью известных в данной области инструментов, предпочтительно с использованием наилучшего выравнивания последовательностей, например, с помощью Align, с использованием стандартных настроек, предпочтительно EMBOSS:: Needle, Matrix: Blosum62, штраф за открытие разрыва 10,0, штраф за продолжение разрыва 0,5.

«Сходство последовательностей» указывает процент аминокислот, которые либо идентичны, либо представляют собой консервативные аминокислотные замены. «Идентичность последовательностей» между двумя аминокислотными последовательностями указывает процент аминокислот, которые идентичны между последовательностями. «Идентичность последовательностей» между двумя последовательностями нуклеиновых кислот указывает процент нуклеотидов, которые идентичны между последовательностями.

Термины «идентичный на %», «% идентичности» или аналогичные термины предназначены для обозначения, в частности, процента нуклеотидов или аминокислот, которые идентичны при оптимальном выравнивании между сравниваемыми последовательностями. Указанный процент является чисто статистическим, и различия между двумя последовательностями могут быть, но не обязательно, случайным образом распределены по всей длине сравниваемых последовательностей. Сравнение двух последовательностей обычно проводят путем сравнения последовательностей после оптимального выравнивания относительно сегмента или «окна сравнения», чтобы

идентифицировать локальные области соответствующих последовательностей. Оптимальное выравнивание для сравнения может быть выполнено вручную или с помощью алгоритма локальной гомологии Smith and Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482, с помощью алгоритма локальной гомологии Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, с помощью алгоритма поиска подобия Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 2444 или с помощью компьютерных программ, использующих указанные алгоритмы (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, Висконсин). В некоторых воплощениях процент идентичности двух последовательностей определяется с использованием алгоритма BLASTN или BLASTP, доступного на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) (например,

[blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch&BLAST\\_SPEC=blast2seq &LINK\\_LOC=align2seq](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq)). В некоторых воплощениях параметры алгоритма, используемые для алгоритма BLASTN на веб-сайте NCBI, включают: (i) ожидаемое пороговое значение, равное 10; (ii) Размер слова равен 28; (iii) Максимальное количество совпадений в диапазоне запроса, равно 0; (iv) Показатели соответствия/несоответствия равны 1, -2; (v) цена разрыва установлена на Linear; и (vi) для областей низкой сложности используется фильтр. В некоторых воплощениях параметры алгоритма, используемые для алгоритма BLASTP на веб-сайте NCBI, включают: (i) ожидаемое пороговое значение, равное 10; (ii) размер слова установлен на 3; (iii) максимальное количество совпадений в диапазоне запроса, равно 0; (iv) матрица BLOSUM62; (v) цена разрыва установлена на наличие: 11 удлинение: 1; и (vi) корректировка условной композиционной матрицы баллов.

Идентичность в процентах получается путем определения количества идентичных положений, которым соответствуют сравниваемые последовательности, деления этого числа на количество сравниваемых положений (например, количества положений в референсной последовательности) и умножения этого результата на 100.

В некоторых воплощениях указана степень сходства или идентичности для области, которая составляет по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или около 100% по всей длине референсной последовательности. Например, если референсная аминокислотная последовательность состоит из 200 аминокислотных остатков, степень идентичности указывается по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 120, по меньшей мере около 140, по меньшей мере около 160, по меньшей мере около 180 или примерно 200 аминокислотных остатков, в некоторых воплощениях непрерывных

аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях степень сходства или идентичности указана для всей длины референсной последовательности.

Гомологичные аминокислотные последовательности согласно настоящему изобретению составляют по меньшей мере 40%, в частности по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% и предпочтительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотных остатков.

Описанные в данной заявке варианты аминокислотной последовательности могут быть легко получены специалистом, например, путем манипуляций с рекомбинантной ДНК. Манипуляции с последовательностями ДНК для получения пептидов или белков, содержащих замены, добавления, вставки или делеции, подробно описаны, например, в Sambrook et al. (1989). Кроме того, описанные в данной заявке пептиды и варианты аминокислот могут быть легко получены с помощью известных методов синтеза пептидов, таких как, например, твердофазный синтез и аналогичные способы.

В одном воплощении фрагмент или вариант аминокислотной последовательности (пептид или белок) предпочтительно представляет собой «функциональный фрагмент» или «функциональный вариант». Термин «функциональный фрагмент» или «функциональный вариант» аминокислотной последовательности относится к любому фрагменту или варианту, проявляющему одно или несколько функциональных свойств, идентичных или аналогичных свойствам аминокислотной последовательности, из которой он получен, т.е. он функционально эквивалентен. В отношении антигенов или антигенных последовательностей одна конкретная функция является одной или несколькими иммуногенными активностями, проявляемыми аминокислотной последовательностью, из которой получен фрагмент или вариант. Термин «функциональный фрагмент» или «функциональный вариант», используемый в данной заявке, в частности, относится к вариантной молекуле или последовательности, которая содержит аминокислотную последовательность, измененную одной или несколькими аминокислотами по сравнению с аминокислотной последовательностью исходной молекулы или последовательности, и которая все еще способна выполнять одну или несколько функций исходной молекулы или последовательности, например, индуцировать иммунный ответ. В одном воплощении модификации в аминокислотной последовательности исходной молекулы или последовательности существенно не влияют на характеристики молекулы или последовательности и не изменяют их. В различных воплощениях функция функционального фрагмента или функционального варианта может быть снижена, но все еще в значительной степени присутствовать, например, иммуногенность

функционального варианта может составлять по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90% исходной молекулы или последовательности. Однако в других воплощениях иммуногенность функционального фрагмента или функционального варианта может быть повышена по сравнению с исходной молекулой или последовательностью.

Аминокислотная последовательность (пептид, белок или полипептид), «полученная из» обозначенной аминокислотной последовательности (пептида, белка или полипептида), относится к происхождению первой аминокислотной последовательности. Предпочтительно аминокислотная последовательность, происходящая из конкретной аминокислотной последовательности, имеет аминокислотную последовательность, которая идентична, по существу идентична или гомологична этой конкретной последовательности или ее фрагменту. Аминокислотные последовательности, полученные из конкретной аминокислотной последовательности, могут быть вариантами этой конкретной последовательности или ее фрагмента. Например, специалисту в данной области должно быть понятно, что антигены, подходящие для применения в настоящей заявке, могут быть изменены таким образом, что их последовательность отличается от встречающихся в природе или нативных последовательностей, из которых они были получены, при сохранении желаемой активности нативных последовательностей.

«Выделенный» означает измененный или изъятый из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественно присутствующие в живом животном, не выделены, но та же самая нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сосуществующих материалов их естественного состояния, являются «выделенными». Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в по существу очищенной форме или могут существовать в ненативной среде, такой как, например, клетка-хозяин. В предпочтительном воплощении связывающий агент, используемый в настоящем раскрытии, находится в существенно очищенной форме.

Термин «генетическая модификация» или просто «модификация» включает трансфекцию клеток нуклеиновой кислотой. Термин «трансфекция» относится к введению нуклеиновых кислот, в частности РНК, в клетку. Для целей настоящего изобретения термин «трансфекция» также включает введение нуклеиновой кислоты в клетку или поглощение нуклеиновой кислоты такой клеткой, при этом клетка может присутствовать у субъекта, например, пациента. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением клетка для трансфекции нуклеиновой кислоты, описанной в настоящей заявке, может присутствовать *in vitro* или *in vivo*, например, клетка может

составлять часть органа, ткани и/или организма пациента. Согласно настоящему изобретению трансфекция может быть транзиторной или стабильной. Для некоторых применений трансфекции достаточно, если трансфицированный генетический материал экспрессируется только транзиторно. РНК может быть трансфицирована в клетки для транзиторной экспрессии кодируемого ею белка. Поскольку нуклеиновая кислота, введенная в процессе трансфекции, обычно не интегрируется в ядерный геном, чужеродная нуклеиновая кислота будет разбавлена в результате митоза или расщеплена. Клетки, допускающие эписомальную амплификацию нуклеиновых кислот, значительно снижают скорость разбавления. Если желательно, чтобы трансфицированная нуклеиновая кислота действительно оставалась в геноме клетки и ее дочерних клеток, то необходимо проводить стабильную трансфекцию. Такая стабильная трансфекция может быть достигнута с использованием систем на основе вирусов или систем на основе транспозонов для трансфекции. Как правило, нуклеиновая кислота, кодирующая антиген, транзиторно трансфицируется в клетки. РНК может быть трансфицирована в клетки для транзиторной экспрессии кодируемого ею белка.

В соответствии с настоящим изобретением аналог пептида или белка представляет собой модифицированную форму указанного пептида или белка, из которого он получен, и обладает по меньшей мере одним функциональным свойством указанного пептида или белка. Например, фармакологически активный аналог пептида или белка обладает по меньшей мере одной из фармакологических активностей пептида или белка, из которого был получен аналог. Такие модификации включают любую химическую модификацию и включают одну или несколько замен, делеций и/или добавлений любых молекул, связанных с белком или пептидом, таких как углеводы, липиды и/или белки или пептиды. В одном воплощении «аналоги» белков или пептидов включают те модифицированные формы, которые получены в результате гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования, амидирования, пальмитоилирования, миристоилирования, изопренилирования, липидирования, алкилирования, дериватизации, введения защитных/блокирующих групп, протеолитического расщепления или связывания с антителом или к другому клеточному лиганду. Термин «аналог» также распространяется на все функциональные химические эквиваленты указанных белков и пептидов.

«Активация» или «стимуляция» в контексте настоящего описания относится к состоянию иммунной эффекторной клетки, такой как Т-клетка, которая была достаточно стимулирована, чтобы вызвать детектируемую клеточную пролиферацию. Активация также может быть связана с инициацией сигнальных путей, индуцированным продуцированием цитокинов и детектируемыми эффекторными функциями. Термин

«активированные иммунные эффекторный клетки» относится, среди прочего, к иммунным эффекторным клеткам, которые подвергаются клеточному делению.

Термин «примирование» относится к процессу, при котором иммунная эффекторная клетка, такая как Т-клетка, вступает в первый контакт со своим специфическим антигеном и вызывает дифференцировку в эффекторные клетки, такие как эффекторные Т-клетки.

Термин «клональное размножение» или «размножение» относится к процессу, при котором приумножается конкретный объект. В контексте настоящего изобретения термин предпочтительно используется в контексте иммунологического ответа, при котором иммунные эффекторные клетки стимулируются антигеном, пролиферируют и амплифицируется специфическая иммунная эффекторная клетка, распознающая указанный антиген. Предпочтительно клональная экспансия приводит к дифференцировке иммунных эффекторных клеток.

«Антиген» в соответствии с настоящим изобретением охватывает любое вещество, которое будет вызывать иммунный ответ, и/или любое вещество, против которого направлен иммунный ответ или иммунный механизм, такой как клеточный ответ. Это также включает ситуации, когда антиген процессируется в антигенные пептиды, и иммунный ответ или иммунный механизм направлен против одного или нескольких антигенных пептидов, в частности, если они представлены в контексте молекул МНС. В частности, «антиген» относится к любому веществу, предпочтительно пептиду или белку, которое специфически реагирует с антителами или Т-лимфоцитами (Т-клетками). В соответствии с настоящим изобретением термин «антиген» включает любую молекулу, которая содержит по меньшей мере один эпитоп, такой как Т-клеточный эпитоп. Предпочтительно антиген в контексте настоящего изобретения представляет собой молекулу, которая, необязательно, после процессинга индуцирует иммунную реакцию, предпочтительно специфичную для антигена (включая клетки, экспрессирующие антиген). В одном воплощении антиген представляет собой антиген, ассоциированный с заболеванием, такой как опухолевый антиген, вирусный антиген или бактериальный антиген, или эпитоп, полученный из такого антигена.

В соответствии с настоящим изобретением можно использовать любой подходящий антиген, который является кандидатом на иммунный ответ, при этом иммунный ответ может быть как гуморальным, так и клеточным иммунным ответом. В контексте некоторых воплощений настоящего изобретения антиген предпочтительно презентуется клеткой, предпочтительно антигенпрезентирующей клеткой, в контексте молекул МНС, что приводит к иммунному ответу против антигена. Антиген



предпочтительно представляет собой продукт, который соответствует природному антигену или выделен из него. Такие встречающиеся в природе антигены могут включать аллергены, вирусы, бактерии, грибы, паразиты и другие инфекционные агенты и патогены или могут быть получены из них, или антиген также может быть опухолевым антигеном. Согласно настоящему изобретению антиген может соответствовать встречающемуся в природе продукту, например, вирусному белку или его части.

Термин «антиген, ассоциированный с заболеванием» используется в самом широком смысле для обозначения любого антигена, ассоциированного с заболеванием. Антиген, связанный с заболеванием, представляет собой молекулу, которая содержит эпитопы, которые будут стимулировать иммунную систему хозяина для выработки клеточного антиген-специфического иммунного ответа и/или гуморального ответа антител против заболевания. Антигены, ассоциированные с заболеванием, включают антигены, ассоциированные с патогенами, т.е. антигены, которые связаны с инфекцией микробами, обычно микробные антигены (такие как бактериальные или вирусные антигены), или антигены, ассоциированные с онкологическим заболеванием, обычно опухолями, такие как опухолевые антигены.

В предпочтительном воплощении антиген представляет собой опухолевой антиген, т.е. часть опухолевой клетки, в частности те, которые преимущественно встречаются внутриклеточно или в виде поверхностных антигенов опухолевых клеток. В другом воплощении антиген представляет собой антиген, ассоциированный с патогеном, то есть антиген, полученный из патогена, например, из вируса, бактерии, одноклеточного организма или паразита, например, вирусный антиген, такой как вирусный рибонуклеопротеин или белок оболочки. В частности, антиген должен быть представлен молекулами МНС, что приводит к модуляции, в частности к активации клеток иммунной системы, предпочтительно CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, в частности, посредством модуляции активности Т-клеточного рецептора.

Термин «опухолевой антиген» относится к компоненту раковых клеток, который может происходить из цитоплазмы, клеточной поверхности или клеточного ядра. В частности, это относится к тем антигенам, которые продуцируются внутриклеточно или как поверхностные антигены на опухолевых клетках. Например, опухолевые антигены включают карциноэмбриональный антиген,  $\alpha 1$ -фетопротеин, изоферритин и фетальный сульфогликопротеин,  $\alpha 2$ -Н-ферропротеин и  $\gamma$ -фетопротеин, а также различные вирусные опухолевые антигены. В соответствии с настоящим изобретением опухолевый антиген предпочтительно включает любой антиген, характерный для опухолей или онкологических заболеваний, а также для опухолевых или раковых клеток в отношении

типа и/или уровня экспрессии.

Термин «вирусный антиген» относится к любому вирусному компоненту, обладающему антигенными свойствами, т.е. способному вызывать иммунный ответ у индивидуума. Вирусный антиген может быть вирусным рибонуклеопротеином или белком оболочки.

Термин «бактериальный антиген» относится к любому бактериальному компоненту, обладающему антигенными свойствами, то есть способному вызывать иммунный ответ у индивидуума. Бактериальный антиген может происходить из клеточной стенки или цитоплазматической мембраны бактерии.

Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте в молекуле, такой как антиген, т.е. к части или фрагменту молекулы, которая распознается иммунной системой, например, которая распознается антителами, Т-клетками или В-клетками, в частности, когда представлена в контексте молекул МНС. В одном воплощении «эпитоп» означает белковую детерминанту, способную специфически связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первым, но не со вторым, прекращается в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании, и другие аминокислотные остатки, которые не участвуют непосредственно в связывании, например, аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются или покрываются специфически антигенсвязывающим пептидом (другими словами, аминокислотный остаток находится в зоне действия конкретно антигенсвязывающего пептида).

Эпитоп белка предпочтительно включает непрерывную или прерывистую часть указанного белка и предпочтительно составляет от около 5 до около 100, предпочтительно от около 5 до около 50, более предпочтительно от около 8 до около 0, наиболее предпочтительно от около 10 до около 25 аминокислот в длину, например, эпитоп может предпочтительно состоять из 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот в длину. Особенно предпочтительно, чтобы эпитоп в контексте настоящего изобретения представлял собой Т-клеточный эпитоп.

Такие термины, как «эпитоп», «фрагмент антигена», «иммуногенный пептид» и «антигенный пептид», используются в данной заявке взаимозаменяемо и предпочтительно относятся к неполной презентации антигена, предпочтительно способной вызывать иммунный ответ против антигена или клетки, экспрессирующей или содержащей и

предпочтительно презентующей антиген. Предпочтительно, термины относятся к иммуногенному участку антигена. Предпочтительно, это часть антигена, которая распознается (т.е. специфично связывается) Т-клеточным рецептором, конкретно, если эта часть презентируется в контексте молекул МНС. Некоторые предпочтительные иммуногенные части связываются с молекулой МНС класса I или класса II. Термин «эпитоп» относится к части или фрагменту молекулы, такой как антиген, которая распознается иммунной системой. Например, эпитоп может распознаваться Т-клетками, В-клетками или антителами. Эпитоп антигена может включать непрерывную или прерывистую часть антигена и может иметь от около 5 до около 100, например, от около 5 до около 50, более предпочтительно от около 8 до около 30, наиболее предпочтительно от около 8 до около 25 аминокислот в длину, например, эпитоп может предпочтительно иметь 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот в длину. В одном воплощении эпитоп имеет от около 10 до около 25 аминокислот в длину. Термин «эпитоп» включает эпитопы Т-клеток.

Термин «Т-клеточный эпитоп» относится к части или фрагменту белка, который распознается Т-клеткой, когда он представлен в контексте молекул МНС. Термин «главный комплекс гистосовместимости» и сокращение «МНС» включают молекулы МНС класса I и МНС класса II и относятся к комплексу генов, который присутствует у всех позвоночных. Белки или молекулы МНС важны для передачи сигналов между лимфоцитами и антигенпрезентирующими клетками или больными клетками в иммунных реакциях, где белки или молекулы МНС связывают пептидные эпитопы и представляют их для распознавания рецепторами Т-клеток на Т-клетках. Белки, кодируемые МНС, экспрессируются на поверхности клеток и презентуют как аутоантигены (пептидные фрагменты из самой клетки), так и не аутоантигены (например, фрагменты вторгшихся микроорганизмов) Т-клетке. В случае комплексов МНС/пептид класса I связывающие пептиды обычно имеют от около 8 до около 10 аминокислот в длину, хотя и более длинные или более короткие пептиды могут быть эффективными. В случае комплексов МНС/пептид класса II связывающие пептиды обычно имеют от около 10 до около 25 аминокислот в длину, в частности от около 13 до около 18 аминокислот, при этом и более длинные и более короткие пептиды могут быть эффективными.

Пептидный и белковый антиген может содержать от 2 до 100 аминокислот, включая, например, 5 аминокислот, 10 аминокислот, 15 аминокислот, 20 аминокислот, 25 аминокислот, 30 аминокислот, 35 аминокислот, 40 аминокислот, 45 аминокислот, аминокислот, или 50 аминокислот в длину. В некоторых воплощениях пептид может содержать более 50 аминокислот. В некоторых воплощениях пептид может содержать

более 100 аминокислот.

Пептидный или белковый антиген может быть любым пептидом или белком, который может индуцировать или увеличивать способность иммунной системы вырабатывать антитела и Т-клеточные ответы на пептид или белок.

В одном воплощении вакцинный антиген, т.е. антиген, введение которого субъекту вызывает иммунный ответ, распознается иммунной эффекторной клеткой. Предпочтительно вакцинный антиген, если он распознается иммунной эффекторной клеткой, способен в присутствии соответствующих костимулирующих сигналов индуцировать стимуляцию, примирование и/или экспансию иммунной эффекторной клетки, несущей антигенный рецептор, распознающий вакцинный антиген. В контексте воплощений настоящего изобретения вакцинный антиген предпочтительно представлен или присутствует на поверхности клетки, предпочтительно антигенпрезентирующей клетки. В одном воплощении антиген представлен больной клеткой (такой как опухолевая клетка или инфицированная клетка). В одном воплощении рецептор антигена представляет собой TCR, который связывается с эпитопом антигена, представленного в контексте МНС. В одном воплощении связывание TCR, когда он экспрессируется Т-клетками и/или присутствует на Т-клетках, с антигеном, презентуемым клетками, такими как антигенпрезентирующие клетки, приводит к стимуляции, примированию и/или экспансии указанных Т-клеток. В одном воплощении связывание TCR, когда он экспрессируется Т-клетками и/или присутствует на Т-клетках, с антигеном, представленным на пораженных клетках, приводит к цитолизу и/или апоптозу пораженных клеток, при этом указанные Т-клетки предпочтительно высвобождают цитотоксические факторы, например, перфорины и гранзимы.

В одном воплощении антигенный рецептор представляет собой антитело или В-клеточный рецептор, который связывается с эпитопом в антигене. В одном воплощении антитело или В-клеточный рецептор связывается с нативными эпитопами антигена.

Термин «экспрессируется на клеточной поверхности» или «ассоциируется с клеточной поверхностью» означает, что молекула, такая как антиген, связана с плазматической мембраной клетки и расположена на ней, при этом по меньшей мере часть молекулы обращена во внеклеточное пространство указанной клетки и доступна снаружи указанной клетки, например, для антител, находящихся вне клетки. В этом контексте часть предпочтительно состоит из по меньшей мере 4, предпочтительно по меньшей мере 8, предпочтительно по меньшей мере 12, более предпочтительно по меньшей мере 20 аминокислот. Ассоциация может быть прямой или косвенной. Например, ассоциация может быть связана с одним или несколькими трансмембранными

доменами, одним или несколькими липидными якорями или может быть взаимодействием с любым другим белком, липидом, сахаридом или другой структурой, которая может быть обнаружена на внешнем слое плазматической мембраны клетки. Например, молекула, связанная с поверхностью клетки, может быть трансмембранным белком, имеющим внеклеточную часть, или может быть белком, связанным с поверхностью клетки путем взаимодействия с другим белком, который является трансмембранным белком.

«Клеточная поверхность» или «поверхность клетки» используется в соответствии с ее обычным значением в данной области и, таким образом, включает внешнюю часть клетки, доступную для связывания белками и другими молекулами. Антиген экспрессируется на поверхности клеток, если он расположен на поверхности указанных клеток и доступен для связывания, например, антиген-специфическими антителами, добавленными к клеткам.

Термин «внеклеточная часть» или «экзомен» в контексте настоящего изобретения относится к части молекулы, такой как белок, которая обращена к внеклеточному пространству клетки и предпочтительно доступна снаружи указанной клетки, например, путем связывания молекул, таких как антитела, расположенных вне клетки. Предпочтительно термин относится к одной или нескольким внеклеточным петлям или доменам или их фрагментам.

Термины «Т-клетка» и «Т-лимфоцит» используются взаимозаменяемо в данной заявке и включают Т-хэлперные клетки (CD4<sup>+</sup> Т-клетки) и цитотоксические Т-клетки (ЦТЛ, CD8<sup>+</sup> Т-клетки), которые включают цитолитические Т-клетки. Термин «антиген-специфическая Т-клетка» или аналогичные термины относятся к Т-клетке, которая распознает антиген, на который нацелена Т-клетка, в частности, когда она представлена на поверхности антигенпрезентирующих клеток или больных клеток, таких как раковые клетки, в контексте молекул МНС и предпочтительно проявляет эффекторные функции Т-клеток. Т-клетки считаются специфичными к антигену, если они убивают клетки-мишени, экспрессирующие антиген. Специфичность Т-клеток можно оценить с помощью любого из множества стандартных методов, например, в рамках анализа высвобождения хрома или анализа пролиферации. В качестве альтернативы можно измерить синтез лимфокинов (таких как интерферон- $\gamma$ ). В некоторых воплощениях настоящего изобретения РНК (в частности, мРНК) кодирует по меньшей мере один эпитоп.

Термин «мишень» означает агент, такой как клетка или ткань, которая является мишенью для иммунного ответа, такого как клеточный иммунный ответ. Мишени включают клетки, которые презентуют антиген или антигенный эпитоп, то есть

пептидный фрагмент, полученный из антигена. В одном воплощении клетка-мишень представляет собой клетку, экспрессирующую антиген и предпочтительно презентующую указанный антиген с помощью МНС класса I.

«Процессирование антигена» относится к расщеплению антигена до продуктов процессирования, которые являются фрагментами указанного антигена (например, расщепление белка до пептидов), и ассоциации одного или нескольких из этих фрагментов (например, посредством связывания) с молекулами МНС для презентации клетками, предпочтительно антигенпрезентирующими клетками, специфичным Т-клеткам.

Под «антиген-чувствительными ЦТЛ» подразумеваются CD8<sup>+</sup> Т-клетки, которые отвечают на антиген или пептид, полученный из указанного антигена, который представлен МНС класса I на поверхности антиген-презентирующих клеток.

Согласно настоящему изобретению, ответ со стороны ЦТЛ может включать устойчивый приток кальция, деление клеток, выработку цитокинов, таких как IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , положительную регуляцию маркеров активации, таких как CD44 и CD69, и специфическое цитолитическое уничтожение мишени, экспрессирующей опухолевый антиген. клетки. Ответ со стороны ЦТЛ также может определяться с использованием искусственного репортера, который точно выявляет ответ со стороны ЦТЛ.

Термины «иммунный ответ» и «иммунная реакция» используются в данной заявке взаимозаменяемо в их обычном значении и относятся к комплексному ответу организма на антиген и предпочтительно относятся к клеточному иммунному ответу, гуморальному иммунному ответу или к обоим. Согласно настоящему изобретению термин «иммунный ответ на» или «иммунный ответ против» в отношении агента, такого как антиген, клетка или ткань, относится к иммунному ответу, такому как клеточный ответ, направленный против агента. Иммунный ответ может включать одну или несколько реакций, выбранных из группы, состоящей из выработки антител против одного или нескольких антигенов и экспансии антигенспецифических Т-лимфоцитов, предпочтительно CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, более предпочтительно CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, которые могут быть обнаружены в различных тестах на пролиферацию или продуцирование цитокинов *in vitro*.

Термины «индуцировать иммунный ответ» и «вызывать иммунный ответ» и аналогичные термины в контексте настоящего изобретения относятся к индукции иммунного ответа, предпочтительно к индукции клеточного иммунного ответа, гуморального иммунного ответа или того и другого. Иммунный ответ может быть защитным/превентивным/профилактическим и/или терапевтическим. Иммунный ответ

может быть направлен против любого иммуногена или антигена или антигенного пептида, предпочтительно против антигена, ассоциированного с опухолью, или антигена, ассоциированного с патогеном (например, антигена вируса (такого как вирус гриппа (А, В или С), CMV или RSV)). «Индукция» в этом контексте может означать, что до индукции не было иммунного ответа против конкретного антигена или патогена, но это также может означать, что увеличивается определенный уровень иммунного ответа против конкретного антигена или патогена до индукции и после индукции указанного иммунного ответа. Таким образом, «индуцирование иммунного ответа» в данном контексте также включает «усиление иммунного ответа». Предпочтительно, после индуцирования иммунного ответа у индивидуума указанный индивидуум защищен от развития заболевания, такого как инфекционное заболевание или онкологическое заболевание, или состояние болезни улучшается путем индуцирования иммунного ответа.

Термины «клеточный иммунный ответ», «клеточный ответ», «клеточно-опосредованный иммунитет» или аналогичные термины предназначены для включения клеточного ответа, направленного на клетки, характеризующиеся экспрессией антигена и/или презентацией антигена МНС класса I или класса II. Клеточный ответ относится к клеткам, называемым Т-клетками или Т-лимфоцитами, которые действуют либо как «помощники», либо как «киллеры». Вспомогательные Т-клетки (также называемые CD4+ Т-клетками) играют центральную роль, регулируя иммунный ответ, а клетки-киллеры (также называемые цитотоксическими Т-клетками, цитолитическими Т-клетками, CD8+ Т-клетками или ЦТЛ) убивают клетки, такие как больные клетки.

Термин «гуморальный иммунный ответ» относится к процессу в живых организмах, при котором антитела продуцируются в ответ на агенты и организмы, которые они в конечном итоге нейтрализуют и/или устраняют. Специфичность гуморального ответа опосредуется Т- и/или В-клетками через ассоциированные с мембраной рецепторы, которые связывают антиген с единственной специфичностью. После связывания соответствующего антигена и получения различных других активирующих сигналов В-лимфоциты делятся, в результате чего образуются В-клетки памяти, а также клоны плазматических клеток, секретирующие антитела, каждая из которых продуцирует антитела, распознающие идентичный антигенный эпитоп, распознаваемый его антигенным рецептором. В-лимфоциты памяти остаются бездействующими до тех пор, пока они впоследствии не будут активированы их специфическим антигеном. Эти лимфоциты обеспечивают клеточную основу памяти и, как следствие, эскалацию гуморального ответа при повторном воздействии специфического антигена.

Термины «вакцинация» и «иммунизация» описывают процесс лечения индивидуума в терапевтических или профилактических целях и относятся к процедуре введения одного или нескольких иммуногенов или антигенов или их производных, в частности, в форме РНК (особенно мРНК), кодирующая их, как описано в настоящей заявке, у индивидуума и стимулирующая иммунный ответ против указанного одного или нескольких иммуногенов или антигенов или клеток, характеризующихся презентацией указанного одного или нескольких иммуногенов или антигенов.

Под «клеткой, характеризующейся презентацией антигена», или «клеткой, презентующей антиген», или «молекулами МНС, которые презентуют антиген на поверхности антигенпрезентирующей клетки», или подобными выражениями подразумевается клетка, например, больная клетка, в частности опухолевая клетка или инфицированная клетка, или антигенпрезентирующая клетка, презентующая антиген или антигенный пептид, либо непосредственно, либо после процессирования, в контексте молекул МНС, предпочтительно молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, наиболее предпочтительно молекул МНС класса I.

В контексте настоящего изобретения термин «транскрипция» относится к процессу, при котором генетический код в последовательности ДНК транскрибируется в РНК (особенно в мРНК). Впоследствии РНК (особенно мРНК) может быть транслирована в пептид или белок.

Что касается РНК, термин «экспрессия» или «трансляция» относится к процессу в рибосомах клетки, посредством которого цепь мРНК направляет сборку последовательности аминокислот с образованием пептида или белка.

Используемый в данной заявке термин «необязательный» или «необязательно» означает, что описанное впоследствии событие, обстоятельство или условие может иметь место или не иметь место, и что описание включает случаи, когда указанное событие, обстоятельство или условие происходит, и случаи, когда они не происходят.

Используемый в данной заявке термин «эндогенный» относится к любому материалу из или продуцируемому внутри организма, клетки, ткани или системы.

Термин «экспрессия», используемый в данной заявке, определяется как транскрипция и/или трансляция конкретной нуклеотидной последовательности.

Используемые в данной заявке термины «связанный», «объединенный» или «объединение» используются взаимозаменяемо. Эти термины относятся к объединению двух или более элементов, компонентов или доменов.

Термин «заболевание» (также упоминаемый в данной заявке как «расстройство») относится к аномальному состоянию, поражающему организм индивидуума. Под



заболеванием часто понимают заболевание, связанное с определенными симптомами и признаками. Заболевание может быть вызвано факторами из внешнего источника, такими как инфекционное заболевание или оно может быть вызвано внутренними дисфункциями, такими как аутоиммунные заболевания. У людей «заболевание» часто используется в более широком смысле для обозначения любого состояния, которое вызывает боль, дисфункцию, дистресс, социальные проблемы или смерть индивидуума, страдающего этим заболеванием или аналогичные проблемы для тех, кто контактирует с этим индивидуумом. В этом более широком смысле болезнь иногда включает травмы, инвалидность, расстройства, синдромы, инфекции, отдельные симптомы, девиантное поведение и атипичные вариации структуры и функции, в то время как в других контекстах и для других целей их можно рассматривать как отдельные категории. Болезни обычно поражают индивидуумов не только физически, но и эмоционально, поскольку приобретение и жизнь с многими заболеваниями могут изменить взгляд на жизнь и личность.

Термин «терапевтическое лечение» относится к любому лечению, которое улучшает состояние здоровья и/или продлевает (увеличивает) продолжительность жизни индивидуума. Указанное лечение может устранить заболевание у индивидуума, остановить или замедлить развитие заболевания у индивидуума, подавить или замедлить развитие заболевания у индивидуума, уменьшить частоту или тяжесть симптомов у индивидуума и/или уменьшить рецидив у индивидуума, который в настоящее время имеет или ранее имел заболевание.

Термины «профилактическое лечение» или «превентивное лечение» относятся к любому лечению, которое предназначено для предотвращения возникновения заболевания у индивидуума. Термины «профилактическое лечение» или «превентивное лечение» используются в данной заявке взаимозаменяемо.

Термины «индивидуум» и «субъект» используются в данной заявке взаимозаменяемо. Они относятся к человеку или другому млекопитающему (например, мышь, крысе, кролику, собаке, кошке, крупному рогатому скоту, свинье, овце, лошади или примату) или любому другому животному, не являющемуся млекопитающим, включая птиц (курицу), рыбу или любые другие виды животных, которые могут быть поражены или подвержены заболеванию или расстройству (например, онкологическому заболеванию, инфекционным заболеваниям), но могут иметь или не иметь заболевание или расстройство, или могут нуждаться в профилактическом вмешательстве, таком как вакцинация, или могут иметь необходимость вмешательств, таких как замена белка. Во многих воплощениях индивидуумом является человек. Если не указано иное, термины

«индивидуум» и «субъект» не обозначают конкретный возраст и, таким образом, охватывают взрослых, пожилых, детей и новорожденных. В воплощениях настоящего изобретения «индивидуум» или «субъект» является «пациентом».

Термин «пациент» означает индивидуума или субъекта, подлежащего лечению, в частности, больного индивидуума или субъекта.

#### Аспекты и воплощения настоящего изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение предлагает связывающий агент для применения в способе уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли или лечения онкологического заболевания у субъекта, где указанный способ включает введение указанному субъекту связывающего агента в подходящем количестве, при этом связывающий агент содержит первую область связывания, связывающуюся с CD40 человека, таким как CD40 человека, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, и вторую область связывания, связывающуюся с CD137 человека, таким как CD137 человека, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, и вторую область связывания, связывающуюся с CD137 человека, таким как CD137 человека, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38. Например, способ может включать введение указанному субъекту по меньшей мере в одном цикле лечения связывающего агента в подходящем количестве, при этом связывающий агент содержит первую область связывания, связывающуюся с CD40 человека, например, с CD40 человека, содержащим указанную последовательность в SEQ ID NO: 36, и вторую область связывания, связывающуюся с CD137 человека, такую как CD137 человека, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38.

Предпочтительно количество вводимого связывающего агента, например, в каждой дозе и/или цикле лечения, может индуцировать внутриклеточную передачу сигналов при связывании с CD137, экспрессируемым на другой клетке. Таким образом, связывающий агент в подходящем количестве согласно настоящему изобретению способен транс-активировать две разные клетки. У людей CD40 экспрессируется на ряде клеток, включая антигенпрезентирующие клетки (АПК), такие как дендритные клетки, тогда как CD137 экспрессируется на Т-клетках и других клетках. Таким образом, связывающий агент, связывающийся с CD40 и CD137, в подходящем количестве согласно настоящему изобретению способен одновременно связываться с АПК и Т-клеткой, экспрессирующей эти рецепторы. Не желая быть связанными теорией, отметим, что связывающий агент может, таким образом, (i) опосредовать межклеточное взаимодействие между АПК и Т-клетками посредством связывания рецептора и (ii) одновременно активации как CD40, так и CD137, что в первую очередь индуцируется перекрестным связыванием и

кластеризацией рецепторов при межклеточном взаимодействии и не обязательно зависит от агонистической активности исходных моноспецифических двухвалентных антител. Таким образом, эти транс-активирующие связывающие агенты проявляют костимулирующую активность в контексте взаимодействий АПК:Т-клеток и могут вызывать ответ Т-клеток против опухолевых клеток. Таким образом, этот механизм действия может отражать естественную активацию Т-клеток посредством презентации антигена активированными АПК, что позволяет АПК представлять Т-клеткам различные опухолеспецифические антигены. Не желая быть связанными теорией, отметим, что костимулирующая активность может обеспечивать одно или несколько из числа (i) активации только определенных Т-клеток (т.е. тех, которые находятся в контакте с АПК), в отличие от любой Т-клетки; (ii) повторной активации истощенных Т-клеток путем сильной совместной стимуляции посредством активированных АПК и иницирования CD137; и (iii) примирования Т-клеток путем индукции презентации антигена активированными АПК и одновременного иницирования CD137.

Режим дозирования связывающего агента, раскрытого в настоящей заявке (например, используемый в способах, раскрытых в настоящей заявке), можно варьировать в зависимости, например, от показания, пути введения и тяжести состояния. В зависимости от пути введения подходящую дозу можно рассчитать в зависимости от массы тела, площади поверхности тела или размера органа. Окончательный режим дозирования может определить лечащий врач с учетом надлежащей медицинской практики, учитывая различные факторы, модифицирующие действие лекарственных средств, например, специфическую активность связывающего вещества, заболевание, подлежащее лечению, состояние заболевания, тяжесть заболевания, индивидуальных параметры пациента (включая возраст, пол, физиологическое состояние, диету и массу пациента), конкретный пути введения и восприимчивость субъекта. Дополнительные факторы, которые могут быть приняты во внимание, включают время и частоту введения, комбинации лекарственных средств, чувствительность реакции и переносимость/ответ на терапию. Дальнейшее уточнение доз, подходящих для лечения (с использованием, в частности, любой из композиций/составов, упомянутых в настоящей заявке), может осуществляться квалифицированным практикующим врачом в обычном порядке без ненужных экспериментов, особенно в свете информации о дозировании и анализе, раскрытых в настоящей заявке, а также данных фармакокинетики, полученных в клинических испытаниях на людях. Соответствующие дозы могут быть установлены с использованием установленных методов анализа для определения концентрации связывающего агента в жидкости организма или другом образце вместе с данными о

реакции на дозу. Выбранная композиция/состав и способ введения могут быть адаптированы к индивидуальному субъекту, природе заболевания, подлежащего лечению у субъекта, и, как правило, по усмотрению лечащего врача.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или цикле лечения, может, в частности, находиться в диапазоне, в котором больше 5%, предпочтительно больше 10%, более предпочтительно больше 15%, еще более предпочтительно больше 20%, еще более предпочтительно больше 25%, еще более предпочтительно больше 30%, еще более предпочтительно больше 35%, еще более предпочтительно больше 40%, еще более предпочтительно больше 45%, наиболее предпочтительно больше 50% указанных связующих агентов связываются как для CD40, так и для CD137.

В предпочтительных воплощениях количество вводимого связывающего агента, например, в каждой дозе и/или в каждом цикле лечения, составляет

а) около 0,04-2,5 мг/кг массы тела или около 3-200 мг в общей сложности; и/или

б) около  $0,25 \times 10^{-9}$  -  $16,9 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела или около  $20 \times 10^{-9}$  -  $1350 \times 10^{-9}$  моль в общей сложности.

В одном воплощении количество вводимого связывающего агента, например, в каждой дозе и/или в каждом цикле лечения, может составлять около 0,04-2,5 мг/кг массы тела, например, около 0,06-1,25 мг/кг массы тела, около 0,12 -0,75 мг/кг массы тела или около 0,25-0,38 мг/кг массы тела; или около 0,62-1,88 мг/кг массы тела, около 0,93-1,56 мг/кг массы тела, около 1,0-1,5 мг/кг массы тела или около 1,12-1,38 мг/кг массы тела; или около 1,25 мг/кг массы тела.

В одном воплощении количество вводимого связывающего агента, например, в каждой дозе и/или в каждом цикле лечения, может составлять около 3-200 мг в общей сложности, например, около 5-100 мг, около 10-60 мг или около 20-30 мг в общей сложности; или около 50-150 мг, около 75-125 мг, около 80-120 мг или около 90-110 мг в общей сложности; или около 100 мг в общей сложности.

В одном воплощении количество вводимого связывающего агента, например, в каждой дозе и/или в каждом цикле лечения, может составлять около  $0,25 \times 10^{-9}$ - $16,9 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела, например, около  $0,40 \times 10^{-9}$  -  $8,4 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела, около  $0,81 \times 10^{-9}$  -  $5,1 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела или около  $1,69 \times 10^{-9}$  -  $2,56 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела; или около  $4,18 \times 10^{-9}$  -  $12,7 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела, около  $6,28 \times 10^{-9}$  -  $10,5 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела, около  $6,75 \times 10^{-9}$  -  $10,1 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела, или около  $7,56 \times 10^{-9}$  -  $9,31 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела; или около  $8,44 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела.

В одном воплощении количество вводимого связывающего агента, например, в каждой дозе и/или в каждом цикле лечения, может составлять около  $20 \times 10^{-9}$ - $1350 \times 10^{-9}$

моль в общей сложности, например, около  $30 \times 10^{-9}$  -  $670 \times 10^{-9}$  моль, около  $60 \times 10^{-9}$  -  $410 \times 10^{-9}$  моль или около  $135 \times 10^{-9}$  -  $205 \times 10^{-9}$  моль в общей сложности; или около  $330 \times 10^{-9}$  -  $1020 \times 10^{-9}$  моль, около  $500 \times 10^{-9}$  -  $840 \times 10^{-9}$  моль, около  $540 \times 10^{-9}$  -  $810 \times 10^{-9}$  моль или около  $600 \times 10^{-9}$  -  $745 \times 10^{-9}$  моль в общей сложности; или около  $675 \times 10^{-9}$  моль в общей сложности.

Согласно этим воплощениям доза, определенная в мг/кг, может быть преобразована в фиксированную дозу и наоборот, исходя из средней массы тела субъектов, которым вводят связывающий агент, равной 80 кг.

Кроме того, количество вводимого связывающего агента, например, в каждой дозе и/или в каждом цикле лечения, может, в частности, составлять около 0,62-1,88 мг/кг массы тела (например, около 0,93-1,56 мг/кг массы тела, около 1,0-1,5 мг/кг массы тела, или около 1,12-1,38 мг/кг массы тела, или около 1,25 мг/кг массы тела) или около 50-150 мг (например, около 75-125 мг, около 80-120 мг, или около 90-110 мг, или около 100 мг) в общей сложности; и/или около  $4,18 \times 10^{-9}$  -  $12,7 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела (например, около  $6,28 \times 10^{-9}$  -  $10,5 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела, около  $6,75 \times 10^{-9}$  -  $10,1 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела, или около  $7,56 \times 10^{-9}$  -  $9,31 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела, или около  $8,44 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела) или около  $330 \times 10^{-9}$  -  $1020 \times 10^{-9}$  моль (например, около  $500 \times 10^{-9}$  -  $840 \times 10^{-9}$  моль, около  $540 \times 10^{-9}$  -  $810 \times 10^{-9}$  моль или около  $600 \times 10^{-9}$  -  $745 \times 10^{-9}$  моль, или около  $675 \times 10^{-9}$  моль) в общей сложности.

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту,

а) первая область связывания, связывающаяся с CD40 человека, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 7 или 9, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 8 или 10;

и

б) вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 17 или 19, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 18 или 20.

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту,

а) первая область связывания, связывающаяся с CD40 человека, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно;

и

b) вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 11, 12 и 13, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно.

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту,

a) первая область связывания, связывающаяся с CD40 человека, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7 или 9 и переменную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8 или 10;

b) вторая область связывания, связывающаяся с CD137 человека, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 25 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 17 или 19, и переменную область легкой цепи (VL), содержащая аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 18 или 20.

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту,

a) первая область связывания с CD40 человека содержит переменную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7 или 9, и переменную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8 или 10;

и

b) вторая область связывания, связывающаяся с CD137 человека, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17 или 19, и переменную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18 или 20.

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту,

a) первая область связывания, связывающаяся с CD40 человека, содержит

вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10;

и

b) вторая область связывания с CD137 человека содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20.

Связывающий агент может, в частности, представлять собой антитело, такое как мультиспецифическое антитело, например, биспецифическое антитело. Кроме того, связывающий агент может иметь форму полноразмерного антитела или фрагмента антитела.

Кроме того, предпочтительно, чтобы антитело представляло собой человеческое антитело или гуманизированное антитело.

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

Области, определяющие комплементарность (CDR), и каркасные области (FR) могут быть расположены от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

В одном воплощении первого аспекта связывающий агент содержит

i) полипептид, включающий указанную первую вариабельную область тяжелой цепи (VH) и первую константную область тяжелой цепи (CH), и

ii) полипептид, включающий указанную вторую вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вторую константную область тяжелой цепи (CH).

В одном воплощении первого аспекта связывающий агент содержит

i) полипептид, включающий указанную первую вариабельную область легкой цепи (VL) и дополнительно включающий первую константную область легкой цепи (CL), и

ii) полипептид, включающий указанную вторую вариабельную область легкой цепи (VL) и дополнительно включающий вторую константную область легкой цепи (CL).

В одном воплощении первого аспекта связывающий агент представляет собой антитело, содержащее первое связывающее плечо и второе связывающее плечо, где первое связывающее плечо содержит

i) полипептид, включающий указанную первую вариабельную область тяжелой

цепи (VH) и указанную первую константную область тяжелой цепи (CH), и

ii) полипептид, включающий указанную первую переменную область легкой цепи (VL) и указанную первую константную область легкой цепи (CL);

и второе связывающее плечо содержит

iii) полипептид, включающий указанную вторую переменную область тяжелой цепи (VH) и указанную вторую константную область тяжелой цепи (CH), и

iv) полипептид, включающий указанную вторую переменную область легкой цепи (VL) и указанную вторую константную область легкой цепи (CL).

Каждая из первой и второй константных областей тяжелой цепи (CH) может содержать одну или несколько из константной области тяжелой цепи 1 (CH1), шарнирной области, константной области 2 тяжелой цепи (CH2) и константной области тяжелой цепи 3 (CH3), предпочтительно, по меньшей мере, шарнирную область, область CH2 и область CH3.

Каждая из первой и второй константных областей тяжелой цепи (CH) может содержать область CH3, где две области CH3 содержат асимметричные мутации. Асимметричные мутации означают, что последовательности указанных первой и второй областей CH3 содержат аминокислотные замены в неидентичных положениях. Например, одна из указанных первой и второй областей CH3 содержит мутацию в положении, соответствующем положению 405 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU, а другая из указанных первой и второй областей CH3 содержит мутацию в положении, соответствующем положению 409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU.

В указанной первой константной области тяжелой цепи (CH) по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU, могла быть замещена, и в указанной второй константной области тяжелой цепи (CH) по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU могли быть заменены. В конкретных воплощениях первая и вторая тяжелые цепи не заменены в одних и тех же положениях (т.е. первая и вторая тяжелые цепи содержат асимметричные мутации).

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту (i) аминокислота в положении, соответствующем F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляет собой L в указанной первой константной области тяжелой цепи (CH), и аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU, представляет собой R в указанной второй



константной области тяжелой цепи (CH) или (ii) аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляет собой R в указанной первой тяжелой цепи, а аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU, представляет собой L в указанной второй тяжелой цепи.

В одном воплощении первого аспекта связывающий агент индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с другим антителом, содержащим те же первую и вторую антигенсвязывающие области и две константные области тяжелой цепи (CH), содержащие области шарнира, CH2 и CH3 IgG1 человека.

В одном конкретном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту указанные первая и вторая константные области тяжелой цепи (CH) модифицированы так, что антитело индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с антителом, которое идентично, за исключением содержащих немодифицированные первую и вторую константные области тяжелой цепи (CH). В частности, каждая или обе из указанных немодифицированных первой и второй константных областей тяжелой цепи (CH) могут содержать, состоять из или по существу состоять из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21 или 29.

Fc-опосредованную эффекторную функцию можно определить путем измерения связывания связывающего агента с Fcγ-рецепторами, связывания с C1q или индукции Fc-опосредованного перекрестного связывания Fcγ-рецепторов. В частности, Fc-опосредованную эффекторную функцию можно определить путем измерения связывания связывающего агента с C1q.

Первая и вторая константные области тяжелой цепи связывающего агента могут быть модифицированы таким образом, чтобы связывание C1q с указанным антителом было снижено по сравнению с антителом дикого типа, предпочтительно снижено по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или 100%, при этом связывание C1q предпочтительно определяют с помощью ELISA.

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту по меньшей мере в одной из указанных первой и второй константных областей тяжелой цепи (CH) одна или несколько аминокислот в положениях, соответствующих положениям L234, L235, D265, N297 и P331 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU, не являются L, L, D, N и P, соответственно.

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту, положения, соответствующие положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU, могут быть F и E, соответственно, в указанных первой и второй тяжелых цепях.

В частности, положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU, могут быть F, E и A, соответственно в указанных первой и второй константных областях тяжелой цепи (CH).

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту положения, соответствующие положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU как первой, так и второй константных областей тяжелой цепи, представляют собой F и E, соответственно, где (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU первой константной области тяжелой цепи, представляет собой L, а положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU второй тяжелой цепи, представляет собой R или (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU первой константной области тяжелой цепи, представляет собой R, а положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU второй тяжелой цепи цепь L.

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU как первой, так и второй константных областей тяжелой цепи, представляют собой F, E и A, соответственно, где (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU первой константной области тяжелой цепи, представляет собой L, а положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU вторая константная область тяжелой цепи представляет собой R, или (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU первой тяжелой цепи, представляет собой R, и положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU второй тяжелой цепи представляет собой L.

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

- a) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 29 [IgG1-FC];
- b) подпоследовательности последовательности из a), такой как

подпоследовательность, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в а); и

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

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту константная область указанной первой или второй тяжелой цепи, такая как вторая тяжелая цепь, содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 30 [IgG1-F405L];

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

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

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту константная область указанной первой или второй тяжелой цепи, такая как вторая тяжелая цепь, содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23 или 31 [IgG1-F409R];

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

с) последовательности, имеющей максимум 10 замен, например, максимум 9 замен, максимум 8, максимум 7, максимум 6, максимум 5, максимум 4 замены, максимум 3, максимум по большей мере 2 или по большей мере 1 замены по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту константная

область указанной первой и/или второй тяжелой цепи содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

a) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 32 [IgG1-Fc\_FEA];

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

c) последовательности, имеющей по большей мере 7 замен, например, по большей мере 6 замен, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 или по большей мере 1 замены по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в a) или b).

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи, например, второй тяжелой цепи, содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

a) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 33 [IgG1-Fc\_FEAL];

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

c) последовательности, имеющей по большей мере 6 замен, например, по большей мере 5 замен, по большей мере 4 замен, по большей мере 3, по большей мере 2 или по большей мере 1 замены по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в a) или b).

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи, такая как первая тяжелая цепь, содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

a) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 34 [IgG1-Fc\_FEAR];

b) подпоследовательности последовательности из a), такой как подпоследовательность, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных

аминокислот удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 6 замен, например, по большей мере 5 замен, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 или по большей мере 1 замены по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

В одном воплощении первого аспекта связывающий агент содержит константную область легкой цепи каппа ( $\kappa$ ).

В одном воплощении первого аспекта связывающий агент содержит константную область легкой цепи лямбда ( $\lambda$ ).

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту первая константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа ( $\kappa$ ) или константную область легкой цепи лямбда ( $\lambda$ ).

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту вторая константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи лямбда ( $\lambda$ ) или константную область легкой цепи каппа ( $\kappa$ ).

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту первая константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа ( $\kappa$ ), а вторая константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи лямбда ( $\lambda$ ) или первая константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи лямбда ( $\lambda$ ), а вторая константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа ( $\kappa$ ).

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту легкая цепь каппа ( $\kappa$ ) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 27;

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

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

В одном воплощении связывающего агента согласно первому аспекту легкая цепь

лямбда ( $\lambda$ ) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 28;

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

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

Связывающий агент (в частности, антитело) согласно первому аспекту имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В частности, связывающий агент может представлять собой полноразмерное антитело IgG1. В предпочтительных вариантах первого аспекта связывающий агент (в частности, антитело) относится к аллотипу IgG1m(f).

В дополнительных предпочтительных воплощениях связывающий агент представляет собой текагинлимаб или его биоаналог.

Субъектом, подлежащим лечению согласно настоящему изобретению, предпочтительно является человек.

В конкретных воплощениях опухоль или злокачественную опухоль выбирают из группы, состоящей из меланомы, рака легкого и колоректального рака.

Опухоль или злокачественная опухоль могут, в частности, представлять собой меланому. Меланома занимает 19-е место среди наиболее распространенных злокачественных опухолей со стандартизированным по возрасту показателем заболеваемости 3,0 на 100 000 (Ferlay et al., 2015). По оценкам, в 2018 году во всем мире было зарегистрировано около 287 700 новых случаев меланомы и 60 700 случаев смерти (Ferlay et al., 2018). В США в 2018 году было зарегистрировано около 91 270 новых случаев меланомы и около 9 320 смертей. Как и почти при всех злокачественных новообразованиях, исход меланомы зависит от стадии проявления. Растет понимание различий в конкретных генетических изменениях среди различных клинических подтипов меланомы, некоторые из которых имеют различное терапевтическое значение (NCCN, 2018a). Таким образом, выбор терапии первой линии основывается на индивидуальной оценке пациента.

Стандартный уход за пациентами с распространенной или метастатической

меланомой, прогрессирование которой происходит на фоне таргетной терапии или иммунотерапии, может включать высокие дозы интерлейкина (IL)-2 или другие цитотоксические методы лечения (например, дакарбазином, карбоплатином/паклитакселем, паклитакселем, связанным с альбумином, и т.д.). Эти агенты имеют небольшие частоты ответа – менее 20% при терапии первой и второй линии, и существует мало консенсуса относительно оптимальной стандартной химиотерапии (NCCN 2018a).

В одном воплощении злокачественная опухоль меланомы представляет собой меланому кожи, акральной оболочки или меланому слизистой оболочки.

В одном воплощении, где опухолью или злокачественной опухолью является меланома, субъект ранее получал до четырех системных курсов лечения распространенного/метастазирующего заболевания и у него наблюдалось прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, например, прогрессирование заболевания, определяемое рентгенографией.

В одном воплощении, где опухолью или злокачественной опухолью является меланома, субъект ранее получал лечение ингибитором(ами) контрольной точки, таким как агент(ы), нацеленный(ые) на PD-1/PD-L, такой как ингибитор PD-1/PD-L1.

Опухоль или злокачественная опухоль может, в частности, представлять собой колоректальный рак (КРР). КРР является третьей наиболее часто диагностируемой злокачественной опухолью у мужчин и второй у женщин. По оценкам, в 2018 году во всем мире было зарегистрировано около 1 096 600 новых случаев КРР и 551 300 смертей (Ferlay et al., 2018). По оценкам, в 2018 году в США было зарегистрировано 140 250 новых случаев КРР и 50 630 случаев смерти от КРР. Пятилетняя относительная выживаемость в США составила 71% для пациентов с региональным заболеванием на момент постановки диагноза и только 14% для пациентов с отдаленным заболеванием на момент постановки диагноза (показатели скорректированы с учетом нормальной продолжительности жизни и основаны на случаях, диагностированных в 18 регионах SEER от 2008-2014 (SEER, 2018).

В настоящее время лечение метастатического КРР (мКРР) включает в себя различные лекарственные средства либо в комбинации, либо в виде отдельных лекарственных средств. На выбор терапии влияют тип и сроки предшествующей терапии, цели терапии, мутационный профиль опухоли и профиль токсичности входящих в ее состав лекарственных средств (NCCN 2018b). Рекомендуемые варианты начальной терапии при запущенном или метастатическом заболевании зависят от того, подходит ли пациенту интенсивная терапия. К более интенсивным вариантам начальной терапии

относятся FOLFOX, FOLFIRI, CapeOx и FOLFOXIRI. Добавление биологического агента (например, бевацизумаба, цетуксимаба, панитумумаба) также является вариантом в сочетании с некоторыми из этих схем. Варианты системной терапии для пациентов с прогрессирующим заболеванием (ПД) зависят от выбора начальной терапии.

В одном воплощении, где опухоль или злокачественная опухоль представляет собой KPP, субъект ранее получал до четырех системных курсов лечения запущенного/метастазирующего заболевания и имел прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, например, прогрессирование заболевания, определяемое рентгенографией.

В одном воплощении, где опухоль или злокачественное заболевание представляет собой KPP, причем субъект получал терапию на основе 5-фторурацила (ФУ).

В одном воплощении, где опухоль или злокачественное заболевание представляет собой CRC, причем субъект не получал лечения ингибитором контрольной точки иммунного ответа (ICP).

Опухоль или злокачественное заболевание может, в частности, представлять собой рак легкого. Рак легкого может представлять собой немелкоклеточный рак легких (НМРЛ), такой как плоскоклеточный или неплоскоклеточный НМРЛ. Рак легкого является наиболее распространенным злокачественным новообразованием и самой распространенной причиной смертности от злокачественных опухолей во всем мире. Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) составляет 85-90% всех случаев рака легкого (Jemal et al., 2011). Пятилетняя выживаемость при НМРЛ составляет приблизительно 18% (SEER, 2018). Основные гистологические подтипы НМРЛ включают аденокарциному, плоскоклеточный рак, аденосквамозный рак, крупноклеточный рак, карциноидные опухоли и другие менее распространенные подтипы, где аденокарцинома является наиболее распространенной.

Стандарт лечения пациентов с распространенным или метастатическим НМРЛ, у которых происходит прогрессирование при таргетной терапии или которые больше не являются кандидатами на таргетную терапию, обычно включает химиотерапию на основе платины. Комбинации платины обеспечили общую частоту ответа (ЧОО) примерно 25–35%, время до прогрессирования (ВДП) 4–6 месяцев и медиану выживаемости 8–10 месяцев.

В одном воплощении рак легкого представляет собой НМРЛ, такой как плоскоклеточный или неплоскоклеточный НМРЛ. В одном воплощении НМРЛ не имеет мутации, сенсibiliзирующей эпидермальный фактор роста (EGFR), и/или транслокации анапластической лимфомы (ALK)/перегруппировки онкогена 1 с-ROS (ROS1).



В одном воплощении, где опухоль или злокачественное заболевание представляет собой KPP, субъект ранее получал до четырех системных курсов лечения запущенного/метастазирующего заболевания и имел прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, например, прогрессирование заболевания, определяемое рентгенографией. Например, субъект получал химиотерапию на основе платины. Альтернативно, субъект не соответствует критериями терапии на основе платины и получил альтернативную химиотерапию, например, лечение по схеме, содержащей гемцитабин.

В одном воплощении, где опухоль или злокачественное заболевание представляет собой рак легкого, субъект ранее получал лечение ингибитором(ами) контрольной точки, таким(и) как агент(ы), нацеленный(ые) на PD-1/PD-L, таким как ингибитор PD-1/PD-L1.

В одном воплощении, где опухоль или злокачественное заболевание представляет собой рак легкого, у субъекта наблюдалось прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, например, прогрессирование заболевания, определяемое рентгенографией.

В одном воплощении первого аспекта связывающий агент, в частности, вводят указанному субъекту путем системного введения. Предпочтительно связывающий агент вводят указанному субъекту посредством внутривенной инъекции или инфузии.

В одном воплощении первого аспекта каждый цикл лечения составляет около двух недель (14 дней), трех недель (21 день) или четырех недель (28 дней), предпочтительно трех недель (21 день).

В конкретных воплощениях каждую дозу вводят или вливают каждую вторую неделю (1Q2W), каждую третью неделю (1Q3W) или каждую четвертую неделю (1Q4W), предпочтительно каждую третью неделю (1Q3W).

В некоторых воплощениях одну дозу или каждую дозу вводят или вливают в первый день каждого цикла лечения.

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

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к композиции, такой как фармацевтическая композиция, содержащая связывающий агент, содержащий первую область связывания, связывающуюся с CD40 человека, и вторую область связывания, связывающуюся с CD137 человека, где количество связывающего агента в композиции составляет около 3-200 мг (например, около 5-100 мг, около 10-60 мг или около 20-30 мг; или около 50-150 мг, около 75-125 мг, около 80-120 мг или около 90-110 мг; или около 100

мг) или около  $20 \times 10^{-9}$  -  $1350 \times 10^{-9}$  моль (например, около  $30 \times 10^{-9}$  -  $670 \times 10^{-9}$  моль, около  $60 \times 10^{-9}$  -  $410 \times 10^{-9}$  моль, или около  $135 \times 10^{-9}$  -  $205 \times 10^{-9}$  моль, или около  $330 \times 10^{-9}$  -  $1020 \times 10^{-9}$  моль, около  $500 \times 10^{-9}$  -  $840 \times 10^{-9}$  моль, около  $540 \times 10^{-9}$  -  $810 \times 10^{-9}$  моль, или около  $600 \times 10^{-9}$  -  $745 \times 10^{-9}$  моль, или около  $675 \times 10^{-9}$  моль).

Количество связывающего агента, вводимого в указанную композицию, может, в частности, составлять около 0,04-2,5 мг/кг массы тела (например, около 0,06-1,25 мг/кг массы тела, около 0,12-0,75 мг/кг массы тела или около 0,25-0,38 мг/кг массы тела; или около 0,62-1,88 мг/кг массы тела, около 0,93-1,56 мг/кг массы тела, около 1,0-1,5 мг/кг массы тела или около 1,12-1,38 мг/кг массы тела; или около 1,25 мг/кг массы тела) или около 3-200 мг (например, около 5-100 мг, около 10-60 мг или около 20-30 мг; или около 50-150 мг, около 75-125 мг, около 80 -120 мг, или около 90-110 мг или около 100 мг) в общей сложности; и/или около  $0,25 \times 10^{-9}$ - $16,9 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела (например, около  $0,40 \times 10^{-9}$ - $8,4 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела, около  $0,81 \times 10^{-9}$ - $5,1 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела, или около  $1,69 \times 10^{-9}$  -  $2,56 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела, или около  $4,18 \times 10^{-9}$  -  $12,7 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела, около  $6,28 \times 10^{-9}$  -  $10,5 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела, около  $6,75 \times 10^{-9}$  -  $10,1 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела или около  $7,56 \times 10^{-9}$  -  $9,31 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела или около  $8,44 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела) или около  $20 \times 10^{-9}$ - $1350 \times 10^{-9}$  моль (например, около  $30 \times 10^{-9}$ - $670 \times 10^{-9}$  моль, около  $60 \times 10^{-9}$  -  $410 \times 10^{-9}$  моль, или около  $135 \times 10^{-9}$  -  $205 \times 10^{-9}$  моль, или около  $330 \times 10^{-9}$  -  $1020 \times 10^{-9}$  моль, около  $500 \times 10^{-9}$  -  $840 \times 10^{-9}$  моль, около  $540 \times 10^{-9}$  -  $810 \times 10^{-9}$  моль, или около  $600 \times 10^{-9}$  -  $745 \times 10^{-9}$  моль, или около  $675 \times 10^{-9}$  моль) в общей сложности.

Воплощения, описанные выше для первого аспекта, также применимы ко второму аспекту. Таким образом, например, связывающий агент, содержащийся в композиции второго аспекта, может представлять собой любой связывающий агент, определенный для первого аспекта.

Композиция или фармацевтическая композиция может быть составлена с носителем, эксципиентом и/или разбавителем, а также с любыми другими компонентами, подходящими для фармацевтических композиций, включая известные адьюванты, в соответствии с обычными методами, такими как те, которые раскрыты в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Фармацевтически приемлемые носители или разбавители, а также любые известные адьюванты и эксципиенты должны подходить для связывающего агента настоящего изобретения и выбранного способа введения. Пригодность для носителей и других компонентов фармацевтических композиций определяют на основании отсутствия значительного негативного воздействия на искомые биологические свойства выбранного соединения или фармацевтической композиции второго аспекта (например, менее

существенного воздействия [10% или менее относительного ингибирования, 5% или менее относительного ингибирования и т.д.] при связывании антигена).

Композиция второго аспекта, в частности фармацевтическая композиция второго аспекта, может включать разбавители, наполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионогенный детергент, такой как Твин-20 или Твин-80), стабилизаторы (например, сахара или безбелковые аминокислоты), консерванты, солюбилизаторы и/или другие материалы, подходящие для включения в фармацевтическую композицию.

Фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или разбавители для терапевтического применения хорошо известны в фармацевтике и описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R Gennaro edit. 1985).

Фармацевтические носители, эксципиенты или разбавители могут быть выбраны с учетом предполагаемого пути введения и стандартной фармацевтической практики.

Фармацевтически приемлемые носители включают любые и все подходящие растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и фунгицидные агенты, агенты изотоничности, антиоксиданты и агенты, замедляющие всасывание, и т.п., которые физиологически совместимы с активным соединением, в частности, со связующим агентом, используемым в настоящей заявке.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в (фармацевтических) композициях по второму аспекту, включают воду, физиологический раствор, фосфатно-солевой буферный раствор, этанол, декстрозу, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и подобные) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, кукурузное масло, арахисовое масло, хлопковое масло и кунжутное масло, коллоидные растворы карбоксиметилцеллюлозы, трагакантовая камедь и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат, и/или различные буферы. Другие носители хорошо известны в фармацевтике.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъеклируемых растворов или дисперсий для немедленного приема. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области. За исключением тех случаев, когда какие-либо традиционные среды или агенты несовместимы с активным соединением, предполагается их использование в (фармацевтических) композициях второго аспекта.

Термин «эксципиент», используемый в данной заявке, относится к веществу, которое может присутствовать в (фармацевтической) композиции по настоящему изобретению, но не является активным ингредиентом. Примеры эксципиентов включают,

без ограничения указанным, носители, связующие, разбавители, смазывающие вещества, загустители, поверхностно-активные агенты, консерванты, стабилизаторы, эмульгаторы, буферы, ароматизаторы или красители.

Термин «разбавитель» относится к разбавляющему и/или разжижающему агенту. Более того, термин «разбавитель» включает любую одну или несколько из жидкости, жидкой или твердой суспензии и/или смешивающей среды. Примеры подходящих разбавителей включают этанол, глицерин и воду.

(Фармацевтическая) композиция второго аспекта может также содержать фармацевтически приемлемые антиоксиданты, например, (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и тому подобное; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) агенты, хелатирующие металлы, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

(Фармацевтическая) композиция второго аспекта может также содержать в композиции агенты изотоничности, такие как сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, глицерин или хлорид натрия.

(Фармацевтическая) композиция второго аспекта может также содержать один или несколько адъювантов, подходящих для выбранного пути введения, таких как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы, диспергирующие агенты, консерванты или буферы, которые могут увеличить срок хранения или эффективность композиции. Комбинация связывающих агентов, используемая в данной заявке, может быть приготовлена с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, например, в составах с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Такие носители могут включать желатин, моностеарат глицерина, дистеарат глицерина, биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, сложные полиортоэфирные и полимолочную кислоту отдельно или с воском, или другие материалы, хорошо известные в данной области. Способы приготовления таких составов обычно известны специалистам в данной области, см., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

«Фармацевтически приемлемые соли» включают, например, соли присоединения

кислот, которые могут быть образованы, например, с использованием фармацевтически приемлемой кислоты, такой как соляная кислота, серная кислота, фумаровая кислота, малеиновая кислота, янтарная кислота, уксусная кислота, бензойная кислота, лимонная кислота, винная кислота, угольная кислота или фосфорная кислота. Кроме того, подходящие фармацевтически приемлемые соли могут включать соли щелочных металлов (например, соли натрия или калия); соли щелочноземельных металлов (например, соли кальция или магния); аммоний ( $\text{NH}_4^+$ ); и соли, образованные с подходящими органическими лигандами (например, катионами четвертичного аммония и амина, образованными с использованием противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, алкилсульфонат и арилсульфонат). Иллюстративные примеры фармацевтически приемлемых солей включают, без ограничения указанным, ацетат, адипат, альгинат, аргинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бикарбонат, бисульфат, битартрат, борат, бромид, бутират, эдетат кальция, камфорат, камфорсульфонат, камзилат, карбонат, хлорид, цитрат, клавуланат, циклопентанпропионат, диглюконат, дигидрохлорид, додецилсульфат, эдетат, эдизилат, эстолат, езилат, этансульфонат, формиат, фумарат, галактат, галактуронат, глюцептат, глюкогептонат, глюконат, глутамат, глицерофосфат, гликолиларсанилат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гексилрезорцинат, гидрабамин, гидробромид, гидрохлорид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, гидроксинафтоат, йодид, изобутират, изотионат, лактат, лактобионат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, манделат, мезилат, метансульфонат, метилсульфат, мукат, 2-нафталинсульфонат, напсилат, никотинат, нитрат, N-аммонийная соль метилглюкамина, олеат, оксалат, памоат (эмбонат), пальмитат, пантотенат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат/дифосфат, фталат, пикрат, пивалат, полигалактуронат, пропионат, салицилат, стеарат, сульфат, суберат, сукцинат, таннат, тартрат, теоклат, тозилат, триэтиодид, ундеканоат, валерат и т.п. (см., например, S.M. Berge et al., «Pharmaceutical Salts», J. Pharm. Sci., 66, pp. 1-19 (1977)). Соли, которые не являются фармацевтически приемлемыми, могут быть использованы для получения фармацевтически приемлемых солей и включены в настоящее раскрытие.

В одном воплощении используемый в данной заявке связывающий агент может быть составлен таким образом, чтобы обеспечить правильное распределение *in vivo*. Фармацевтически приемлемые носители для парентерального введения включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций для немедленного приема. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в

данной области. За исключением тех случаев, когда какие-либо традиционные среды или агенты несовместимы с активным соединением, предполагается их использование в композициях второго аспекта. В композиции также могут быть включены другие активные или терапевтические соединения.

Фармацевтические композиции для инъекций обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть приготовлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой водный или неводный растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло и сложные органические эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Соответствующая текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как глицерин, маннит, сорбит или хлорид натрия. Пролонгированное всасывание композиций для инъекций может быть достигнуто путем включения в композицию агента, замедляющего абсорбцию, например, солей моностеарата и желатина. Стерильные инъекционные растворы могут быть приготовлены путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель вместе с одним или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией микрофильтрацией. Как правило, дисперсии готовят путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсную среду и другие требуемые ингредиенты из тех, что перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов, примерами способов приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента вместе с любым дополнительным требуемым ингредиентом из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Стерильные растворы для инъекций можно приготовить путем включения активных соединений в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, в зависимости от необходимости, с последующей стерилизующей микрофильтрацией. В общем, дисперсии готовят путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит

основную дисперсную среду и другие требуемые ингредиенты из тех, что перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций примерами способов приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный искомый ингредиент из их ранее стерильно отфильтрованного раствора.

В третьем аспекте настоящее изобретение предлагает композиция второго аспекта для применения в способе уменьшения или предотвращения прогрессирувания опухоли или лечения злокачественной опухоли у субъекта. Воплощения, описанные выше для первого и второго аспекта, также применимы к третьему аспекту. Например, связывающий агент, содержащийся в композиции третьего аспекта, может представлять собой любой связывающий агент, определенный в первом аспекте. Кроме того, композиция, используемая в третьем аспекте, может представлять собой любую композицию, определенную во втором аспекте. Кроме того, субъект, злокачественное заболевание или опухоль, упомянутые в третьем аспекте, могут быть любым субъектом, злокачественным заболеванием или опухолью, определенными в первом аспекте.

В четвертом аспекте в настоящем изобретении предлагается способ уменьшения или предотвращения прогрессирувания опухоли или лечения злокачественного заболевания у субъекта, где указанный способ включает введение указанному субъекту связывающего агента в подходящем количестве, при этом связывающий агент содержит первую область связывания с CD40 человека, например, CD40 человека, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, и вторую область связывания, связывающуюся с CD137 человека, например, CD137 человека, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38. Воплощения, описанные выше для первого аспекта, также применимы к четвертому аспекту. Таким образом, например, связывающий агент, используемый в четвертом аспекте, может представлять собой любой связывающий агент, определенный в первом аспекте. Кроме того, субъект, злокачественное заболевание или опухоль, упомянутые в третьем аспекте, могут быть любым субъектом, злокачественным заболеванием или опухолью, определенными в первом аспекте.

В пятом аспекте настоящее изобретение предлагает способ уменьшения или предотвращения прогрессирувания опухоли или лечения рака у субъекта, где указанный способ включает введение указанному субъекту композиции, содержащей связывающий агент в количестве от около 3 до 200 мг (например, около 5-100 мг, около 10-60 мг или около 20-30 мг; или около 50-150 мг, около 75-125 мг, около 80-120 мг или около 90-110

мг; или около 100 мг) или около  $20 \times 10^{-9}$ - $1350 \times 10^{-9}$  моль (например, около  $0,40 \times 10^{-9}$ - $8,4 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела, около  $0,81 \times 10^{-9}$ - $5,1 \times 10^{-9}$  моль/кг масса тела, или около  $1,69 \times 10^{-9}$  - -  $2,56 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела, или около  $4,18 \times 10^{-9}$  -  $12,7 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела, около  $6,28 \times 10^{-9}$  -  $10,5 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела, около  $6,75 \times 10^{-9}$  -  $10,1 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела, или около  $7,56 \times 10^{-9}$  -  $9,31 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела, или около  $8,44 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела) или около  $20 \times 10^{-9}$  -  $1350 \times 10^{-9}$  моль (например, около  $30 \times 10^{-9}$  -  $670 \times 10^{-9}$  моль, около  $60 \times 10^{-9}$  -  $410 \times 10^{-9}$  моль или около  $135 \times 10^{-9}$  -  $205 \times 10^{-9}$  моль; или около  $330 \times 10^{-9}$  -  $1020 \times 10^{-9}$  моль, около  $500 \times 10^{-9}$  -  $840 \times 10^{-9}$  моль, около  $540 \times 10^{-9}$  -  $810 \times 10^{-9}$  моль или около  $600 \times 10^{-9}$  -  $745 \times 10^{-9}$  моль или около  $675 \times 10^{-9}$  моль), где связывающий агент содержит первую область связывания, связывающуюся с CD40 человека, например, CD40 человека, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, и вторая область связывания, связывающаяся с CD137 человека, например, CD137 человека, содержащая последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38. Воплощения, описанные выше для первого и второго аспекта, также применимы к четвертому аспекту. Например, связывающий агент, содержащийся в композиции пятого аспекта, может представлять собой любой связывающий агент, определенный в первом аспекте. Кроме того, композиция, используемая в пятом аспекте, может представлять собой любую композицию, определенную во втором аспекте. Кроме того, субъект, злокачественное заболевание или опухоль, упомянутые в третьем аспекте, могут быть любым субъектом, злокачественным заболеванием или опухолью, определенными в первом аспекте.

Цитирование документов и исследований, упомянутых в данной заявке, не означает признание того, что любое из вышеизложенного относится к предшествующему уровню техники. Все утверждения относительно содержания этих документов основаны на информации, доступной заявителям, и не являются признанием в отношении правильности содержания этих документов.

Описание (включая следующие примеры) представлено для того, чтобы позволить специалисту в данной области техники создавать и использовать различные воплощения. Описание конкретных устройств, методов и приложений приводится только в качестве примеров. Различные модификации описанных в данной заявке примеров будут очевидны для специалистов в данной области техники, и общие принципы, определенные в данной заявке, могут быть применены к другим примерам и приложениям, не выходя за рамки сущности и объема различных воплощений. Таким образом, различные воплощения не предназначены для ограничения описанными и показанными примерами, но должны соответствовать объему, соответствующему формуле изобретения.

Дополнительные элементы настоящего изобретения включают:



1. Связывающий агент для применения в способе уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли или лечения злокачественного заболевания у субъекта, где указанный способ включает введение указанному субъекту связывающего агента в подходящем количестве, при этом связывающий агент содержит первую область связывания, связывающуюся с CD40 человека, например, CD40 человека, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, и вторую область связывания, связывающуюся с CD137 человека, например, CD137 человека, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38.

2. Связывающий агент для применения по пункту 1, где подходящее количество связывающего агента представляет собой терапевтически эффективное и безопасное количество.

3. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где подходящее количество связывающего агента составляет около 0,04-2,5 мг/кг массы тела или около 3-200 мг в общей сложности; и/или около  $0,25 \times 10^{-9}$  –  $16,9 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела или около  $20 \times 10^{-9}$  –  $1350 \times 10^{-9}$  моль в общей сложности.

4. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где связывающий агент вводят системно, предпочтительно внутривенно.

5. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где

а) первая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 7 или 9, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 8 или 10;

и

б) вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 17 или 19, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 18 или 20.

6. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где

а) первая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно;

и

b) первая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 11, 12 и 13, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно.

7. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где

a) первая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7 или 9 и переменную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8 или 10;

b) вторая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 17 или 19, и переменную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 18 или 20.

8. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где

a) первая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7 или 9, и переменную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8 или 10;

и

b) вторая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17 или 19, и переменную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18 или 20.

9. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где

a) первая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10;

и

b) вторая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, и переменную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20.

10. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где связывающий агент представляет собой мультиспецифическое антитело, такое как биспецифическое антитело.

11. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где связывающий агент имеет форму полноразмерного антитела или фрагмента антитела.

12. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 5-11, где каждая переменная область содержит три области, определяющие комплементарность (CDR1, CDR2 и CDR3) и четыре каркасных области (FR1, FR2, FR3 и FR4).

13. Связывающий агент для применения по п. 12, отличающийся тем, что указанные области, определяющие комплементарность, и указанные каркасные области расположены от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

14. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 5-13, который содержит

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

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

15. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 5-14, который содержит

i) полипептид, включающий указанную первую переменную область легкой цепи (VL) и дополнительно включающий первую константную область легкой цепи (CL), и

ii) полипептид, включающий указанную вторую переменную область легкой цепи (VL) и дополнительно включающий вторую константную область легкой цепи (CL).

16. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 5-15, где связывающий агент представляет собой антитело, содержащее первое связывающее плечо и второе связывающее плечо, где

первое связывающее плечо содержит

i) полипептид, включающий указанную первую переменную область тяжелой цепи (VH) и первую константную область тяжелой цепи (CH), и

ii) полипептид, включающий указанную первую переменную область легкой цепи (VL) и первую константную область легкой цепи (CL);

и второе связывающее плечо содержит

iii) полипептид, включающий указанную вторую переменную область тяжелой цепи (VH) и вторую константную область тяжелой цепи (CH), и

iv) полипептид, включающий указанную вторую переменную область легкой цепи (VL) и вторую константную область легкой цепи (CL).

17. Связывающий агент для применения любого из предшествующих пунктов, который включает

i) первую тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную связываться с CD40, и

ii) вторую тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную связываться CD137.

18. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где указанный связывающий агент содержит

i) первую тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную связываться с CD40, где первая тяжелая цепь содержит первую константную область тяжелой цепи, а первая легкая цепь содержит первую константную область легкой цепи; и

ii) вторую тяжелую цепь и легкую цепь, содержащую указанную антигенсвязывающую область, способную связываться CD137, вторую тяжелую цепь, содержащую вторую константную область тяжелой цепи, и вторую легкую цепь, содержащую вторую константную область легкой цепи.

19. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 14-18, где каждая из первой и второй константных областей тяжелой цепи (CH) содержит одну или несколько константных областей тяжелой цепи 1 (CH1), шарнирную область, константную область тяжелой цепи область цепи 2 (CH2) и константная область тяжелой цепи 3 (CH3), предпочтительно, по меньшей мере, шарнирную область, область CH2 и область CH3.

20. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 14-19, где каждая

из первой и второй константных областей тяжелой цепи (СН) содержит участок СН3 и при этом два участка СН3 содержат асимметричные мутации.

21. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 14-20, где в указанной первой константной области тяжелой цепи (СН) по меньшей мере одна из аминокислот находится в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из Т366, L368, К370, D399, F405, Y407 и К409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU была заменена, и в указанной второй константной области тяжелой цепи (СН) по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из Т366, L368, К370, D399, F405, Y407 и К409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU была заменена, и при этом указанные первая и указанная вторая тяжелые цепи не заменены в одних и тех же положениях.

22. Связывающий агент по пункту 32, где (i) аминокислота в положении, соответствующем F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляет собой L в указанной первой константной области тяжелой цепи (СН), и аминокислота в положении, соответствующем К409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU, представляет собой R в указанной второй константной области тяжелой цепи (СН) или (ii) аминокислота в положении, соответствующем К409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляет собой R в указанной первой тяжелой цепи, а аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU, представляет собой L в указанной второй тяжелой цепи.

23. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где указанный связывающий агент индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с другим антителом, содержащим те же самые первую и вторую антигенсвязывающие области и две константные области тяжелой цепи (СН), содержащие области шарнира, СН2 и СН3 IgG1 человека.

24. Связывающий агент для применения по пункту 23, где указанные первая и вторая константные области тяжелой цепи (СН) модифицированы так, что антитело индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с антителом, которое идентично, за исключением того, что оно содержит немодифицированные первую и вторую константные области тяжелой цепи (СН).

25. Связывающий агент для применения по пункту 24, где каждая из указанных немодифицированных первой и второй константных областей (СН) тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21 или 29.

26. Связывающий агент для применения по пункту 24 или 25, где указанную Fc-

опосредованную эффекторную функцию измеряют путем связывания с Fc $\gamma$ -рецепторами, связывания с C1q или индукции Fe-опосредованного перекрестного сшивания Fc $\gamma$ -рецепторов.

27. Связывающий агент для применения по пункту 26, где указанную Fc-опосредованную эффекторную функцию измеряют путем связывания с C1q.

28. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 23-27, где указанные первая и вторая константные области тяжелой цепи были модифицированы таким образом, что связывание C1q с указанным антителом снижено по сравнению с антителом дикого типа, предпочтительно снижено по меньшей мере на 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или 100%, где связывание C1q предпочтительно определяют с помощью ELISA.

29. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 14-28, где по меньшей мере в одной из указанных первой и второй константных областей тяжелой цепи (CH) одна или несколько аминокислот находятся в положениях, соответствующих положениям L234, L235, D265, N297 и P331 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU не являются L, L, D, N и P, соответственно.

30. Связывающий агент для применения по пункту 29, где положения, соответствующие положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU, представляют собой F и E, соответственно в указанных первой и второй тяжелых цепях.

31. Связывающий агент для применения по п. 29 или 30, где положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU, представляют собой F, E и A, соответственно, в указанной первой и второй константных областях тяжелой цепи (CH).

32. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 29-31, где положения, соответствующие положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU как первой, так и второй константных областей тяжелой цепи, представляют собой F и E, соответственно, и где (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU первой константной области тяжелой цепи, представляет собой L, а положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU второй тяжелой цепи представляет собой R, или (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU первой константной области тяжелой цепи, представляет собой R, и положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU второй тяжелой цепи представляет собой L.

33. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 29-32, где положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU как первой, так и второй константных областей тяжелой цепи, представляют собой F, E, и A, соответственно, и где (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU первой константной области тяжелой цепи, представляет собой L, и положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно ЕС-нумерация второй константной области тяжелой цепи представляет собой R, или (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU первой тяжелой цепи, представляет собой R, и положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека цепь согласно нумерации EU второй тяжелой цепи представляет собой L.

34. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 14-33, где константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

- a) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21 или 29 [IgG1-FC];
- b) подпоследовательности последовательности из a), такой как подпоследовательность, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в a); и
- c) последовательности, имеющей по большей мере 10 замен, например, по большей мере 9 замен, по большей мере 8, по большей мере 7, по большей мере 6, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в a) или b).

35. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 14-33, где константная область указанной первой или второй тяжелой цепи, такая как вторая тяжелая цепь, содержит или состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

- a) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22 или 30 [IgG1-F405L];
- b) подпоследовательности последовательности из a), такой как подпоследовательность, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в a); и
- c) последовательности, имеющей по большей мере 9 замен, например, по большей

мере 8, по большей мере 7, по большей мере 6, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

36. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 14-33, где константная область указанной первой или второй тяжелой цепи, такая как первая тяжелая цепь, содержит или состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23 или 31 [IgG1-F409R];

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

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

37. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 14-33, где константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24 или 32 [IgG1-Fc\_FEA];

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

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

38. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 14-37, где константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи, например, второй тяжелой цепи, содержит или состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 25 или 33 [IgG1-Fc\_FEAL];



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

с) последовательности, имеющей по большей мере 6 замен, например, по большей мере 5 замен, по большей мере 4 замен, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или b).

39. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 14-38, где константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи, такая как первая тяжелая цепь, содержит или состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности, указанной в SEQ ID NO: 26 или 34 [IgG1-Fc\_FEAR];

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

с) последовательности, имеющей по большей мере 6 замен, например, по большей мере 5 замен, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или b).

40. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где указанный связывающий агент содержит константную область легкой цепи каппа ( $\kappa$ ).

41. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где указанный связывающий агент содержит константную область легкой цепи лямбда ( $\lambda$ ).

42. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где указанная первая константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа ( $\kappa$ ) или константную область легкой цепи лямбда ( $\lambda$ ).

43. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где указанная вторая константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи лямбда ( $\lambda$ ) или константную область легкой цепи каппа ( $\kappa$ ).

44. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где указанная первая константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа ( $\kappa$ ), а указанная вторая константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи лямбда ( $\lambda$ ) или указанную первую

константную область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи лямбда ( $\lambda$ ), а указанная вторая константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа ( $\kappa$ ).

45. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 40-44, отличающийся тем, что легкая цепь каппа ( $\kappa$ ) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 27,

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

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

46. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 41-45, где легкая цепь лямбда ( $\lambda$ ) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 28,

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

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

47. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где связывающий агент имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

48. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где связывающий агент представляет собой полноразмерное антитело IgG1.

49. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов,

где связывающий агент представляет собой антитело аллотипа IgG1m(f).

50. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где субъектом является человек.

51. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где опухоль или злокачественное заболевание представляет собой солидную опухоль.

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

53. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где опухоль или злокачественную опухоль выбирают из группы, состоящей из рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ)), меланомы, колоректального рака, уротелиального рака (рака мочевого пузыря, мочеточника, уретры или почечной лоханки), рака эндометрия (ЕС), рака молочной железы (например, трижды негативного рака молочной железы (TNBC)), плоскоклеточного рака головы и шеи (SCCHN) (например, рака полости рта, глотки или гортани) и рака шейки матки.

54. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где опухоль или рак выбирают из группы, состоящей из рака легкого, меланомы и колоректального рака.

55. Связывающий агент для применения по пункту 54, где злокачественное заболевание представляет собой немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), такой как плоскоклеточный или неплоскоклеточный НМРЛ.

56. Связывающий агент для применения по пункту 55, где НМРЛ не имеет мутации, сенсibiliзирующей эпидермальный фактор роста (EGFR), и/или транслокации/перестройки ROS1 в анапластической лимфоме (ALK).

57. Связывающий агент для применения по пункту 55 или 56, где субъект ранее получал до четырех схем системного лечения запущенного/метастазирующего заболевания и у него наблюдалось прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, например, прогрессирование

заболевания, определяемое рентгенографией.

58. Связывающий агент для применения по пункту 57, где субъект получал химиотерапию на основе платины.

59. Связывающий агент для применения по пункту 57, где субъект не имеет права на терапию на основе платины и имеет альтернативную химиотерапию, например, лечение по схеме, содержащей гемцитабин.

60. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 55-59, где субъект ранее получал лечение ингибитором(ами) контрольной точки, таким как агент(ы), нацеленный(ые) на PD-1/PD-L, например, ингибитором PD-1/PD-L1.

61. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 55-60, где у субъекта наблюдалось прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, например, прогрессирование заболевания, определенное с помощью рентгенографии.

62. Связывающий агент для применения по пункту 54, где злокачественное заболевание представляет собой меланому кожи, акральной области или слизистых оболочек.

63. Связывающий агент для применения по пункту 62, где субъект ранее получал до четырех системных курсов лечения распространенного/метастазирующего заболевания и у него наблюдалось прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, например, прогрессирование заболевания, определенное с помощью рентгенографии.

64. Связывающий агент для применения по пункту 62 или 63, где субъект ранее получал лечение ингибитором(ами) контрольной точки, таким как агент(ы), нацеленный(ые) на PD-1/PD-L, например, ингибитором PD-1/PD-L1.

65. Связывающий агент для применения по пункту 54, где злокачественное заболевание представляет собой рак прямой кишки.

66. Связывающий агент для применения по пункту 65, где субъект ранее получал до четырех системных курсов лечения прогрессирующего/метастазирующего заболевания и у него наблюдалось прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, например, прогрессирование заболевания, определяемое рентгенографией.

67. Связывающий агент для применения по пункту 65 или 66, где субъект прошел терапию на основе 5-ФУ.

68. Связывающий агент для применения по любому из пунктов 65-67, где субъект не получал лечения ингибитором ICP.

69. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где связывающий агент вводят по меньшей мере в одном цикле лечения, где каждый цикл лечения составляет три недели (21 день).

70. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где одну дозу вводят каждую третью неделю (1Q3W).

71. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пунктов, где одну дозу вводят в первый день каждого цикла лечения.

72. Связующее средство для применения по любому из предшествующих пунктов, где каждая доза вливается в течение минимум 30 минут, например, в течение минимум 60 минут, минимум 90 минут, минимум 120 минут или минимум 240 минут.

73. Композиция, содержащая связывающий агент, включающий первую область связывания, связывающуюся с CD40 человека, и вторую область связывания, связывающуюся с CD137 человека, где количество связывающего агента в композиции составляет около 3-200 мг или около  $20 \times 10^{-9}$ - $1350 \times 10^{-9}$  моль.

74. Композиция по п. 73, содержащая около 40 мг указанного связывающего агента.

75. Композиция по пункту 73 или 74, где связывающий агент такой, как определено в любом из пунктов 1-72.

76. Композиция по любому из пунктов 73-75, где композиция предназначена для системного введения.

77. Композиция по любому из пунктов 73-76, где композиция предназначена для инъекции или инфузии, такой как внутривенная инъекция или инфузия.

78. Композиция по любому из пунктов 73-77, где связывающий агент находится в водном растворе, например, в 0,9% NaCl (физраствор), в объеме 50-500 мл, например, 100-250 мл.

79. Композиция по любому из пунктов 73-78, где указанная композиция представляет собой единичную дозированную форму.

80. Композиция по любому из пунктов 73-79 для применения в способе уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли или лечения злокачественного заболевания у субъекта.

Дополнительные аспекты настоящего изобретения раскрыты в данной заявке.

Примеры

Пример 1. Получение биспецифических антител

Биспецифическое анти-CD40 анти-4-1BB (далее называемое GEN1042 или DuoBody-CD40x4-1BB) было получено с использованием гуманизированных

последовательностей VH и VL, легкой каппа-цепи человека и тяжелой цепи IgG1 человека, описанных в таблице 1. Связывающее CD40 плечо было получено с использованием тяжелой цепи IgG1 человека, содержащей следующие аминокислотные мутации: L234F, L235E, D265A и F405L (FEAL), где номер положения аминокислот соответствует нумерации EU (соответствует SEQ ID NO: 33). Связывающее CD137 плечо было получено с использованием тяжелой цепи IgG1 человека, содержащей следующие аминокислотные мутации: L234F, L235E, D265A и K409R (FEAR), где номер положения аминокислот соответствует нумерации EU (соответствует SEQ ID NO: 34).

Биспецифические антитела IgG1 получали заменой Fab-плеча в контролируемых восстанавливающих условиях. В основе этого способа лежит использование комплементарных доменов СН3, которые способствуют образованию гетеродимеров в определенных условиях анализа, как описано в WO2011/131746. Мутации F405L и K409R (ЕС нумерация) были введены в соответствующие антитела для создания пар антител с комплементарными доменами СН3.

Для создания биспецифических антител два родительских комплементарных антитела, каждое антитело в конечной концентрации 0,5 мг/мл, инкубировали с 75 мМ 2-меркаптоэтиламин-НСI (2-МЕА) в 5,5 общего объема 100 мкл ФСБ при 31°C в течение 5 часов. Реакцию восстановления останавливали удалением восстановителя 2-МЕА с помощью спин-колонок (центрифужные фильтры Microcon, 30k, Millipore) согласно протоколу производителя.

Пример 2. Дизайн клинического исследования и предварительные данные

Дизайн исследования

Клиническое исследование GCT1042-01 (идентификатор ClinicalTrials.gov: NCT04083599) было спроектировано как исследование, состоящее из двух частей, включая часть с повышением дозы и часть с запланированным расширением. Исследование было разработано как открытое многоцентровое исследование безопасности фазы I/IIa GEN1042 ((DuoBody-CD40x4-1BB)). Исследование состоит из 2 частей; повышение дозы впервые на людях (First-in-Human, FIH) (Фаза I) и расширение (Фаза IIa).

Повышение дозы

При повышении дозы оценивается GEN1042 у субъектов с солидными злокачественными опухолями за пределами центральной нервной системы (ЦНС) для определения максимально переносимой дозы (MTD) или максимальной вводимой дозы (MAD) и/или рекомендуемой дозы фазы 2 (RP2D). При повышении и/или расширении дозы субъекты получают одну инфузию GEN1042 каждые 3 недели (q3w) в течение 21-

дневных циклов до тех пор, пока не будут выполнены определенные протоколом критерии прекращения (рентгенологическое прогрессирование заболевания или клиническое прогрессирование, смерть, неприемлемые нежелательные явления (НЯ), решение исследователя в интересах пациента, отзыв согласия, беременность). Повышение дозы оценивает внутривенное введение GEN1042 на 10 уровнях дозы: 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10, 30, 100, 200, 400 и одном промежуточном уровне дозы при фиксированной дозе 60 мг. Для фиксированных доз 0,1, 0,3, 1,0 мг. На фиг. 2 схематически показано повышение дозы. В таблице ниже указаны начальные дозы, вводимые отдельным субъектам:

Таблица 5. Первая доза по типу злокачественного заболевания и номеру субъекта

Номер субъекта	Дата первого воздействия GEN1042	Уровень дозы GEN1042	Тип злокачественного заболевания
1001	17Сен2019	0,1 мг	Другое злокачественное заболевание: прогрессирующий рак ободочной кишки
1002	14Ноя2019	0,3 мг	Колоректальный рак
1003	16Дек2019	1,0 мг	НМРЛ
1004	18Дек2019	1,0 мг	Другое злокачественное заболевание: Метастатический рак поджелудочной железы
1005	20Янв2020	3,0 мг	Колоректальный рак
1006	17Фев2020	10 мг	Другое злокачественное заболевание: Аденоидно-кистозная карцинома верхней челюсти
1007	19Фев2020	10 мг	Другое злокачественное заболевание: холангиокарцинома
1008	04Мар2020	10 мг	меланома
1009	18Мар2020	3,0 мг	меланома
1010	09Апр2020	30 мг	Другое злокачественное заболевание: Метастатическая аденокарцинома яичника
1011	27Апр2020	30 мг	Колоректальный рак
1012	04Май2020	30 мг	Другое злокачественное заболевание: уротелиальная карцинома
1013	04Май2020	10 мг	Другое злокачественное заболевание: Нейроэндокринная карцинома
1014	15Май2020	10 мг	Меланома
1016	19Май2020	10 мг	Другое злокачественное заболевание: Нейроэндокринная карцинома
1017	08Июн2020	100 мг	Колоректальный рак
1018	09Июн2020	30 мг	Другое злокачественное заболевание: Плевральная мезотелиома
1019	16Июн2020	100 мг	Колоректальный рак
1020 <sup>a</sup>	22Июн2020	100 мг	
1021	29Июн2020	30 мг	НМРЛ
1022	01Июл2020	30 мг	Другое злокачественное заболевание: рак молочной железы
1023	27Июл2020	200 мг	Другое злокачественное заболевание: орофарингеальный
1024	29Июл2020	100 мг	Другое злокачественное заболевание: Метастатическая миксоидная липосаркома высокой степени злокачественности
1025	03Авг2020	100 мг	Меланома
1026	10Авг2020	200 мг	Колоректальный рак

Номер субъекта	Дата первого воздействия GEN1042	Уровень дозы GEN1042	Тип злокачественного заболевания
1027	19Авг2020	100 мг	Колоректальный рак
1028	19Авг2020	200 мг	Другое злокачественное заболевание: мезотелиома
1029	26Авг2020	3,0 мг	Другое злокачественное заболевание: рак коры надпочечников
1030	26Авг2020	3,0 мг	Колоректальный рак
1031	30Сен2020	200 мг	Меланома
1032	14Окт2020	200 мг	Меланома
1033	07Окт2020	200 мг	Другое злокачественное заболевание: Аденокарцинома шейки матки
1034	29Окт2020	30 мг	НМРЛ
1035	04Ноя2020	30 мг	Другое злокачественное заболевание: трижды негативный рак молочной железы
1036	12Ноя2020	30 мг	Другое злокачественное заболевание: Глиома высокой степени злокачественности; Злокачественная карциноидная опухоль легких
1037	01Дек2020	400 мг	Другое злокачественное заболевание: Аденоидно-кистозная карцинома
1038	03Дек2020	400 мг	НМРЛ
1603	15Дек2020	400 мг	Другое злокачественное заболевание: Первичное злокачественное новообразование гортаноглотки
1604	17Дек2020	60 мг	Другое злокачественное заболевание: ПКРГШ

#### Критерии включения

Для повышения дозы субъект должен быть мужчиной или женщиной в возрасте ~ 18 лет и иметь измеримое заболевание в соответствии с RECIST 1.1. Субъекты должны иметь гистологически или цитологически подтвержденную солидную опухоль, не принадлежащую ЦНС, которая является метастатической или неоперабельной и для которых не существует доступной стандартной терапии, которая могла бы принести клиническую пользу, или субъекты, которые не являются кандидатами на такое доступное лечение и для которых: по мнению исследователя, экспериментальная терапия GEN1042 могла бы принести пользу. Субъект должен иметь статус эффективности 0-1 Восточной кооперативной онкологической группы (ECOG). Субъект должен иметь приемлемые функции костного мозга, гематологические функции печени и почек.

#### Результаты

##### Продолжение исследования

По состоянию на дату извлечения данных 8 января 2021 г. предварительные данные для 39 субъектов, получавших GEN1042, показали, что 10 субъектов во всех 10 уровнях доз (от 0,1 мг до 400 мг) продолжали получать исследуемое лекарственное средство (таблица 6). Из 29 субъектов, прекративших лечение GEN1042, 15 субъектов прекратили экспериментальное лечение из-за документально подтвержденного рентгенологического прогрессирования заболевания, 6 субъектов прекратили из-за клинического прогрессирования, 2 субъекта прекратили по просьбе субъекта прекратить



экспериментальное лечение, 3 субъекта прекратили из-за нежелательного(ых) явления(ий) (АЕ). Три субъекта прекратили по другим причинам:

- Субъект 1001 (0,1 мг): Исследователь был обеспокоен тем, что субъект не получил терапевтического эффекта из-за низкой дозы; 2 оценки заболевания показали тенденцию к прогрессированию заболевания.

- Субъект 1006 (10 мг): Рассмотрение пользы/риска участия в исследовании во время пандемии COVID 19.

- Субъект 1014 (10 мг): Решение исследователя.

Трое из 15 субъектов, прекративших лечение из-за документированного рентгенологического прогрессирования заболевания, позже умерли во время периода последующего наблюдения.

Таблица 6. Прекращение лечения – все субъекты

	Дозы GEN1042								
	≤1 мг (N=4)	3.0 мг (N=4)	10 мг (N=6)	30 мг (N=9)	60 мг (N=1)	100 мг (N=6)	200 мг (N=6)	400 мг (N=3)	Всего (N=39)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Субъекты, подвергнутые лечению	0	1 (25,0)	1 (16,7)	1 (11,1)	1 (100)	1 (16,7)	2 (33,3)	3 (100)	10 (25,6)
Субъекты, прекратившие лечение	4 (100)	3 (75,0)	5 (83,3)	8 (88,9)	0	5 (83,3)	4 (66,7)	0	29 (74,4)
Документированное рентгенологическое прогрессирование заболевания	1 (25,0)	3 (75,0)	1 (16,7)	4 (44,4)		4 (66,7)	2 (33,3)		15 (38,5)
Клиническое прогрессирование	2 (50,0)		2 (33,3)	2 (22,2)					6 (15,4)
Субъекты, запросившие прекращение экспериментального лечения				1 (11,1)			1 (16,7)		2 (5,1)
Смерть									0
Плохое соблюдение/несоблюдение требований									0
Беременность									0
Нежелательные явления				1 (11,1)		1 (16,7)	1 (16,7)		3 (7,7)
Решение спонсора									0
Потерян для дальнейшего наблюдения									0
Другие	1 (25,0)	0	2 (33,3)	0					3 (7,7)

Субъекты, прекратившие лечение, продолжили участие в исследовании в период последующего наблюдения. По состоянию на дату окончания сбора данных 8 января 2021 г. 25 субъектов продолжали участие в исследовании (таблица 7). Из 14 субъектов, прекративших участие в исследовании GCT1042-01, 1 субъект отозвал согласие на участие в исследовании, 11 умерли, а 2 прекратили участие в исследовании по другим причинам:

- Субъект 1004 (1 мг): прогрессирующее заболевание.

- Субъект 1025 (100 мг): не подходит для 30-дневных постоянных последующих

визитов/звонков по вопросам безопасности из-за быстрого клинического прогрессирования.

Таблица 7. Прекращение участия в исследовании – все субъекты

	Дозы GEN1042								
	≤1 мг (N=4)	3.0 мг (N=4)	10 мг (N=6)	30 мг (N=9)	60 мг (N=1)	100 мг (N=6)	200 мг (N=6)	400 мг (N=3)	Всего (N=39)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Субъекты, участвующие в исследовании	0	4 (100)	5 (83,3)	3 (33,3)	1 (100)	5 (83,3)	4 (66,7)	3 (100)	25 (64,1)
Субъекты, больше не участвующие	4 (100)	0	1 (16,7)	6 (66,7)	0	1 (16,7)	2 (33,3)	0	14 (35,9)
Субъект отозвал согласие на участие в исследовании							1 (16,7)		1 (2,6)
Смерть	3 (75,0)		1 (16,7)	6 (66,7)			1 (16,7)		11 (28,2)
Решение спонсора									0
Потерян для дальнейшего наблюдения									0
Максимальная продолжительность исследования по протоколу составляет 3 года после проведения первой инфузии									0
Другие	1 (25,0)					1 (16,7)			2 (5,1)

#### Предварительная эффективность

По состоянию на дату окончания сбора данных 8 января 2021 г. предварительные данные об эффективности от 39 субъектов, которые исчерпали стандартную терапию, которая, как известно, приносит клиническую пользу, проходили лечение на стадии повышения дозы клинического исследования FIIH. Дозы GEN1042 в диапазоне от 0,1 до 400 мг вводились один раз каждые 3 недели (1Q3W). Из 39 субъектов, включенных в исследование, у одного субъекта был подтвержденный PR, и он продолжал участвовать в исследовании на момент прекращения сбора данных, а стабилизация заболевания была достигнута у 20 субъектов. Подтвержденный показатель объективного ответа составляет 1 (2,6%), а подтвержденный показатель контроля заболевания — 20 (51,3%) (таблица 8).

Таблица 8. Частота подтвержденного объективного ответа – сводная таблица – все субъекты

	Дозы GEN1042								
	≤1 мг N (%)	3.0 мг N (%)	10 мг N (%)	30 мг N (%)	60 мг N (%)	100 мг N (%)	200 мг N (%)	400 мг N (%)	Всего N (%)
N	4	4	6	9	1	6	6	3	39
Подтвержденный лучший общий ответ									
CR (Полный ответ)									0
PR (Частичный ответ)		1 (25,0)							1 (2,6)
SD (Стабильное заболевание)	3 (75,0)	2 (50,0)	5 (83,3)	4 (44,4)		2 (33,3)	3 (50,0)		19 (48,7)
PD (Прогрессирующее заболевание)	1 (25,0)	1 (25,0)	1 (16,7)	3 (33,3)		3 (50,0)	2 (33,3)		11 (28,2)

	Дозы GEN1042								Всего N (%)
	≤1 мг N (%)	3.0 мг N (%)	10 мг N (%)	30 мг N (%)	60 мг N (%)	100 мг N (%)	200 мг N (%)	400 мг N (%)	
NE (Не поддается оценке)						1 (16,7)	1 (16,7)		2 (5,1)
NA (Неприменимо)				2 (22,2)	1 (100)			3 (100)	6 (15,4)
Частота подтвержденного объективного ответа (CR+PR)		1 (25,0)							1 (2,6)
Подтвержденная частота контроля над заболеванием (CR+PR+SD)	3 (75,0)	3 (75,0)	5 (83,3)	4 (44,4)		2 (33,3)	3 (50,0)		20 (51,3)

Процентное изменение показателей опухоли с течением времени у 39 поддающихся оценке пациентов, включенных в фазу 1 повышения дозы исследования GCT1042-01, у которых была проведена хотя бы одна оценка поражения после исходного уровня, на фиг. 3. Хотя у субъекта 1022 (30 мг) - mTNBC наблюдалось снижение опухолевой нагрузки на -24,4% (SD) на 6 неделе, и ему была сделана новая операция с резекцией одного из TL до ответа на PR, поэтому наблюдаемое PR может не быть истинным PR.

#### Нежелательные явления

Нежелательные явления, возникшие во время лечения (TEAE), наблюдались у большинства субъектов. Наиболее распространенными TEAE (встречавшимися у ≥10% субъектов) были утомляемость, тошнота, снижение аппетита, повышение аспаратаминотрансферазы (АСТ), диарея, повышение аланинаминотрансферазы (АЛТ), лихорадка, анемия, артралгия, запор, головная боль, зуд, одышка, рвота, головокружение, приливы и инфекции мочевыводящих путей. Большинство TEAE были 1 или 2 степени.

Серьезные нежелательные явления (SAE) были зарегистрированы у 15 (38,5%) пациентов (таблица 9). Наиболее частым SAE (3 пациента, 7,7%) было повышение уровня АЛТ.

У трех субъектов наблюдались серьезные TEAE, которые считались связанными с GEN1042 (таблица 10):

- У одного субъекта (субъект 1024, группа с дозой 100 мг) наблюдалось повышение АЛТ 3-й степени, повышение аспаратаминотрансферазы (АСТ) 3-й степени, повышение билирубина в крови 1-й степени и нейтропения 4-й степени. Эти явления считались серьезными.

- У одного субъекта (Субъект 1023, группа с дозой 200 мг) наблюдалось повышение аланинаминотрансферазы (АЛТ) 4-й степени / повышение АСТ 4-й степени. Эти явления считались серьезными. Увеличение 4-й степени АЛТ/аспаратаминотрансферазы (АСТ) соответствовало критериям DLT.

• У одного субъекта (субъект 1033, группа с дозой 200 мг) наблюдалось повышение аланинаминотрансферазы (АЛТ) 3-й степени и пирексия 1-й степени. Эти явления считались серьезными.

Классификация была произведена в соответствии с Общими терминологическими критериями нежелательных явлений Национального института рака (СТСАЕ) версии 5.0.

У трех вышеуказанных субъектов наблюдалось серьезное повышение уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ) и/или аспаргатаминотрансферазы (АСТ), но ни один из них не соответствовал критериям лекарственного поражения печени (ЛПП).

На момент окончания сбора данных 8 января 2021 г. смертей, связанных с лечением, не произошло.

Клиническая активность наблюдалась при дозах 3 мг, 30 мг и 200 мг 1Q3W; тем не менее, данные по безопасности показывают, что уровень дозы 200 мг 1Q3W связан с более высокой частотой связанных с лечением SAE и АЕ степени  $\geq 3$ , которые в основном заключались в повышении уровня АСТ/АЛТ, которое разрешалось при лечении. В совокупности данные показывают, что предпочтительный уровень дозы 1Q3W составляет около 100 мг.

Таблица 9. Наиболее распространенные SAE

	<=1 мг (N=4)		3,0 мг (N=4)		10 мг (N=6)		30 мг (N=9)		60 мг (N=1)		100 мг (N=6)		200 мг (N=6)		400 мг (N=3)		Всего (N=39)	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Пациенты с хотя бы одним АЕ	2	(50,0)	0		2	(33,3)	4	(44,4)	0		4	(66,7)	2	(33,3)	1	(33,3)	15	(38,5)
Аланинаминотрансфераза повышена	0		0		0		0		0		1	(16,7)	2	(33,3)	0		3	(7,7)
Аспаргатаминотрансфераза повышена	0		0		0		0		0		1	(16,7)	1	(16,7)	0		2	(5,1)
Обезвоживание	0		0		1	(16,7)	1	(11,1)	0		0		0		0		2	(5,1)
Одышка	1	(25,0)	0		0		1	(11,1)	0		0		0		0		2	(5,1)
Пневмония	0		0		0		1	(11,1)	0		1	(16,7)	0		0		2	(5,1)
Эмболия лёгких	1	(25,0)	0		0		0		0		0		0		1	(33,3)	2	(5,1)
Пирексия	0		0		1	(16,7)	0		0		0		1	(16,7)	0		2	(5,1)

Таблица 10. SAE, связанные с лечением

	<=1 мг (N=4)		3,0 мг (N=4)		10 мг (N=6)		30 мг (N=9)		60 мг (N=1)		100 мг (N=6)		200 мг (N=6)		400 мг (N=3)		Всего (N=39)	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Пациенты с хотя бы одним АЕ	0		0		0		0		0		1	(16,7)	2	(33,3)	0		3	(7,7)
Аланинаминотрансфераза повышена	0		0		0		0		0		1	(16,7)	2	(33,3)	0		3	(7,7)
Аспаргатаминотрансфераза повышена	0		0		0		0		0		1	(16,7)	1	(16,7)	0		2	(5,1)
Билирубин в крови повышен	0		0		0		0		0		1	(16,7)	0		0		1	(2,6)
Нейтропения	0		0		0		0		0		1	(16,7)	0		0		1	(2,6)
Пирексия	0		0		0		0		0		0		1	(16,7)	0		1	(2,6)

Пример 3. Физиологическая фармакокинетика/фармакодинамическое моделирование

Была разработана интегрированная минимальная физиологически обоснованная

фармакокинетическая/фармакодинамическая модель (PBPK/PD), которая моделирует распределение GEN1042 в плазме, периферических тканях, включая печень, опухоль и лимфатическую часть. Модель использует данные ФК и ФД, а также физиологические параметры из литературы для параметризации экспрессии CD40 и 4-1BB, а также перемещения Т-клеток к этим клеткам. Модельные компартменты состоят из хорошо перемешанных двух- и трехмерных пространств, где двухмерное пространство клеточной мембраны дополнительно разделено в мембране внутри иммунологического синапса (ИС) между двумя клетками и мембрану вне ИС. Свободный перенос лекарств между жидкостным пространством и рецепторами на поверхности клетки, не содержащимися в иммунологическом синапсе. Рецепторы (связанные с GEN1042 или несвязанные) диффундируют в пространство ИС и из него. Модель включает динамическое связывание комплекса GEN1042/рецептор в ИС либо с CD40, либо с 4-1BB для прогнозирования образования тримера (сшитого GEN1046 с CD40 и 4-1BB).

Модель использовалась для изучения спрогнозированного образования тримеров *in vivo* при различных режимах дозирования. В частности, было проведено моделирование для прогнозирования уровней тримеров CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток в компартментах опухоли, лимфатических узлов (ЛУ) и печени, чтобы спрогнозировать рекрутирование 4-1BB на Т-клетках и рекрутирование CD40 на АПК. В частности, макрофаги, зрелые дендритные клетки (зДК) и В-клетки оценивали на предмет рекрутирования CD40 на основании характера их экспрессии в каждом компартменте. Чтобы обобщить рекрутирование тримеров за один 3-недельный интервал дозирования, нанесли на график площади под кривой (AUC) для прогнозируемого процента тримера (общего 4-1BB или CD40) при различных дозах для рекрутирования 4-1BB на Т-клетках и рекрутирования CD40 на АПК.

На фиг. 4А, 4В и 4С показана AUC для прогнозируемых уровней тримеров в зависимости от дозы. Максимальное воздействие 4-1BB на Т-клетки наблюдалось в диапазоне 100–200 мг в опухолях и ЛУ и около 50–200 мг в печени. Рекрутирование CD40 на АПК наблюдалось с такой же интенсивностью. Увеличение дозы > 200 мг приводило к снижению образования тримеров. Кроме того, согласно имеющимся клиническим фармакодинамическим данным, более высокая степень и постоянная модуляция периферических фармакодинамических конечных точек (IFN- $\gamma$  и пролиферирующие Ki67<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> эффекторные Т-клетки памяти) наблюдались при дозах до 200 мг. Учитывая прогнозы моделирования PBPK/PD и доступные клинические данные, было спрогнозировано, что оптимальная доза GEN1042 будет находиться в диапазоне 100 мг 1Q3W.

Пример 4. Фармакодинамическая оценка GEN1042 в периферической крови у пациентов с распространенными солидными опухолями

Чтобы исследовать биологическую активность GEN1042 при различных уровнях доз у пациентов с распространенными опухолями, образцы крови и сыворотки были собраны на исходном уровне и в различные моменты времени во время лечения. На основании способа действия GEN1042 предполагалось, что уровни доз с биологической активностью будут модулировать циркулирующие уровни интерферона- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) и IFN- $\gamma$ -индуцируемого растворимого фактора макрофагов/дендритных клеток, хемокина, регулируемого тимусом и активацией (TARC), а также индуцируют пролиферацию/активацию периферических CD8 T-клеток.

Для определения уровней IFN- $\gamma$  и TARC в сыворотке крови у пациентов брали образцы на исходном уровне и в различные моменты времени после введения GEN1042 в циклах 1 и 2 (дни 1 [до, через 2 часа и между 4-6 часами после введения]), 2, 3, 8 и 15), а также до введения дозы в цикле 3 и далее. Уровни IFN- $\gamma$  и TARC в сыворотке измеряли с помощью мультиплексного иммуноанализа Meso Scale Discovery (MSD) (кат. № K15209G), следуя инструкциям производителя.

Введение GEN1042 онкологическим больным приводило к модуляции циркулирующих уровней IFN- $\gamma$  (фиг. 5A) и TARC (фиг. 5B). В предварительном наборе данных уровни IFN- $\gamma$  превышали нормальный референсный диапазон (<11,81 пг/мл) в первых двух циклах как минимум у 1 пациента на дозу  $\geq 3$  мг. В этом диапазоне пик индукции наблюдался через 2–7 дней после введения дозы, при этом максимальная индукция наблюдалась при дозах 100 и 200 мг. Хотя модуляция IFN- $\gamma$  наблюдается при дозе 400 мг, средняя индукция в течение первого цикла лечения оказывается ниже по сравнению с дозами 100 и 200 мг. Уровни TARC постоянно превышали нормальный референсный диапазон (<513 пг/мл) в первых двух циклах как минимум у 1 пациента на дозу  $\geq 3$  мг. В этом диапазоне пик индукции наблюдался через 2–7 дней после введения дозы, при этом максимальная индукция наблюдалась при дозах 30 мг и 100 мг.

Для измерения периферической модуляции подпопуляций иммунных клеток иммунофенотипирование периферической крови проводили в цельной крови, собранной в пробирки с EDTA на момент включения в исследование и в различные моменты времени после введения GEN1042 в цикле 1 и цикле 2 (дни 1, 2, 3, 8 и 15), а также до введения дозы в цикле 3 и далее. 100 мкл цельной крови добавляли к конъюгированным с флюорохромом моноклональным антителам, которые специфически связываются с антигенами клеточной поверхности: CD45RA-FITC (клон L48, BD Biosciences cat. № 335039), CCR7-BV510 (клон 3D12, BD Biosciences, cat. № 563449), CD8-PerCP-Cy5.5

(клон RPA-T8, BD Biosciences, кат. № 560662), CD4-PE (клон SK3, BD Biosciences, кат. № 345769), CD45-BV605 (клон HI30, BD Biosciences кат. № 564047), CD19-PE-Cy7 (клон Sj2SC1, BD Biosciences, кат. № 341113), CD3-АПК-Н7 (клон SK7, BD Biosciences, кат. № 560176) и 4-1ВВ-АF647 (клон 4В4-1, Biolegend, кат. № 309824). После инкубации на льду окрашенные образцы обрабатывали лизирующим раствором FACS (BD Biosciences, каталожный № 349202) для лизиса эритроцитов. Избыток антител и клеточный мусор удаляли промыванием буфером Stain Buffer (BD Biosciences, кат. № 554656). После лизирования/промывки клетки фиксировали и пермеабилizировали путем инкубации с буфером Permeabilizing Solution 2 (BD Biosciences, кат. № 340973). Затем клетки промывали и ресуспендировали в буфере Stain Buffer и инкубировали на льду с антителом к Ki67-BV421 (клон B56, BD Biosciences, кат. № 562899) для обнаружения пролиферирующих клеток. После инкубации избыток антител удаляли промыванием буфером Stain Buffer. Клетки ресуспендировали в буфере для красителей и собирали на проточном цитометре BD FACSCanto™ (Becton Dickinson) в течение 1 часа после окрашивания.

GEN1042 вызывал временную миграцию/скопление Т-клеток CD8 (фиг. 6А) и В-клеток (фиг. 6В) после введения дозы, что указывает на взаимодействие с мишенями 4-1ВВ и CD40, соответственно. Это постоянно наблюдалось при дозах  $\geq 3$  мг, с более выраженной миграцией В-клеток при дозах  $> 30$  мг. Кроме того, у пациентов, получавших дозу GEN1042, наблюдались признаки созревания/размножения CD4 и CD8 Т-клеток (фиг. 7). Значения площади под кривой (AUC) рассчитывали для каждого пациента с использованием нормализованных к исходному уровню значений до 2-го дня 15-го цикла для наивных CD4 и CD8 (CD45RA+CCR7+) или эффекторных Т-клеток памяти (CD45RA-CCR7-) [Tem]. Затем рассчитывали среднее значение AUC для пациентов в пределах каждого уровня дозы и рассчитывали разницу между наивными и Tem-клетками в популяциях CD4 или CD8. Продольные профили пациентов показали последовательный сдвиг от наивных Т-клеток к Tem-клеткам при дозах  $\geq 30$  мг.

GEN1042 вызывал пролиферацию и активацию общего числа CD8+ Т-клеток (фиг. 8А, 9А) и эффекторных Т-клеток памяти CD8+ (фиг. 8В, 9В), что измерялось по увеличению частоты популяций %Ki67+ и %4-1ВВ+, соответственно. Пиковые иммунофенотипические изменения наблюдались примерно через 7 дней после введения дозы. Следует отметить, что дозы  $\geq 200$  мг показали снижение индукции 4-1ВВ во 2-м цикле по сравнению с пациентами, принимавшими дозу 100 мг. По сравнению с изменениями, наблюдаемыми при модуляции уровней циркулирующего IFN- $\gamma$ , более последовательная модуляция пролиферации и активации наблюдалась у пациентов,

получавших дозы  $\geq 10$  мг (Ki67) и  $\geq 3$  мг (4-1BB).

#### Вывод

GEN1042 вызывал фармакодинамику в широком диапазоне уровней доз, характеризующуюся модуляцией иммунных эффекторных клеток и растворимых факторов, имеющих решающее значение для генерации противоопухолевых иммунных ответов, которые были благоприятны в диапазоне 30-200 мг.

#### Примечания к анализу

Фармакодинамические оценки, включая изменения в циркулирующих уровнях цитокинов, хемокинов и популяций иммунных клеток, проводились с использованием образцов крови пациентов с распространенными солидными опухолями, включенных в фазу повышения дозы открытого многоцентрового исследования безопасности GEN1042 (NCT04083599). Дата окончания анализа (DCO) — 22 января 2021 года.

Имеющиеся данные о безопасности, эффективности, ФК/ФД, а также механистическое моделирование ФКФД были использованы для определения дозы GEN1042, рекомендованной для дальнейшей оценки. Анализ трансляционных исследований показал благоприятное взаимодействие с мишенями и активацию Т- и В-клеток при дозах от 30 до 200 мг 1Q3W. Фармакокинетическое/фармакодинамическое моделирование периферической крови и занятости рецепторов показало, что пиковое образование тримеров в опухолях и лимфатических узлах происходит в диапазоне от 100 до 200 мг.



## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Связывающий агент для применения в способе уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли или лечения злокачественного заболевания у субъекта, где указанный способ включает введение указанному субъекту связывающего агента в подходящем количестве, при этом связывающий агент содержит первую область связывания, связывающуюся с CD40 человека, например, CD40 человека, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, и вторую область связывания, связывающуюся с CD137 человека, например, CD137 человека, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38.

2. Связывающий агент для применения по п. 1, отличающийся тем, что подходящее количество связывающего агента представляет собой терапевтически эффективное и безопасное количество.

3. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что подходящее количество связывающего агента составляет около 0,04-2,5 мг/кг массы тела или около 3-200 мг в общей сложности; и/или около  $0,25 \times 10^{-9}$ - $16,9 \times 10^{-9}$  моль/кг массы тела или около  $20 \times 10^{-9}$ - $1350 \times 10^{-9}$  моль в общей сложности.

4. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что связывающий агент вводят системно, предпочтительно внутривенно.

5. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что

а) первая связывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 7 или 9, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 8 или 10;

и

б) вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 17 или 19, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 18 или 20.

6. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что

а) первая связывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую

последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно;

и

b) вторая антигенсвязывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 11, 12 и 13, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно.

7. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что

a) первая связывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7 или 9 и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8 или 10;

b) вторая связывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 17 или 19, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 18 или 20.

8. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что

a) первая связывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7 или 9, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8 или 10;

и

b) вторая связывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17 или 19, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18 или 20.

9. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что

a) первая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10;

и

b) вторая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, и переменную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20.

10. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что связывающий агент представляет собой мультиспецифическое антитело, такое как биспецифическое антитело.

11. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что связывающий агент имеет форму полноразмерного антитела или фрагмента антитела.

12. Связывающий агент для применения по любому из пп. 5-11, отличающийся тем, что каждая переменная область содержит три области, определяющие комплементарность (CDR1, CDR2 и CDR3) и четыре каркасные области (FR1, FR2, FR3 и FR4).

13. Связывающий агент для применения по п. 12, отличающийся тем, что указанные области, определяющие комплементарность, и указанные каркасные области расположены от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

14. Связывающий агент для применения по любому из пп. 5-13, который содержит i) полипептид, содержащий, состоящий из или по существу состоящий из указанной первой переменной области тяжелой цепи (VH) и первой константной области тяжелой цепи (CH), и

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

15. Связывающий агент для применения по любому из пп. 5-14, который содержит i) полипептид, включающий указанную первую переменную область легкой цепи (VL) и дополнительно включающий первую константную область легкой цепи (CL), и

ii) полипептид, включающий указанную вторую переменную область легкой цепи (VL) и дополнительно включающий вторую константную область легкой цепи (CL).

16. Связывающий агент для применения по любому из пп. 5-15, отличающийся тем, что связывающий агент представляет собой антитело, содержащее первое связывающее плечо и второе связывающее плечо, где

первое связывающее плечо содержит

i) полипептид, включающий указанную первую переменную область тяжелой цепи (VH) и первую константную область тяжелой цепи (CH), и

ii) полипептид, включающий указанную первую переменную область легкой цепи (VL) и первую константную область легкой цепи (CL);

и второе связывающее плечо содержит

iii) полипептид, включающий указанную вторую переменную область тяжелой цепи (VH) и вторую константную область тяжелой цепи (CH), и

iv) полипептид, включающий указанную вторую переменную область легкой цепи (VL) и вторую константную область легкой цепи (CL).

17. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., который содержит

i) первые тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную связывать CD40, и

ii) вторые тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную связывать CD137.

18. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что указанный связывающий агент содержит

i) первые тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную связываться с CD40, где первая тяжелая цепь содержит первую константную область тяжелой цепи, а первая легкая цепь содержит первую константную область легкой цепи; и

ii) вторые тяжелую цепь и легкую цепь, содержащую указанную антигенсвязывающую область, способную связывать CD137, вторую тяжелую цепь, содержащую вторую константную область тяжелой цепи, и вторую легкую цепь, содержащую вторую константную область легкой цепи.

19. Связывающий агент для применения по любому из пп. 14-18, отличающийся тем, что каждая из первой и второй константных областей тяжелой цепи (CH) содержит одну или несколько из числа константной области 1 тяжелой цепи (CH1), шарнирной области, константной области 2 тяжелой цепи (CH2) и константной области 3 тяжелой

цепи (СН3), предпочтительно, по меньшей мере, шарнирной области, области СН2 и области СН3.

20. Связывающий агент для применения по любому из пп. 14-19, отличающийся тем, что каждая из первой и второй константных областей тяжелой цепи (СН) содержит область СН3, и при этом две области СН3 содержат асимметричные мутации.

21. Связывающий агент для применения по любому из пп. 14-20, отличающийся тем, что в указанной первой константной области тяжелой цепи (СН) по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из Т366, L368, К370, D399, F405, Y407 и К409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU были заменены, и в указанной второй константной области тяжелой цепи (СН) по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из Т366, L368, К370, D399, F405, Y407 и К409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU была заменена, и при этом указанные первая и указанная вторая тяжелые цепи не заменены в одних и тех же положениях.

22. Связывающий агент для применения по п. 21, отличающийся тем, что (i) аминокислота в положении, соответствующем F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляет собой L в указанной первой константной области тяжелой цепи (СН), а аминокислота в положении, соответствующем К409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU, представляет собой R в указанной второй константной области тяжелой цепи (СН) или (ii) аминокислота в положении, соответствующем К409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU, представляет собой R в указанной первой тяжелой цепи, а аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи IgG1 человека в соответствии с нумерацией EU, представляет собой L в указанной второй тяжелой цепи.

23. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что указанный связывающий агент индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с другим антителом, содержащим такие же первую и вторую антигенсвязывающие области и две константные области тяжелой цепи (СН), содержащие области шарнира, СН2 и СН3 IgG1 человека.

24. Связывающий агент для применения по п. 23, отличающийся тем, что указанные первая и вторая константные области тяжелой цепи (СН) модифицированы так, что антитело индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с антителом, которое идентично, за исключением того, что оно содержит немодифицированные первую и вторую константные области тяжелой цепи (СН).

25. Связывающий агент для применения по п. 24, отличающийся тем, что каждая из указанных немодифицированных первой и второй константных областей тяжелой цепи (CH) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21 или 29.

26. Связывающий агент для применения по п. 24 или 25, отличающийся тем, что указанную Fc-опосредованную эффекторную функцию измеряют путем связывания с Fcγ-рецепторами, связывания с C1q или индукции Fc-опосредованного перекрестного сшивания Fcγ-рецепторов.

27. Связывающий агент для применения по п. 26, отличающийся тем, что указанную Fc-опосредованную эффекторную функцию измеряют путем связывания с C1q.

28. Связывающий агент для применения по любому из пп. 23-27, отличающийся тем, что указанные первая и вторая константные области тяжелой цепи модифицированы так, что связывание C1q с указанным антителом снижено по сравнению с антителом дикого типа, предпочтительно снижено по меньшей мере на 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или 100%, где связывание C1q предпочтительно определяют с помощью ELISA.

29. Связывающий агент для применения по любому из пп. 14-28, отличающийся тем, что по меньшей мере в одной из указанных первой и второй константных областей тяжелой цепи (CH) одна или более аминокислот находятся в положениях, соответствующих положениям L234, L235, D265, N297 и P331 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU не являются L, L, D, N и P, соответственно.

30. Связывающий агент для применения по п. 29, отличающийся тем, что положения, соответствующие положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU, представляют собой F и E, соответственно, в указанных первой и второй тяжелых цепях.

31. Связывающий агент для применения по п. 29 или 30, отличающийся тем, что положениями, соответствующими положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU, являются F, E и A, соответственно, в указанной первой и второй константных областях (HC) тяжелой цепи.

32. Связывающий агент для применения по любому из пп. 29-31, отличающийся тем, что положения, соответствующие положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU как первой, так и второй константных областей тяжелой цепи, представляют собой F и E, соответственно, и где (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU первой константной области тяжелой цепи, представляет собой L, а положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи

IgG1 человека согласно нумерации EU второй тяжелой цепи представляет собой R, или (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU первой константной области тяжелой цепи, представляет собой R, и положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU вторая тяжелая цепь представляет собой L.

33. Связывающий агент для применения по любому из пп. 29-32, отличающийся тем, что положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU как первой, так и второй константных областей тяжелой цепи, представляют собой F, E, и A, соответственно, и где (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU первой константной области тяжелой цепи, представляет собой L, и положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно ЕС-нумерация второй константной области тяжелой цепи представляет собой R, или (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU первой тяжелой цепи, представляет собой R, и положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU второй тяжелой цепи, представляет собой L.

34. Связывающий агент для применения по любому из пп. 14-33, отличающийся тем, что константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

a) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21 или 29 [IgG1-FC];

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

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

35. Связывающий агент для применения по любому из пп. 14-33, отличающийся тем, что константная область указанной первой или второй тяжелой цепи, такая как вторая тяжелая цепь, содержит или состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

a) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22 или 30 [IgG1-F405L];

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

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

36. Связывающий агент для применения по любому из пп. 14-33, отличающийся тем, что константная область указанной первой или второй тяжелой цепи, такая как первая тяжелая цепь, содержит или состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23 или 31 [IgG1-F409R];

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

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

37. Связывающий агент для применения по любому из пп. 14-33, отличающийся тем, что константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24 или 32 [IgG1-Fc\_FEA];

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

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



38. Связывающий агент для применения по любому из пп. 14-37, отличающийся тем, что константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи, например, второй тяжелой цепи, содержит или состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 25 или 33 [IgG1-Fc\_FEAL];

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

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

39. Связывающий агент для применения по любому из пп. 14-38, отличающийся тем, что константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи, такая как первая тяжелая цепь, содержит или состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности, указанной в SEQ ID NO: 26 или 34 [IgG1-Fc\_FEAR];

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

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

40. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что указанный связывающий агент содержит константную область легкой цепи каппа ( $\kappa$ ).

41. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что указанный связывающий агент содержит константную область легкой цепи лямбда ( $\lambda$ ).

42. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что указанная первая константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа ( $\kappa$ ) или константную область легкой цепи

лямбда ( $\lambda$ ).

43. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что указанная вторая константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа ( $\kappa$ ) или константную область легкой цепи лямбда ( $\lambda$ ).

44. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что указанная первая константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа ( $\kappa$ ), а указанная вторая константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи лямбда ( $\lambda$ ) или указанная первая константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи лямбда ( $\lambda$ ), а указанная вторая константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа ( $\kappa$ ).

45. Связывающий агент для применения по любому из пп. 40-44, отличающийся тем, что легкая цепь каппа ( $\kappa$ ) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 27,

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

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

46. Связывающий агент для применения по любому из пп. 41-45, отличающийся тем, что легкая цепь лямбда ( $\lambda$ ) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 28,

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

с) последовательности, имеющей по большей мере 10 замен, например, по большей мере 9 замен, по большей мере 8, по большей мере 7, по большей мере 6, по большей мере

5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

47. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что связывающий агент имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

48. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что связывающий агент представляет собой полноразмерное антитело IgG1.

49. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что связывающий агент представляет собой антитело аллотипа IgG1m(f).

50. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что субъектом является человек.

51. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что опухоль или злокачественное заболевание представляет собой солидную опухоль.

52. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что опухоль или злокачественное заболевание выбраны из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ)), колоректального рака, рака головы и рак шеи, рак желудка, рака молочной железы, рака почки, рака уротелия, рака мочевого пузыря, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака печени, тимомы и карциномы тимуса, рака головного мозга, глиомы, аденокарциномы, рака щитовидной железы, других видов рака кожи, саркомы, множественной миеломы, лейкоза, лимфомы, миелодиспластических синдромов, рака яичников, рака эндометрия, рака предстательной железы, рака полового члена, рака шейки матки, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, карциномы клеток Меркеля и мезотелиомы.

53. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., где опухоль или злокачественное заболевание выбирают из группы, состоящей из рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ)), меланомы, колоректального рака, уротелиального рака (рака мочевого пузыря, мочеочника, уретры или почечной лоханки), рака эндометрия (ЕС), рака молочной железы (например, трижды негативного рака молочной железы (TNBC)), плоскоклеточного рака головы и шеи (SCCHN) (например, рака полости рта, глотки или гортани) и рака шейки матки.

54. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что опухоль или злокачественную опухоль выбирают из группы, состоящей из рака легкого, меланомы и колоректального рака.

55. Связывающий агент для применения по п. 54, отличающийся тем, что злокачественное заболевание представляет собой немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), такой как плоскоклеточный или неплоскоклеточный НМРЛ.

56. Связывающий агент для применения по п. 55, отличающийся тем, что НМРЛ не имеет мутации, сенсibiliзирующей эпидермальный фактор роста (EGFR) и/или транслокации в анапластической лимфоме (ALK)/перестройки ROS1.

57. Связывающий агент для применения по п. 55 или 56, отличающийся тем, что субъект ранее получал до четырех схем системного лечения распространенного/метастазирующего заболевания и у него отмечалось прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, например, прогрессирование заболевания, определяемое рентгенографией.

58. Связывающий агент для применения по п. 57, отличающийся тем, что субъект прошел химиотерапию на основе платины.

59. Связывающий агент для применения по п. 57, отличающийся тем, что субъект не подходит для терапии на основе платины и получает альтернативную химиотерапию, например, лечение по схеме, содержащей гемцитабин.

60. Связывающий агент для применения по любому из пп. 55-59, отличающийся тем, что субъект ранее получал лечение ингибитором(ами) контрольной точки, таким как агент(ы), нацеленный(ые) на PD-1/PD-L, например, ингибитором PD-1/PD-L1.

61. Связывающий агент для применения по любому из пп. 55-60, отличающийся тем, что у субъекта наблюдалось прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, например, прогрессирование заболевания, определяемое рентгенографией.

62. Связывающий агент для применения по п. 54, отличающийся тем, что злокачественное заболевание представляет собой меланому кожи, акральной области или слизистых оболочек.

63. Связывающий агент для применения по п. 62, отличающийся тем, что субъект ранее получал до четырех системных курсов лечения распространенного/метастазирующего заболевания и у него отмечалось прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, например, прогрессирование заболевания, определяемое

рентгенографией.

64. Связывающий агент для применения по п. 62 или 63, отличающийся тем, что субъект ранее получал лечение ингибитором(ами) контрольной точки, таким как агент(ы), нацеленный(ые) на PD-1/PD-L, например, ингибитором PD-1/PD-L1.

65. Связывающий агент для применения по п. 54, отличающийся тем, что злокачественное заболевание представляет собой рак прямой кишки.

66. Связывающий агент для применения по п. 65, отличающийся тем, что субъект ранее получал до четырех системных курсов лечения распространенного/метастазирующего заболевания и у него отмечалось прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, например, прогрессирование заболевания, определяемое рентгенографией.

67. Связывающий агент для применения по п. 65 или 66, отличающийся тем, что субъект прошел терапию на основе 5-ФУ.

68. Связывающий агент для применения по любому из пп. 65-67, отличающийся тем, что субъект не получал лечения ингибитором ICP.

69. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что связывающий агент вводят по меньшей мере в одном цикле лечения, где каждый цикл лечения составляет три недели (21 день).

70. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что одну дозу вводят каждую третью неделю (1Q3W).

71. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что одну дозу вводят в первый день каждого цикла лечения.

72. Связывающий агент для применения по любому из предшествующих пп., отличающийся тем, что каждая доза вливается в течение минимум 30 минут, например, в течение минимум 60 минут, минимум 90 минут, минимум 120 минут или минимум 240 минут.

73. Композиция, содержащая связывающий агент, включающий первую область связывания, связывающуюся с CD40 человека, и вторую область связывания, связывающуюся с CD137 человека, где количество связывающего агента в композиции составляет около 3-200 мг или около  $20 \times 10^{-9}$ - $1350 \times 10^{-9}$  моль.

74. Композиция по п. 73, содержащая около 40 мг указанного связывающего агента.

75. Композиция по п. 73 или 74, отличающаяся тем, что связывающий агент такой, как определено в любом из пп. 1-72.

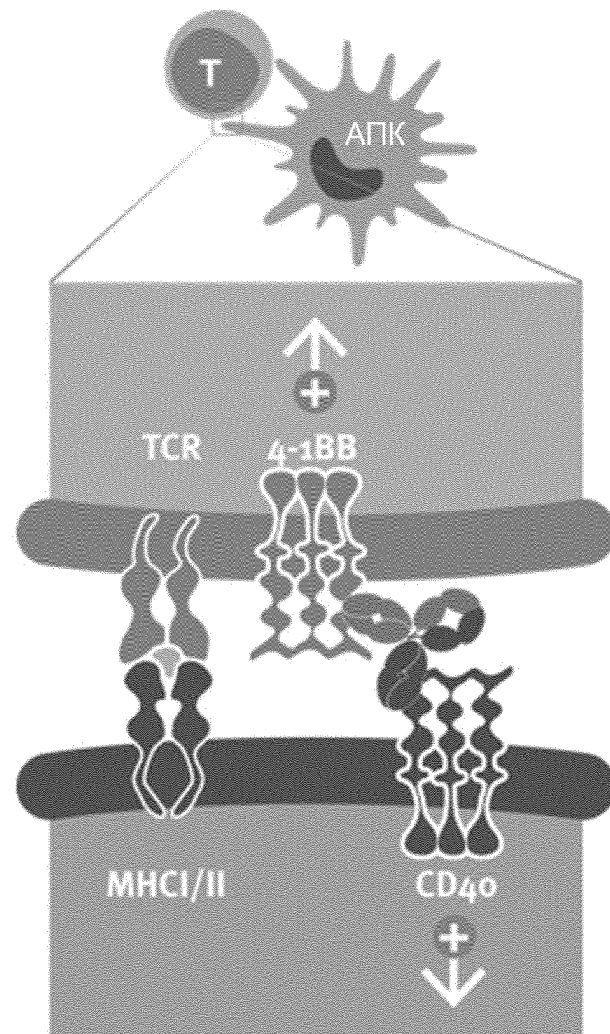
76. Композиция по любому из пп. 73-75, отличающаяся тем, что композиция предназначена для системного введения.

77. Композиция по любому из пп. 73-76, отличающаяся тем, что композиция предназначена для инъекции или инфузии, например, внутривенной инъекции или инфузии.

78. Композиция по любому из пп. 73-77, отличающаяся тем, что связующее вещество находится в водном растворе, например, в 0,9% NaCl (физраствор), в объеме 50-500 мл, например, 100-250 мл.

79. Композиция по любому из пп. 73-78, где указанная композиция представляет собой единичную дозированную форму.

80. Композиция по любому из пп. 73-79 для применения в способе уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли или лечения злокачественного заболевания у субъекта.



Лицензирование ДК

Клональное размножение Т-клеток

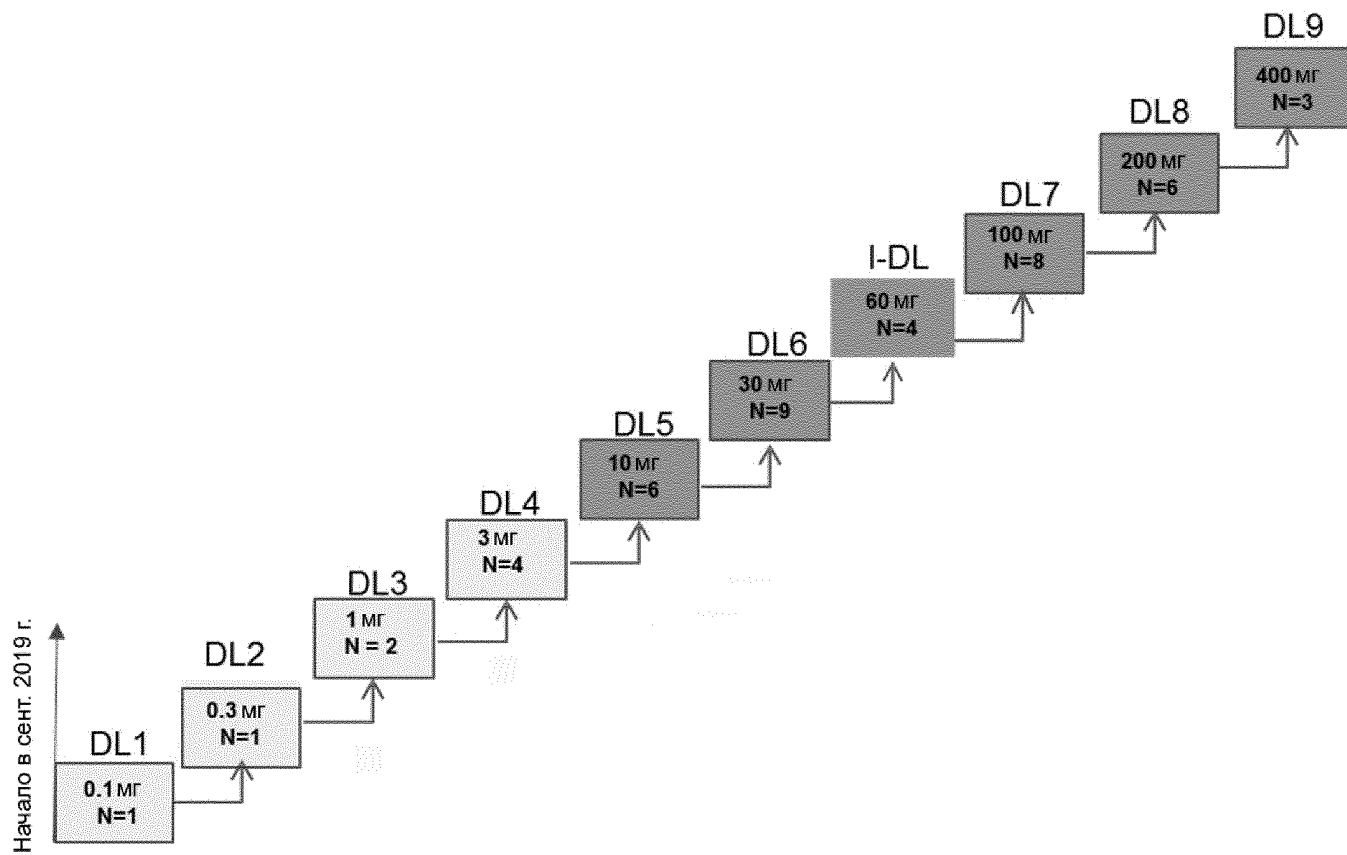
Продуцирование цитокинов

Выживание Т-клеток

Цитотоксичность Т-клеток и НК-клеток

1/15

Фиг. 1

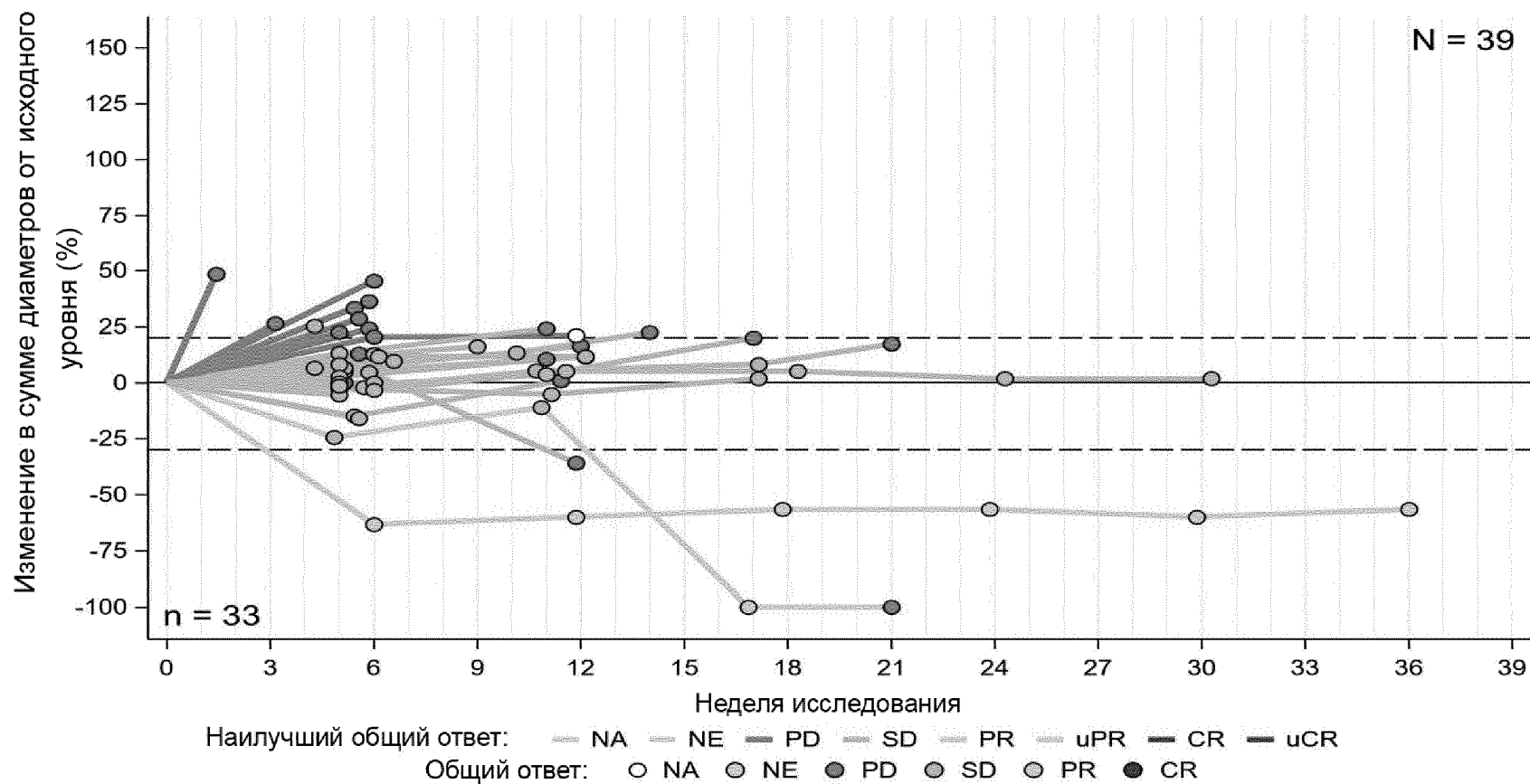


- Ускоренный подбор дозы, когорты одиночных пациентов
- Стандартный подбор дозы, когорты из множества пациентов

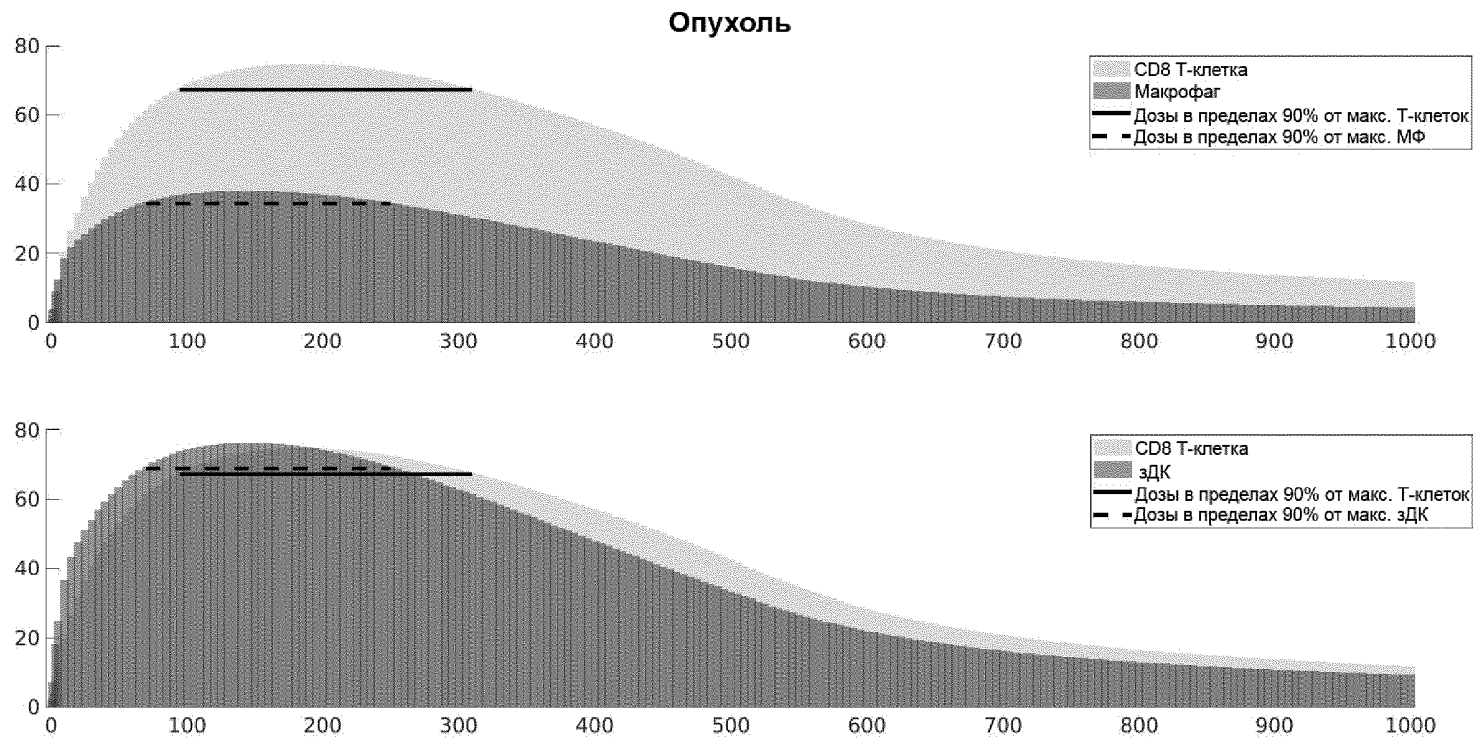
Фиг. 2



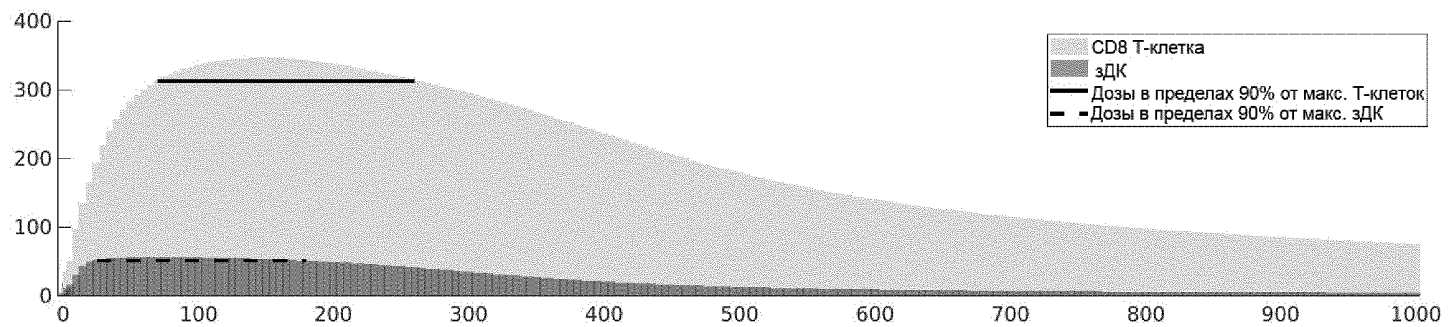
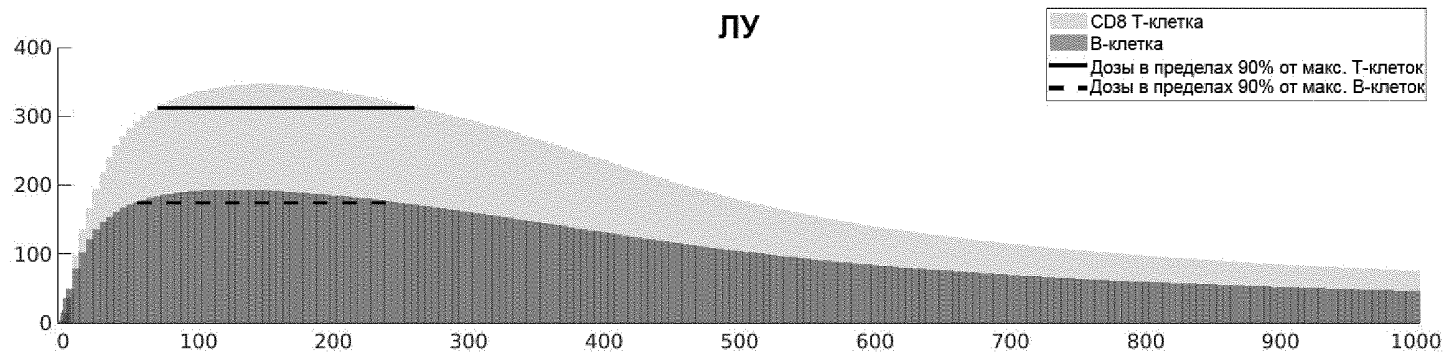
Изменение целевых поражений с течением времени – Лепестковая диаграмма –  
Повышение – Все пациенты – Набор для полного анализа



Фиг. 3

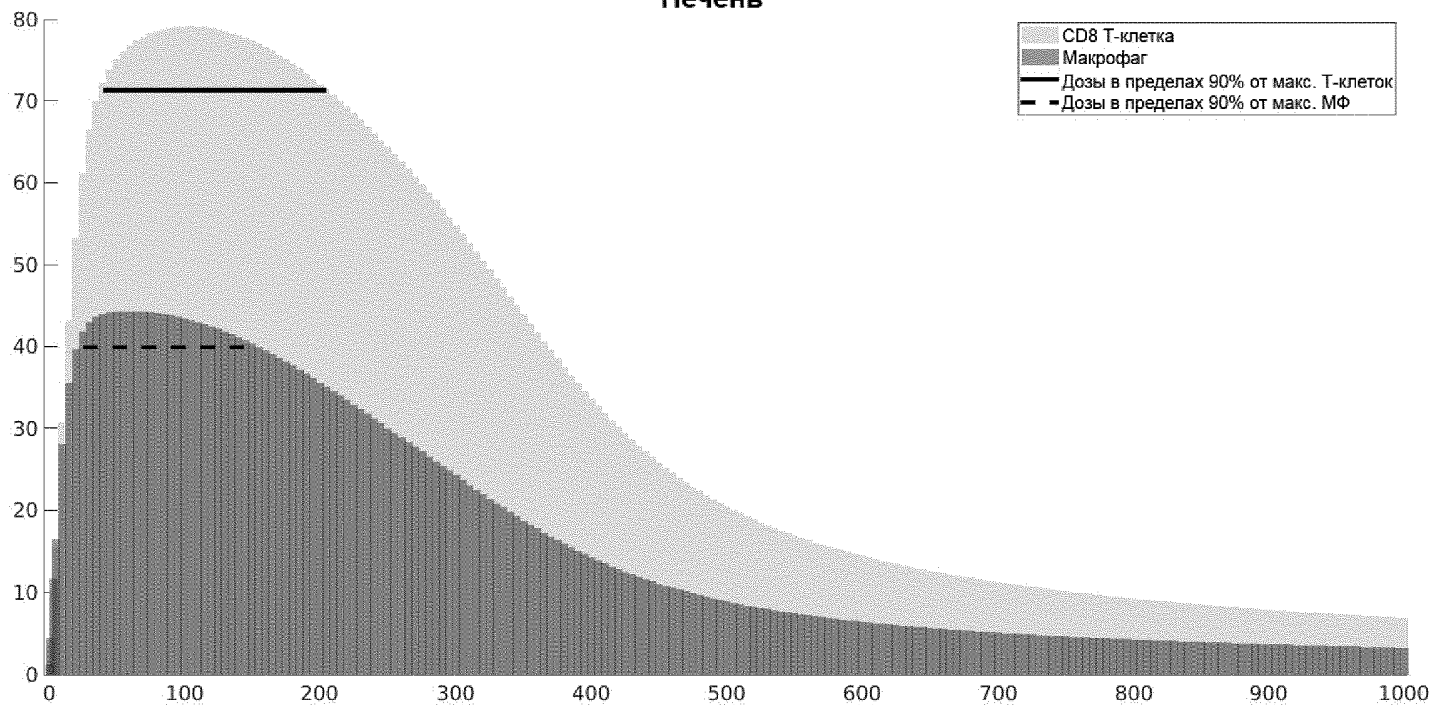


Фиг. 4А

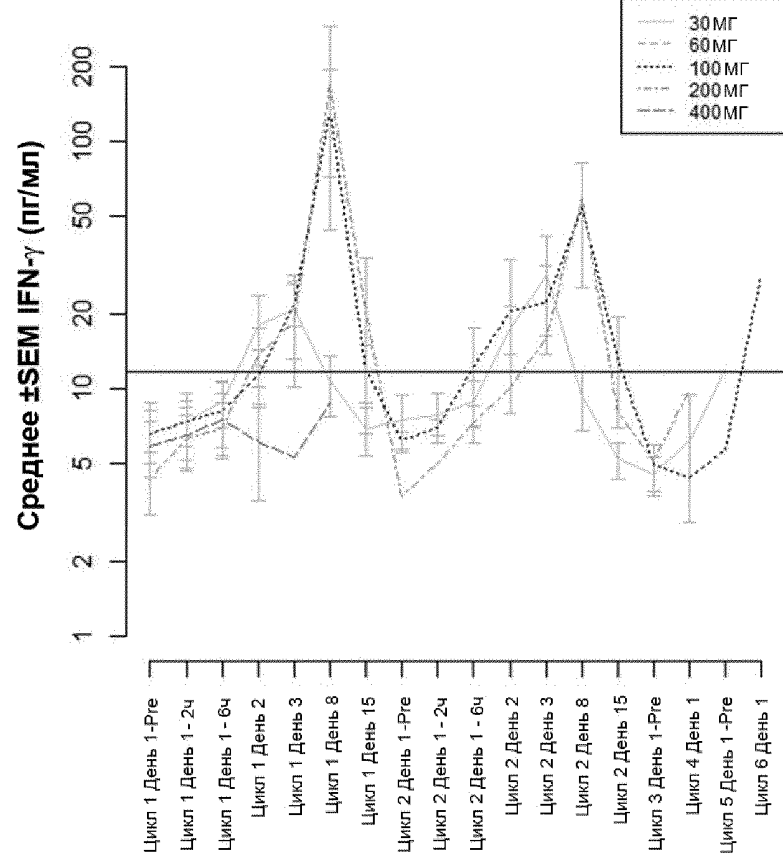
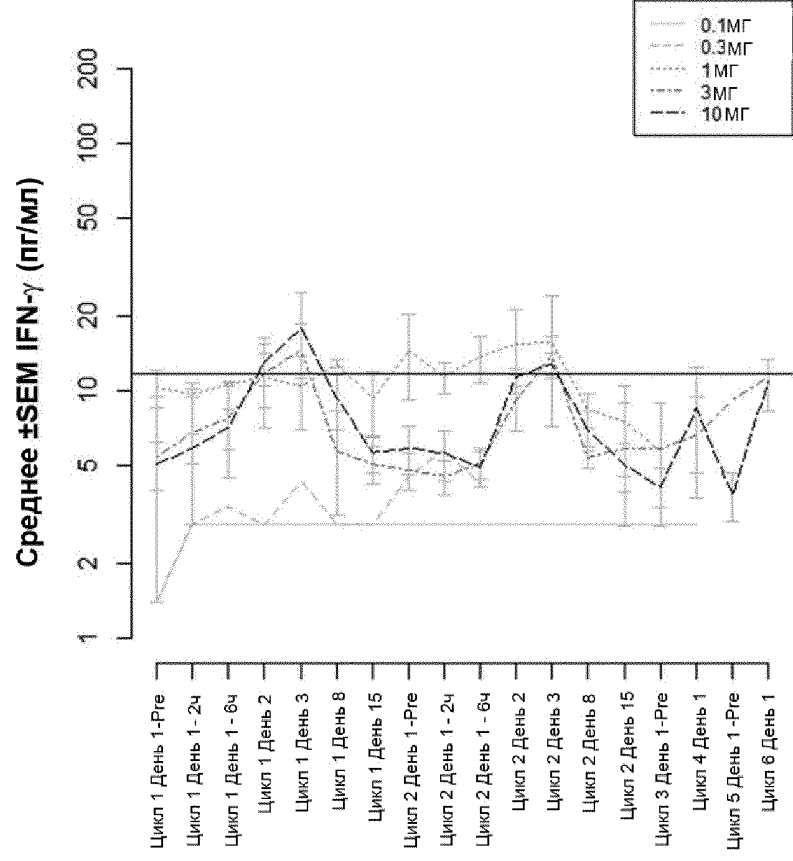


**Фиг. 4В**

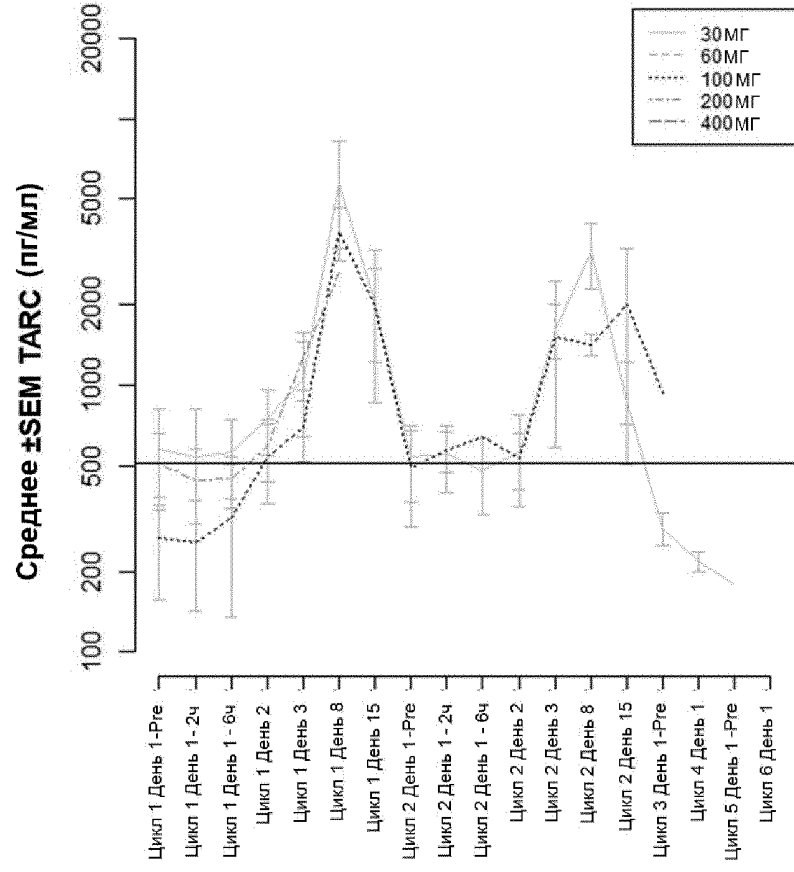
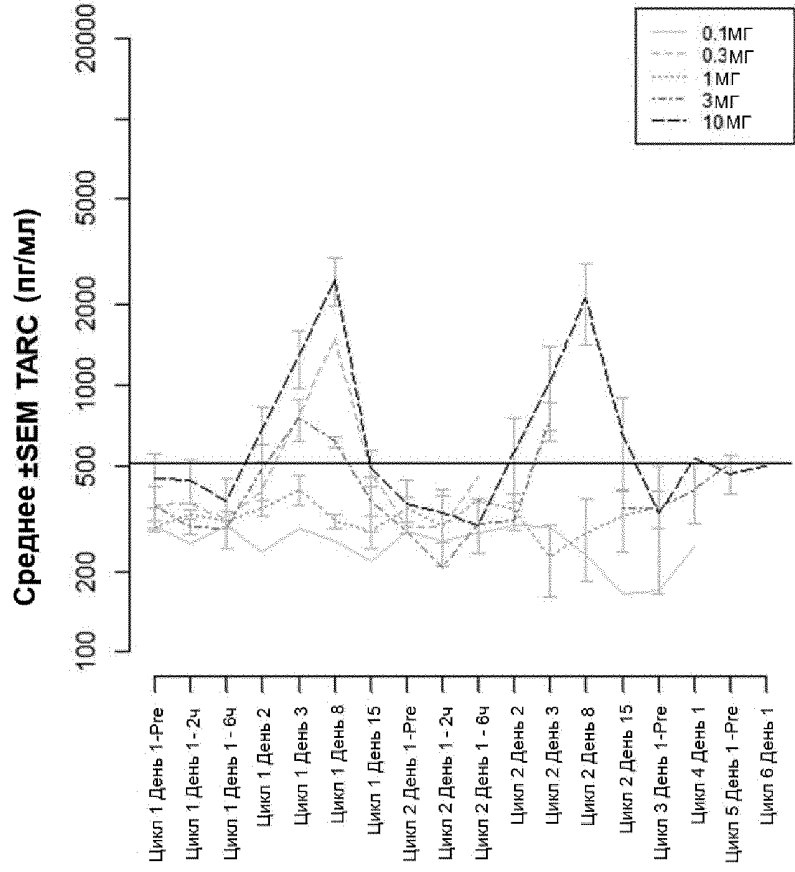
Печень



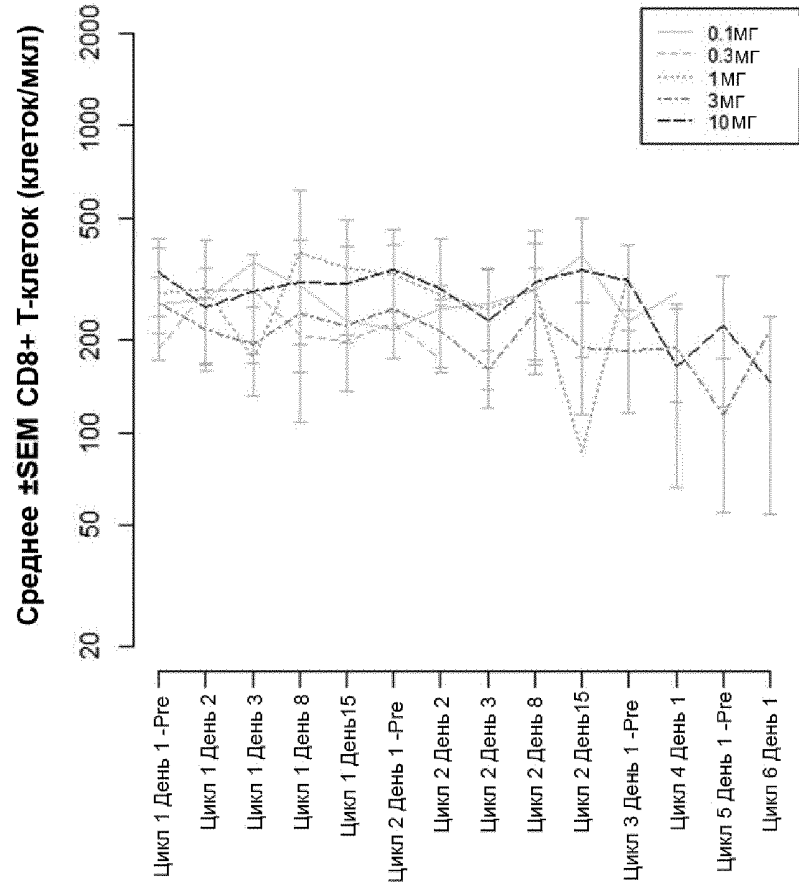
Фиг. 4С



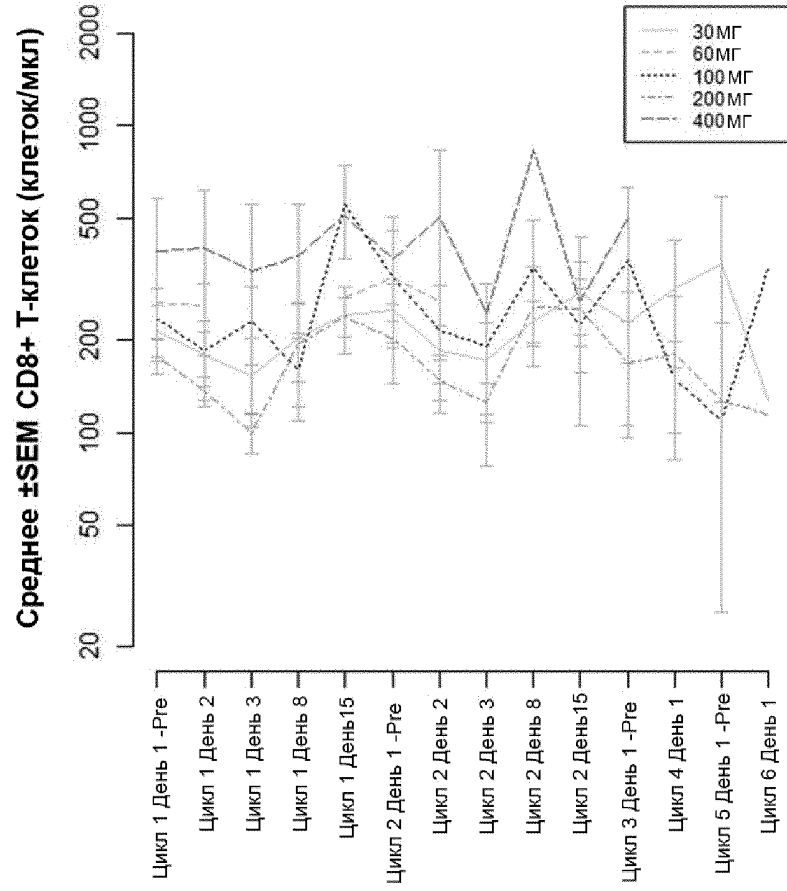
Фиг. 5А

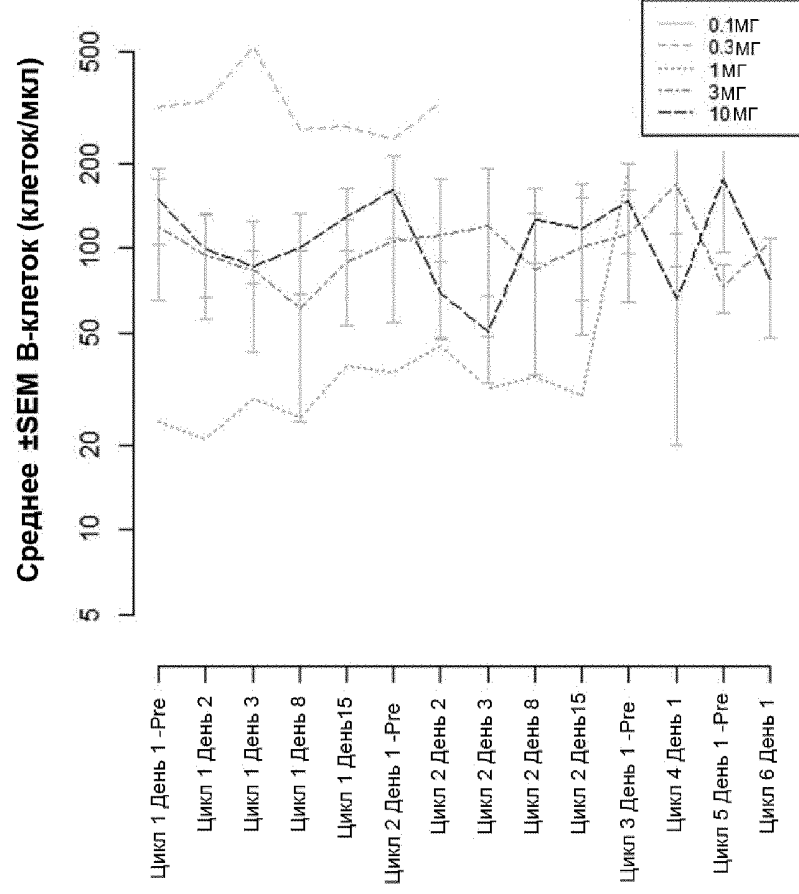


Фиг. 5В

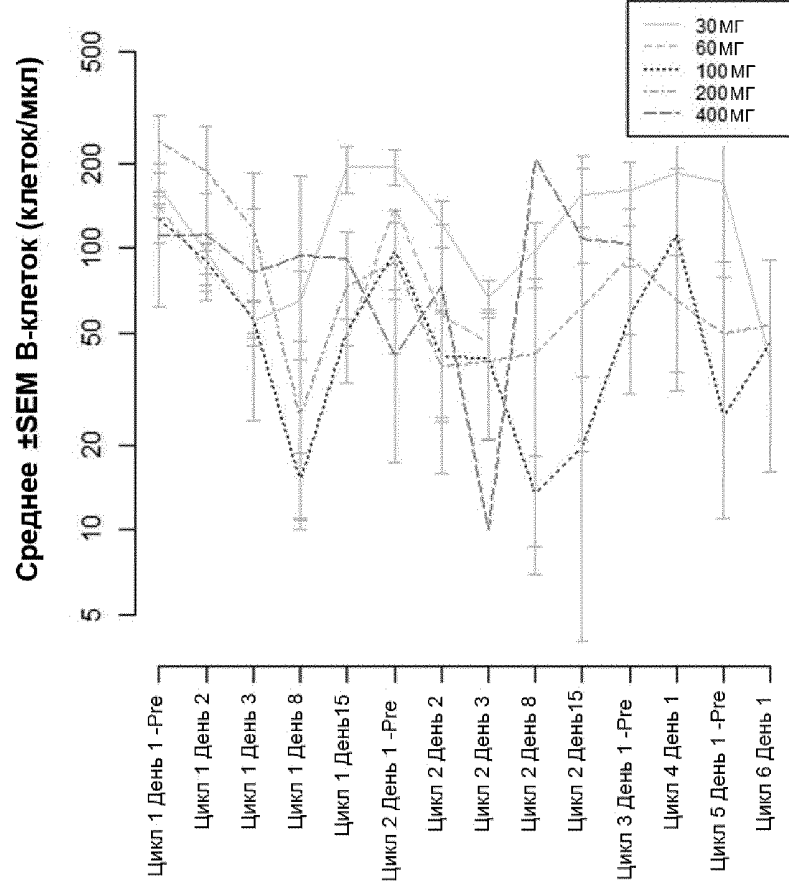


Фиг. 6А

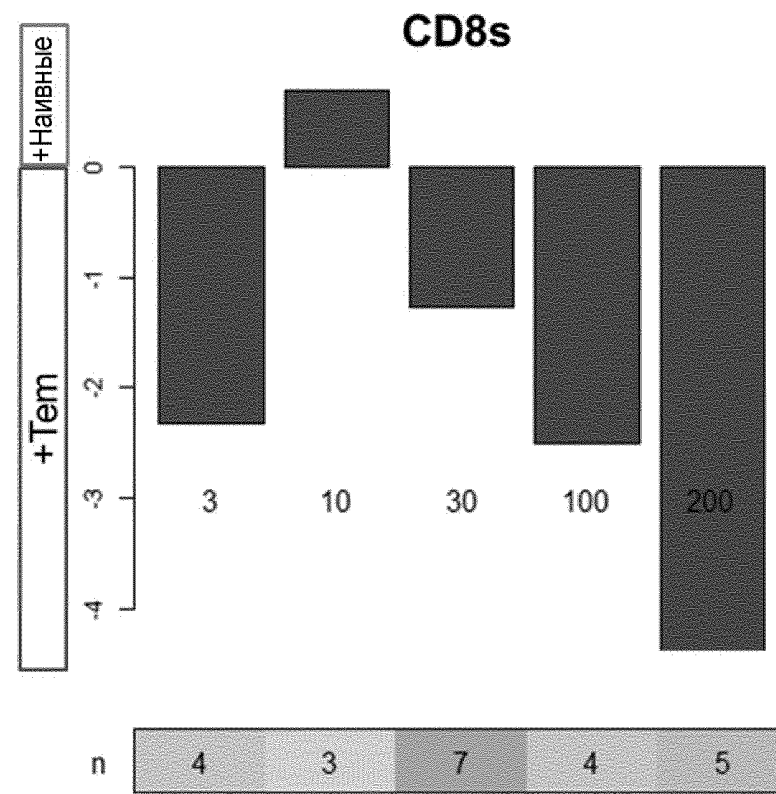
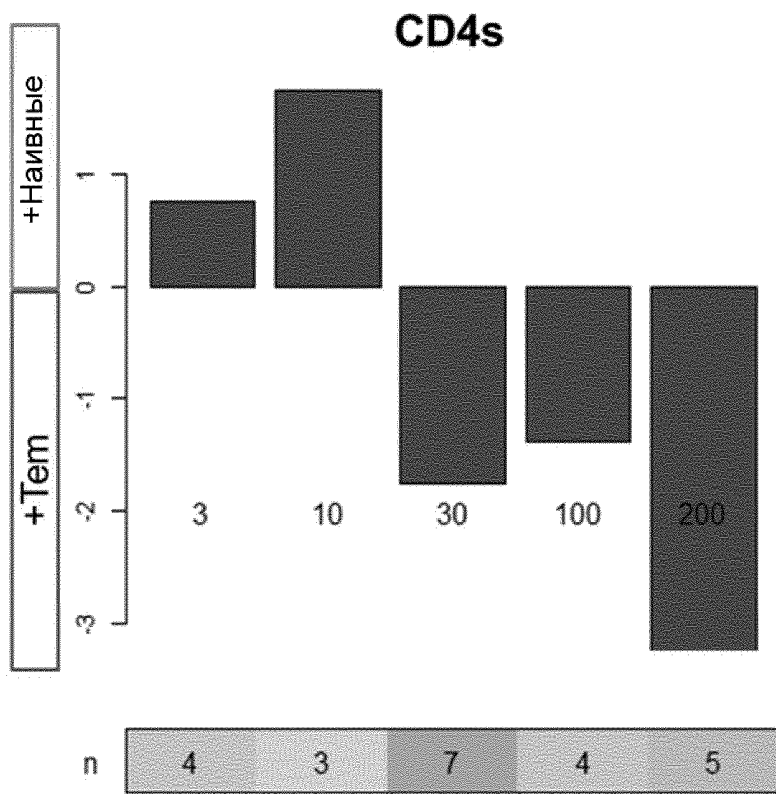




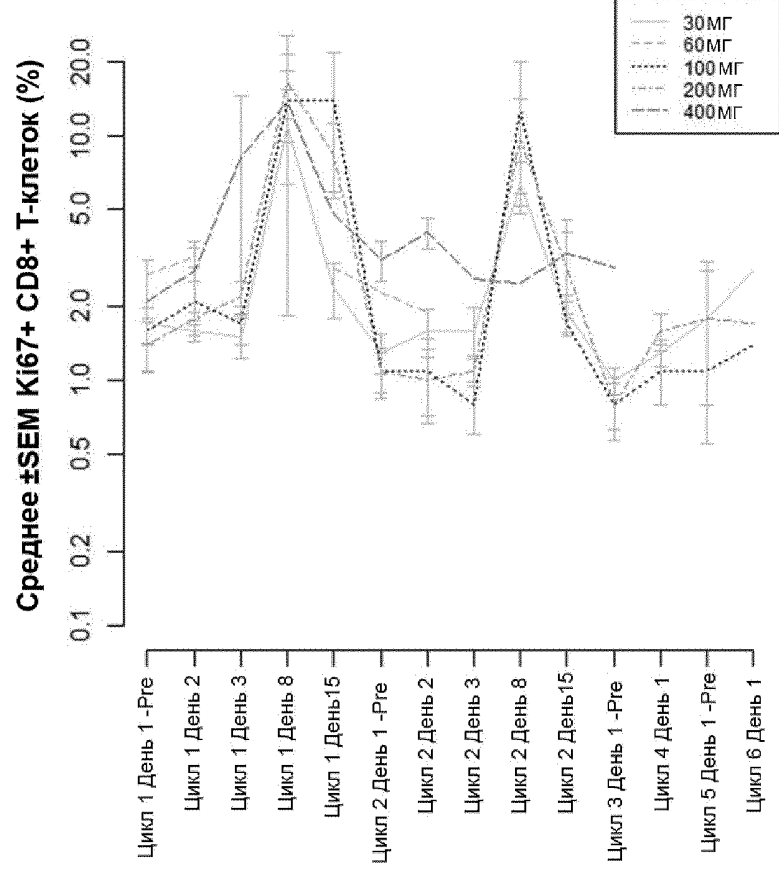
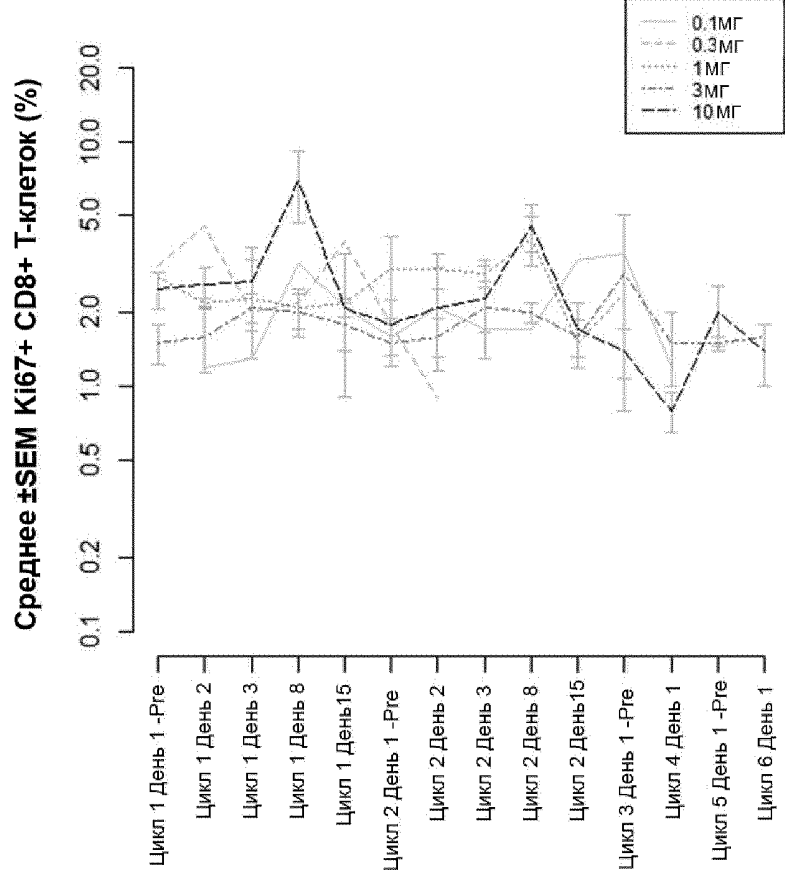
**Фиг. 6В**



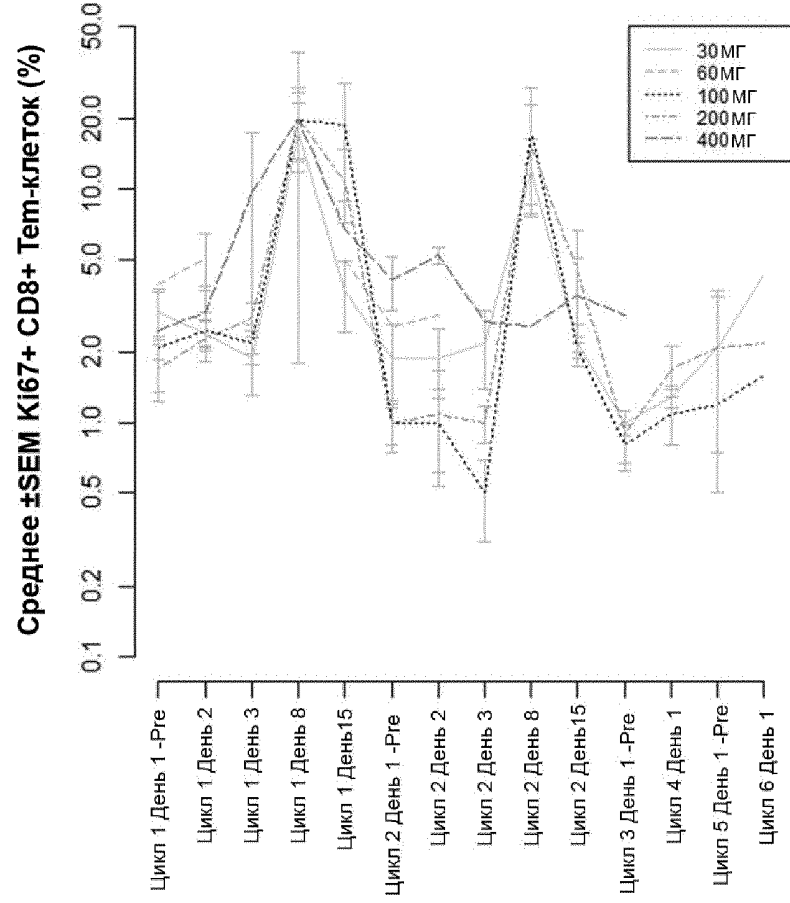
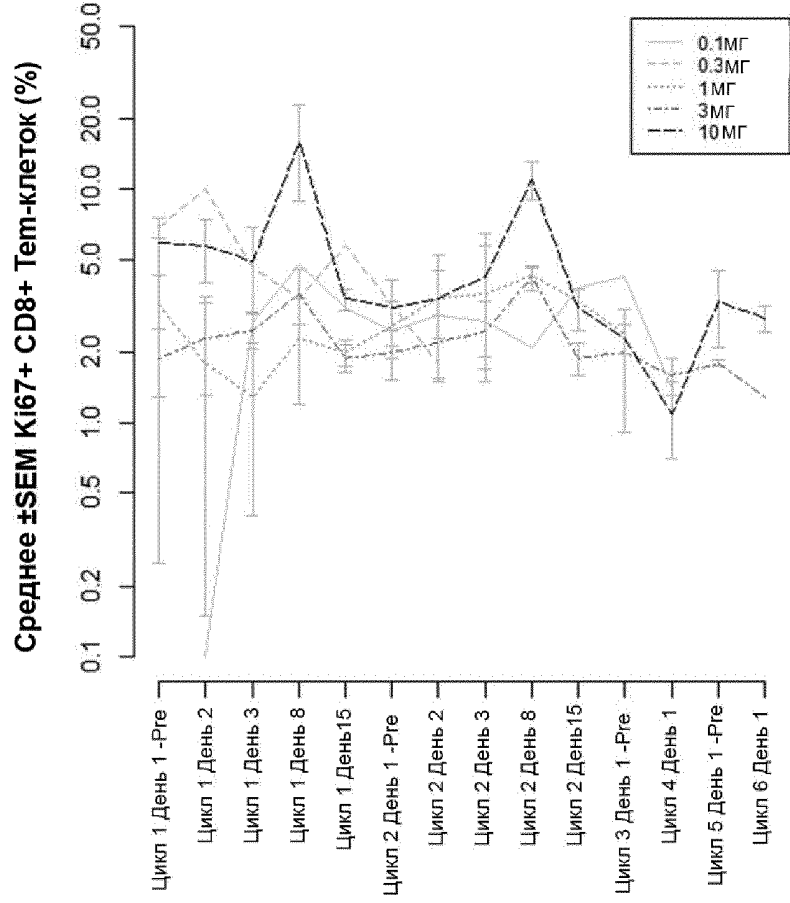




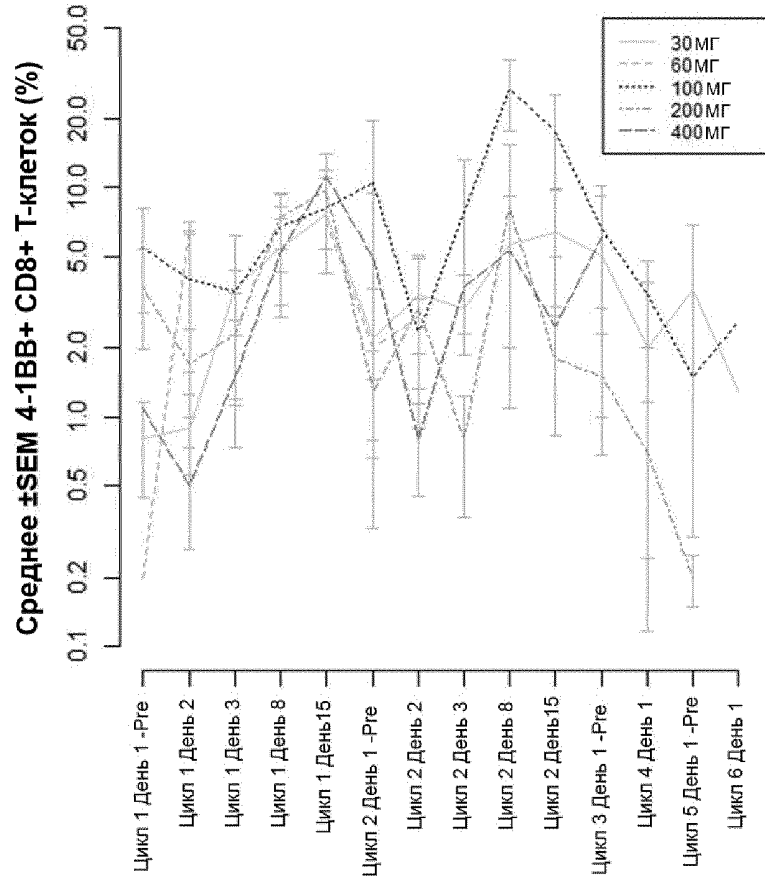
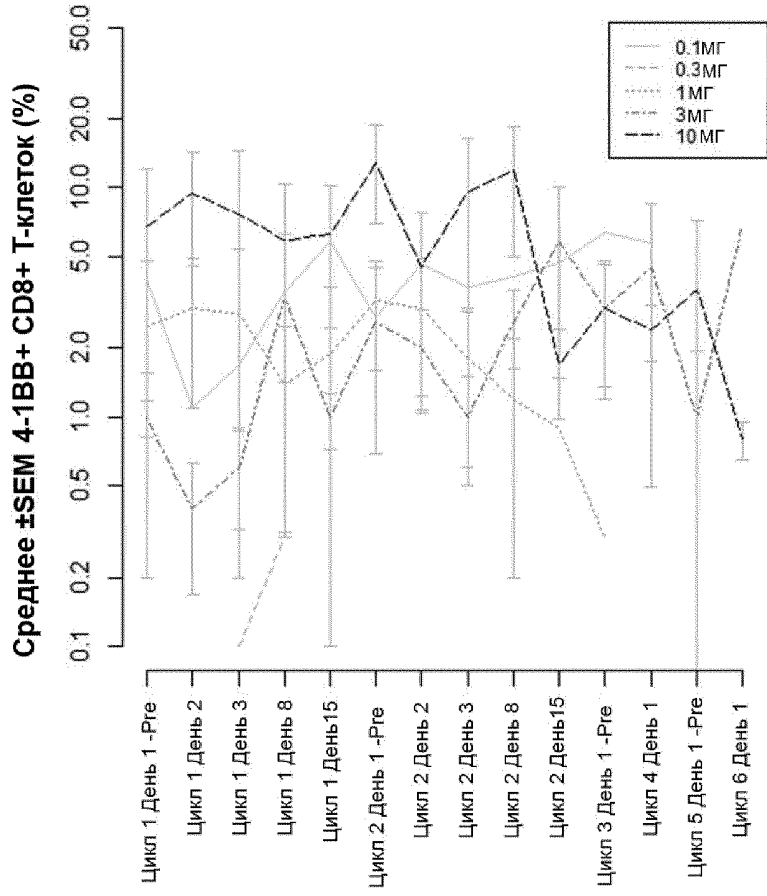
Фиг. 7



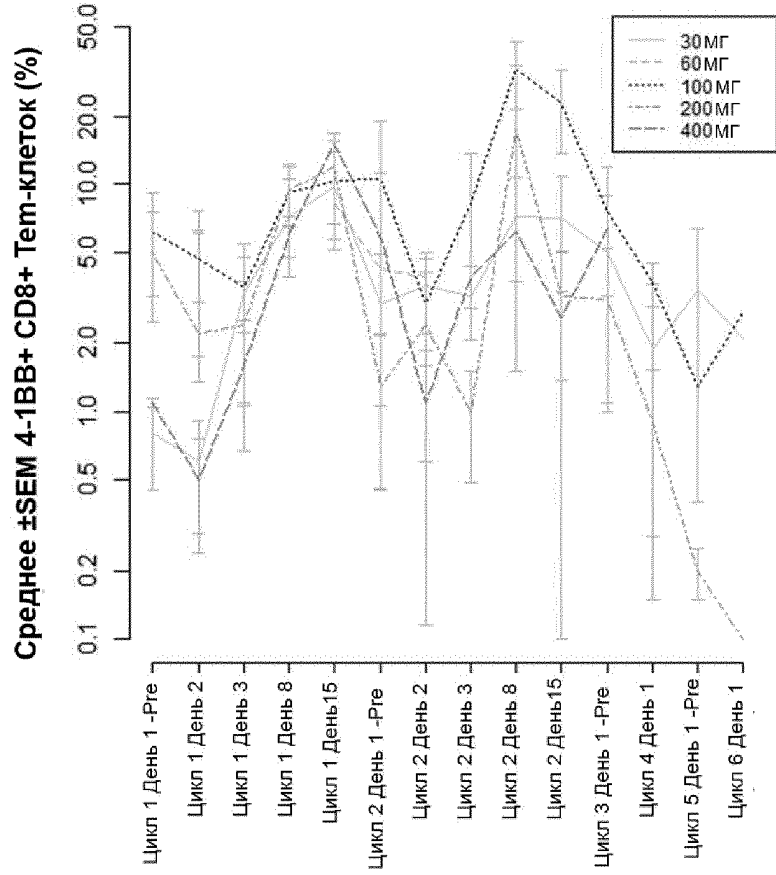
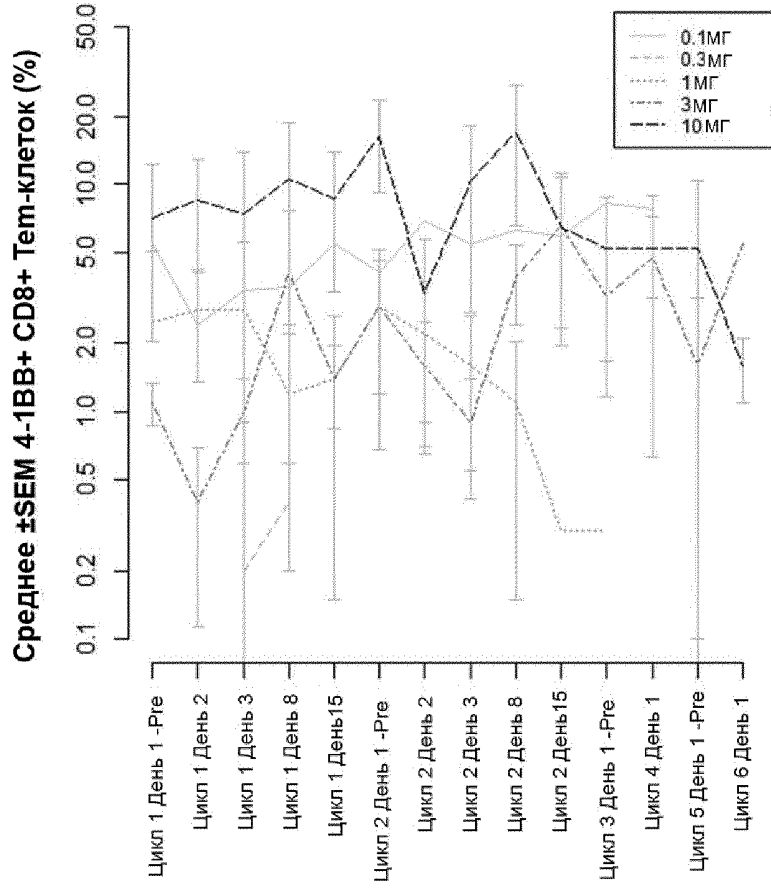
Фиг. 8А



Фиг. 8В



Фиг. 9А



Фиг. 9В