

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046634**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.01

(21) Номер заявки
202092606

(22) Дата подачи заявки
2019.07.31

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **НОВЫЙ СЛИТЫЙ БЕЛОК, СПЕЦИФИЧНЫЙ К CD137 И PD-L1**(31) **18186445.5; 18204548.4**(32) **2018.07.31; 2018.11.06**(33) **EP**(43) **2021.05.14**(86) **PCT/EP2019/070596**(87) **WO 2020/025659 2020.02.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ПИРИС ФАРМАСЬЮТИКАЛС
ГМБХ (DE); ЛЕ ЛАБОРАТУАР
СЕРВЬЕ (FR)**

(72) Изобретатель:
**Павлиду Марина (DE), Паттарини
Лючия, Шолер-Даирель Аликс (FR),
Роте Кристина, Олвилл Шейн, Бель
Айба Рашида, Хиннер Марлон, Пепер
Жанет (DE)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Путинцев
А.И., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)**

(56) WO-A2-2017123650
WO-A1-2017215590
MARLON J. HINNER ET AL: "Abstract B023:
Costimulatory T-cell engagement via a novel bispecific anti-
CD137 /anti-HER2 protein based on Anticalin technology",

CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH, vol. 4, no. 1, 1
January 2016 (2016-01-01) , page B023, XP055634176,
abstract

-& Marlon J Hinner ET AL: "Costimulatory
T cell engagement via a novel bispecific anti-CD137/
anti-HER2 protein based on Anticalin ? technology",
18 September 2015 (2015-09-18), XP055250958,
DOI: 10.1158/2326-6074.CRICIMTEATIAACR15-B023
Retrieved from the Internet: URL: http://c.eqcdn.com/p/ierisag/db/164/1975/pdf/150914_CRI_Poster_postFinal.pdf
[retrieved on 2016-02-17] Poster: abstract, figures

WO-A1-2018087108

WO-A1-2016184882

WO-A1-2016177762

EP-A1-3309177

WO-A2-2015104406

WO-A1-2019042153

JOHN-PAUL SILVA ET AL: "The S228P
Mutation Prevents in Vivo and in Vitro IgG4 Fab-
arm Exchange as Demonstrated using a Combination of
Novel Quantitative Immunoassays and Physiological Matrix
Preparation", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,
vol. 290, no. 9, 27 February 2015 (2015-02-27),
pages 5462-5469, XP055299482, ISSN: 0021-9258, DOI:
10.1074/jbc.M114.600973 cited in the application abstract,
figures

WOLFGANG GLAESNER ET AL: "Engineering
and characterization of the long-acting glucagon-
like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion
protein", DIABETES/METABOLISM RESEARCH AND
REVIEWS, vol. 26, no. 4, 30 April 2010 (2010-04-30),
pages 287-296, XP055181624, ISSN: 1520-7552, DOI:
10.1002/dmrr.1080 cited in the application page 290, right-
hand col.

(57) В изобретении предложены слитые белки, специфичные как к CD137, так и к PD-L1, которые можно применять для костимуляции активации лимфоцитов зависимым от мишени PD-L1 образом. Такие слитые белки могут найти множество применений в фармацевтике, например, в качестве противораковых препаратов и/или иммуномодуляторов для лечения или предупреждения заболеваний человека, таких как различные опухоли. Настоящее изобретение также относится к способам получения слитых белков, описанных в настоящем документе, а также к композициям, содержащим такие слитые белки. Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим такие слитые белки, и к способам получения таких слитых белков и молекул нуклеиновых кислот. Кроме того, в изобретении раскрыты терапевтические и/или диагностические применения таких слитых белков, а также композиций, содержащих один или более таких слитых белков.

B1**046634****046634****B1**

I. Уровень техники

Лиганд программируемой клеточной смерти 1 или PD-L1 (также известный как кластер дифференцировки 274 или CD274 и B7 гомолог 1 или B7-H1) представляет собой однопроходный мембранный белок I типа, принадлежащий к семейству B7 костимулирующих/коингибиторных молекул презентации антигенов. Внеклеточная часть PD-L1 содержит два домена, N-концевой IgV-подобный домен и IgC-подобный домен. PD-L1 имеет короткий цитоплазматический домен без какого-либо очевидного мотива сигнальной трансдукции, вследствие чего возникло первоначальное убеждение, что PD-L1 как рецептору не присуща передача сигналов. Однако последние данные показывают, что цитоплазматический домен PD-L1 содержит неклассические консервативные мотивы сигнальной трансдукции, способные ингибировать трансдукцию интерферона (IFN) и защищать раковые клетки от цитотоксичности IFN (Gato-Canas et al., Cell Rep, 2017).

PD-L1 играет ключевую роль в подавлении иммунной системы во время беременности, хронических инфекций, тканевой аллотрансплантации, аутоиммунных заболеваний и рака. PD-L1 экспрессируется на различных типах клеток, включая В-клетки, Т-клетки, макрофаги, миелоидные дендритные клетки, тучные клетки, эпителиальные клетки и клетки эндотелия сосудов. Он также экспрессируется при нескольких типах рака, включая, помимо прочего, меланому, рак легкого, мочевого пузыря, ободочной кишки и молочной железы. Высокие уровни экспрессии PD-L1 сопряжены с повышенной агрессивностью опухоли, опосредуя истощение и анергию опухоль-инфильтрирующих Т-клеток, секрецию иммуносупрессивных цитокинов и защиту от лизиса цитотоксическими Т-клетками.

PD-L1 представляет собой лиганд белка программируемой клеточной смерти 1 (PD-1) - ключевого ингибирующего рецептора иммунной контрольной точки, который в основном экспрессируется на активированных Т-клетках, но также и на других клетках иммунной системы, в том числе В-клетках и моноцитах. PD-1 является членом семейства иммуноглобулинов, содержащим IgV-подобный внеклеточный домен, трансмембранный домен и цитоплазматический хвост с ИТМ (иммунорецепторным ингибирующим мотивом на основе тирозина) и ITSM (иммунорецепторным мотивом переключения на основе тирозина). Связывание PD-1 с PD-L1 приводит к привлечению тирозинфосфатаз 1 и 2, содержащих домен гомологии 2 с Src (SHP 1 и 2), во внутриклеточные мотивы переключения PD-1, и к экспрессии убиквитинлигаз E3 семейства CBL. Затем эти убиквитинлигазы убиквитинируют и инактивируют ключевые медиаторы сигнальной трансдукции TCR, что приводит к удалению TCR с клеточной поверхности (Kawacz et al., EMBO Mol Med, 2011). Фосфатазы SHP 1 и SHP 2 ингибируют передачу сигналов TCR напрямую, прекращая фосфорилирование ZAP70 и PI3K. Кроме того, PD-1, связанный посредством PD-L1, может вызывать ингибирование сигнальных путей TCR, влияя на экспрессию и активность CK2 и циклинзависимых киназ (CDK) (Arasanz et al., Oncotarget, 2017). Также было показано, что связывание PD-1 приводит к перепрограммированию метаболизма Т-клеток от повышенного гликолиза, который необходим для выработки энергии для эффекторных функций, до β -окисления жирных кислот, которое связано с долгоживущими клетками. Это также может объяснить выживание и персистенцию клеток с высоким уровнем экспрессии PD-1 у пациентов с хроническими инфекциями и раком (Patsoukis et al., Nat Commun, 2015).

Блокирование взаимодействия PD-1/PD-L1 агентами, нацеленными против PD-1 или против PD-L1, может обратить вспять функцию иммунных контрольных точек и ослабить торможение Т-клеточных ответов. В настоящее время для лечения рака одобрены три антитела к PD-L1: атезолизумаб (TECENTRIQ, MPDL3280A, RG7466), авелумаб (BAVENCIO, MSB0010718C) и дурвалумаб (IMFINZI, MEDI4736). Несколько успешных клинических исследований этих антител показали высокую частоту объективного ответа, устойчивость ответа или улучшение показателей выживаемости при раке мочевого пузыря, раке кожи и раке легкого (Xu-Monette et al., Front Immunol, 2017).

Кластер дифференцировки 137 или CD137 (также известный как 4-1BB или TNFRS9) является костимулирующим иммунным рецептором и членом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR). Он главным образом экспрессируется на активированных CD4+ и CD8+ Т-клетках, активированных В-клетках и естественных киллерах (NK), но также может быть обнаружен на покоящихся моноцитах и дендритных клетках (Li and Liu, Clin Pharmacol, 2013) или эндотелиальных клетках (Snell et al., Immunol Rev, 2011). CD137 играет важную роль в регуляции иммунного ответа и, таким образом, является мишенью для иммунотерапии рака. Лиганд CD137 (CD137L) является единственным известным природным лигандом CD137 и конститутивно экспрессируется на нескольких типах антигенпрезентирующих клеток, таких как активированные В-клетки, моноциты и дендритные клетки селезенки, и может быть индуцирован на Т-лимфоцитах.

CD137L представляет собой тримерный белок, который существует в виде мембраносвязанной формы и растворимого варианта. Однако, способность растворимого CD137L активировать CD137, например, на CD137-экспрессирующих лимфоцитах, ограничена, и чтобы вызвать эффект, необходимы большие концентрации (Wyzgol et al., J Immunol, 2009). Естественный путь активации CD137 - взаимодействие CD137-положительной клетки с CD137L-положительной клеткой. Полагают, что затем активация CD137 индуцируется кластеризацией посредством CD137L на противоположной клетке, что приводит к сигнализации с помощью TRAF1, 2 и 3 (Yao et al., Nat Rev Drug Discov, 2013, Snell et al., Immunol

Rev, 2011) и дальнейшим сопутствующим нисходящим эффектам в CD137-положительной Т-клетке. В случае Т-клеток, активируемых распознаванием их соответствующих родственных мишеней, эффекты, вызываемые стимуляцией CD137, представляют собой дальнейшую усиленную активацию, увеличенную выживаемость и пролиферацию, продукцию провоспалительных цитокинов и улучшенную способность к уничтожению.

Преимущества стимуляции CD137 для уничтожения раковых клеток были продемонстрированы на ряде моделей *in vivo*. Например, принудительная экспрессия CD137L на опухоли приводит к отторжению опухоли (Melero et al., *Eur J Immunol*, 1998). Точно так же, принудительная экспрессия анти-CD137 ScFv на опухоли приводит к зависимому от CD4⁺ Т-клеток и NK-клеток устранению опухоли (Yang et al., *Cancer Res*, 2007, Zhang et al., *Mol Cancer Ther*, 2006, Ye et al., *Nat Med*, 2002). Было показано, что системно вводимое антитело к CD137 приводит к замедлению роста опухоли (Martinet et al., *Gene Ther*, 2002).

Было показано, что CD137 является отличным маркером для естественных опухоль-реактивных Т-клеток в опухолях человека (Ye et al., *Clin Cancer Res*, 2014), и что анти-CD137 антитела могут быть использованы для улучшения экспансии и активности CD8⁺ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов меланомы для применения в адоптивной Т-клеточной терапии (Chacon et al., *PLoS One*, 2013).

Доклиническая демонстрация потенциальной терапевтической эффективности стимуляции CD137 стимулировала разработку терапевтических антител, нацеленных на CD137, включая BMS-663513 (описано в патенте США № 7,288,638) и PF-05082566 (Fisher et al., *Cancer Immunol Immunother*, 2012).

В настоящем описании предложены, среди прочего, новые подходы для одновременного связывания CD137 и PD-L1 с помощью одного или более слитых белков, обладающих свойствами специфичности связывания с CD137 и специфичности связывания с PD-L1.

II. Определения

В следующем списке определены термины, фразы и сокращения, используемые в настоящем описании. Все термины, перечисленные и определенные в настоящем документе, охватывают все грамматические формы.

В контексте настоящего документа, если не указано иное, "CD137" означает человеческий CD137 (huCD137). Человеческий CD137 означает полноразмерный белок, определенный UniProt Q07011, его фрагмент или вариант. CD137 также известен как 4-1BB, член 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFRSF9), и индуцируемый активацией лимфоцитов (ILA). В некоторых частных вариантах осуществления используется CD137 отличного от человека вида, например, CD137 яванского макака и мышинный CD137.

В контексте настоящего документа, если не указано иное, "лиганд программируемой клеточной смерти 1" или "PD-L1" означает человеческий PD-L1 (huPD-L1). Человеческий PD-L1 означает полноразмерный белок, определенный UniProt Q9NZQ7, его фрагмент или вариант. Человеческий PD-L1 кодируется геном CD274. PD-L1 также известен как кластер дифференцировки 274 (CD274) или гомолог B7 1-го типа (B7-H1). В некоторых частных вариантах осуществления используется PD-L1 отличного от человека вида, например, PD-L1 яванского макака и мышинный PD-L1.

В контексте настоящего документа "аффинность связывания" описывает способность биомолекулы (например, полипептида или белка) согласно изобретению (например, мутеина липокалина, антитела, слитого белка или любого другого пептида или белка) к связыванию определенной мишени и образованию комплекса. Аффинность связывания измеряют с помощью ряда методов, известных специалистам в данной области техники, включая, не ограничиваясь перечисленным, флуоресцентное титрование, анализы на основе твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), в том числе прямого и конкурентного ELISA, калориметрические методы, например, изотермическая титрационная калориметрия (ИТК), и поверхностный плазмонный резонанс (SPR). Эти методы хорошо известны в данной области техники, и некоторые примеры таких методов дополнительно описаны в настоящем документе. Аффинность связывания, таким образом, выражают значением константы диссоциации (K_D), полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) или концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}), измеренного с использованием таких методов. Более низкое значение K_D , EC_{50} или IC_{50} отражают лучшую (более высокую) связывающую способность (аффинность). Соответственно, аффинность связывания двух биомолекул с определенной мишенью может быть измерена и сопоставлена. При сравнении аффинностей связывания двух биомолекул с определенной мишенью термин "приблизительно такая же", "по существу такая же" или "по существу аналогичная" означает, что один биомолекула имеет аффинность связывания, выраженную значением K_D , EC_{50} или IC_{50} , идентичным или схожим с другой молекулой в пределах варибельности результатов эксперимента по измерению аффинности связывания. Варибельность результатов эксперимента по измерению аффинности связывания зависит от конкретного используемого метода и известна специалистам в данной области техники.

В контексте настоящего документа термин "по существу" может также относиться к качественному условию демонстрации полной или почти полной степени или величины характеристики или свойства, представляющего интерес. Специалисту в области биологии будет ясно, что биологические и химиче-

ские явления редко, если вообще когда-либо, доходят до завершения и/или протекают до завершения, или достигают или избегают абсолютного результата. Таким образом, термин "по существу" используется в настоящем документе для обозначения потенциального отсутствия полноты, присущего многим биологическим и химическим явлениям.

В контексте настоящего документа термин "обнаруживать", "обнаружение", "обнаружимый" или "проведение обнаружения" понимается как на количественном, так и на качественном уровне, а также в их комбинации. Таким образом, он включает количественные, полуколичественные и качественные измерения, осуществленные в отношении биомолекулы согласно изобретению.

В контексте настоящего документа "обнаружимая аффинность" обычно означает, что связывающая способность между биомолекулой и ее мишенью, выраженная значением K_D , EC_{50} или IC_{50} , составляет не более чем приблизительно 10^{-5} М, или ниже. Аффинность связывания, выраженная значением K_D , EC_{50} или IC_{50} , превышающим 10^{-5} М, как правило, уже не поддается измерению с помощью обычных методов, таких как ELISA и SPR, и поэтому имеет второстепенное значение.

Следует отметить, что образование комплекса между биомолекулой согласно изобретению и ее мишенью зависит от многих различных факторов, таких как концентрации соответствующей мишени, присутствие конкурентов, pH и ионная сила используемой буферной системы, экспериментальный метод, используемый для определения аффинности связывания (например, флуоресцентное титрование, конкурентный ELISA (также называемый конкурирующим ELISA) и поверхностный плазмонный резонанс), и даже математический алгоритм, используемый для оценки экспериментальных данных. Следовательно, специалисту ясно, что аффинность связывания, выраженная значением K_D , EC_{50} или IC_{50} , может варьироваться в пределах определенного экспериментального диапазона, в зависимости от используемого метода и условий эксперимента. Это означает, что может иметь место небольшое отклонение измеренных значений K_D , EC_{50} или IC_{50} или диапазон допустимых значений в зависимости, например, от того, были ли такие значения определены с помощью ELISA (включая прямой или конкурентный ELISA), SPR, или другим методом.

В контексте настоящего документа термины "специфичный к", "специфичное связывание", "специфически связывать" или "специфичность связывания" относятся к способности биомолекулы различать желаемую мишень (например, CD137 и PD-L1) и одну или более референсных мишеней (например, клеточный рецептор липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов). Подразумевается, что такая специфичность является не абсолютным, а относительным свойством и может быть определена, например, согласно SPR, вестерн-блоттингу, ELISA, флуоресцентно-активированной сортировке клеток (FACS), радиоиммуноанализу (RIA), электрохемилюминесценции (ECL), иммунорадиометрическому анализу (IRMA), иммуногистохимии (ИНС) и пептидному сканированию.

При использовании в настоящем документе в контексте слитого белка согласно настоящему изобретению, который связывается с CD137 и PD-L1, термин "специфичный к", "специфическое связывание", "специфически связывать" или "специфичность связывания" означает, что слитый белок связывается, реагирует с или направлен против CD137 и PD-L1, как описано в настоящем документе, но по существу не связывает другой белок. Термин "другой белок" включает любые белки, которые не являются CD137 или PD-L1, или белками, родственными CD137 или PD-L1 или гомологичными им. Однако CD137 или PD-L1 видов, отличных от человека, и фрагменты и/или варианты CD137 или PD-L1 не исключаются термином "другой белок". Термин "по существу не связывает" означает, что слитые белки согласно настоящему изобретению связывают другой белок с более низкой аффинностью связывания, чем CD137 и/или PD-L1, т.е. проявляют перекрестную реактивность менее 30%, предпочтительно 20%, более предпочтительно 10%, особенно предпочтительно менее 9, 8, 7, 6 или 5%. Способность слитого белка специфически реагировать, как определено выше в настоящем документе, может быть легко проверена, среди прочего, путем сравнения реакции слитого белка согласно настоящему изобретению с CD137 и/или PD-L1 и реакции указанного слитого белка с другим белком(ами).

В контексте настоящего документа термин "липокалин" относится к мономерному белку массой приблизительно 18-20 кДа, имеющему супервторичную структурную область цилиндрического β -складчатого листа, содержащую множество β -цепей (предпочтительно восемь β -цепей, обозначенных как A-H), соединенных попарно множеством петель (предпочтительно четыре) на одном конце, содержащих, таким образом, лиганд-связывающий карман и образующих вход в лиганд-связывающий карман. Предпочтительно петли, содержащие лиганд-связывающий карман, используемые в настоящем изобретении, представляют собой петли, соединяющие открытые концы β -цепей A и B, C и D, E и F, и G и H, и обозначенные как петли AB, CD, EF и GH. Точно установлено, что разнообразие указанных петель в составе в остальном жесткого каркаса липокалина приводит к возникновению различных механизмов связывания у членов семейства липокалинов, каждый из которых способен вмещать мишени различных размеров, формы и химического характера (обзор приведен, например, в Skerra, *Biochim Biophys Acta*, 2000, Flower et al., *Biochim Biophys Acta*, 2000, Flower, *Biochem J*, 1996). Согласно имеющимся сведениям семейство белков липокалинов естественным образом эволюционировало, чтобы связывать широкий спектр лигандов, характеризуясь необычно низкими уровнями общей консервативности последователь-

ностей (часто с идентичностью последовательностей менее 20%), но сохраняя при этом высококонсервативный общий характер фолдинга. Соответствие между положениями в различных липокалинах также хорошо известно специалистам в данной области техники (см., например, патент США № 7,250,297). Белки, попадающие под определение "липокалин" в контексте настоящего документа, включают, не ограничиваясь перечисленным, человеческие липокалины, включая липокалин слёзной жидкости (Lc, Lcn1), липокалин-2 (Lcn2) или липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов (NGAL), аполипопротеин D (ApoD), аполипопротеин M, α_1 -кислый гликопротеин 1, α_1 -кислый гликопротеин 2, α_1 -микроглобулин, компонент комплемента $\delta\gamma$, ретинол-связывающий белок (RBP), эпидидимальный белок, связывающий ретиноевую кислоту, гликоделин, одорант-связывающий белок Па, одорант-связывающий белок Пб, липокалин-15 (Lcn15) и простагландин D-синтазу.

В контексте настоящего документа, если не указано иное, "липокалин слёзной жидкости" относится к человеческому липокалину слёзной жидкости (hTIC) и также относится к зрелому человеческому липокалину слёзной жидкости. Термин "зрелый", при использовании для характеристики белка, означает белок, по существу не содержащий сигнального пептида. "Зрелый hTIC" в настоящем изобретении относится к зрелой форме человеческого липокалина слёзной жидкости, не содержащей сигнального пептида. Зрелый hTIC описывается остатками 19-176 последовательности, депонированной в банке данных SWISS-PROT под регистрационным номером P31025, и его аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 1.

В контексте настоящего документа "липокалин-2" или "липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов" относится к человеческому липокалину-2 (hLcn2) или человеческому липокалину, ассоциированному с желатиназой нейтрофилов (hNGAL), и также относится к зрелому человеческому липокалину-2 или зрелому человеческому липокалину, ассоциированному с желатиназой нейтрофилов. Термин "зрелый", при использовании для характеристики белка, означает белок, по существу не содержащий сигнального пептида. "Зрелый hNGAL" в настоящем изобретении относится к зрелой форме человеческого липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов, не содержащей сигнального пептида. Зрелый hNGAL описывается остатками 21-198 последовательности, депонированной в банке данных SWISS-PROT под регистрационным номером P80188, и его аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 2.

В контексте настоящего документа "нативная последовательность" относится к белку или полипептиду, имеющему последовательность, которая встречается в природе, или имеющему последовательность дикого типа, независимо от способа его получения. Такой белок или полипептид с нативной последовательностью может быть выделен из природных источников или может быть получен с помощью других средств, например, рекомбинантными или синтетическими методами.

"Липокалин с нативной последовательностью" относится к липокалину, имеющему ту же аминокислотную последовательность, что и соответствующий полипептид природного происхождения. Таким образом, липокалин с нативной последовательностью может иметь аминокислотную последовательность соответствующего природного липокалина (дикого типа) из любого организма, в частности, млекопитающего. Термин "нативная последовательность" применительно к липокалину, в частности, охватывает природные укороченные или секретируемые формы липокалина, природные варианты формы, такие как альтернативно сплайсированные формы, и природные аллельные варианты липокалина. Термины "липокалин с нативной последовательностью" и "липокалин дикого типа" используются в настоящем документе взаимозаменяемо.

В контексте настоящего документа "мутеин", "мутированный" фрагмент (будь то фрагмент белка или нуклеиновой кислоты) или "мутант" относится к обмену, делеции или вставке одной или нескольких аминокислот или нуклеотидов по сравнению с природным белком или нуклеиновой кислотой (дикого типа). Указанный термин также включает фрагменты мутеина, как описано в настоящем документе. Настоящее изобретение явным образом охватывает мутеины липокалина, как описано в настоящем документе, имеющие супервторичную структурную область цилиндрического β -складчатого листа, содержащую восемь β -цепей, соединенных попарно четырьмя петлями на одном конце, содержащими, таким образом, лиганд-связывающий карман и образующими вход в лиганд-связывающий карман, где по меньшей мере одна аминокислота каждой из по меньшей мере трех из четырех указанных петель была мутирована по сравнению с липокалином с нативной последовательностью. Мутеины липокалина согласно настоящему изобретению предпочтительно обладают функцией связывания CD137, как описано в настоящем документе.

В контексте настоящего документа термин "фрагмент" применительно к мутеинам липокалина согласно изобретению относится к белкам или полипептидам, полученным из полноразмерного зрелого hTIC или hNGAL, или мутеинам липокалина, усеченным с N-конца и/или C-конца, т.е. лишенным по меньшей мере одной из N-концевых и/или C-концевых аминокислот. Такие фрагменты могут включать по меньшей мере 10 или более, например, 20 или 30 или более последовательно расположенных аминокислот первичной последовательности зрелого hTIC или hNGAL или мутеина липокалина, из которого они получены, и обычно являются обнаружимыми в иммуноанализе на зрелый hTIC или hNGAL. В таком

фрагменте может отсутствовать до 2, до 3, до 4, до 5, до 10, до 15, до 20, до 25 или до 30 (включая все числа между ними) N-концевых и/или C-концевых аминокислот. В качестве иллюстративного примера, в таком фрагменте может отсутствовать одна, две, три или четыре N-концевые (His-His-Leu-Leu) и/или одна или две C-концевые аминокислоты (Ser-Asp) зрелого hTic. Подразумевается, что фрагмент предпочтительно представляет собой функциональный фрагмент зрелого hTic или hNGAL или мутеина липокалина, из которого он получен, что означает, что он предпочтительно сохраняет специфичность связывания, предпочтительно с CD137, зрелых hTic/hNGAL или мутеина липокалина, из которого он получен. В качестве иллюстративного примера такой функциональный фрагмент может содержать по меньшей мере аминокислоты в положениях 5-153, 5-150, 9-148, 12-140, 20-135 или 26-133, соответствующих линейной полипептидной последовательности зрелого hTic. В качестве еще одного иллюстративного примера такой функциональный фрагмент может содержать по меньшей мере аминокислоты в положениях 13-157, 15-150, 18-141, 20-134, 25-134 или 28-134, соответствующих линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL.

"Фрагмент" применительно к соответствующей мишени CD137 или PD-L1 слитого белка согласно изобретению относится к усеченному с N-конца и/или C-конца CD137 или PD-L1, или белковым доменам CD137 или PD-L1. Фрагменты CD137 или фрагменты PD-L1, как описано в настоящем документе, сохраняют способность полноразмерного CD137 или PD-L1 распознаваться и/или быть связанным слитым белком согласно изобретению. В качестве иллюстративного примера фрагмент может представлять собой внеклеточный домен CD137 или PD-L1. В качестве иллюстративного примера такой внеклеточный домен может содержать аминокислоты внеклеточных субдоменов CD137, такие как отдельные или комбинированные аминокислотные последовательности домена 1 (остатки 24-45 UniProt Q07011), домена 2 (остатки 46-86), домена 3 (87-118) и домена 4 (остатки 119-159). В качестве еще одного иллюстративного примера такой внеклеточный домен может содержать аминокислотные остатки 19-238 UniProt Q9NZQ7.

В контексте настоящего документа термин "вариант" относится к производным белка или полипептида, которые включают мутации, например, путем замен, делеций, вставок и/или химических модификаций аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления такие мутации и/или химические модификации не снижают функциональность белка или пептида. Такие замены могут быть консервативными, т.е. аминокислотный остаток может быть заменен химически схожим аминокислотным остатком. Примерами консервативных замен являются замены среди членов следующих групп: 1) аланин, серин, треонин и валин; 2) аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, глутамин, аспарагин и гистидин; 3) аргинин, лизин, глутамин, аспарагин и гистидин; 4) изолейцин, лейцин, метионин, валин, аланин, фенилаланин, треонин и пролин; и 5) изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, тирозин и триптофан. Такие варианты включают белки или полипептиды, в которых одна или более аминокислот были заменены их соответствующими D-стереоизомерами или аминокислотами, отличными от 20 природных аминокислот, такими как, например, орнитин, гидроксипролин, цитруллин, гомосерин, гидроксизин, норвалин. Такие варианты также включают, например, белки или полипептиды, в которых добавлены или удалены один или более аминокислотных остатков на N- и/или C-конце. Как правило, вариант обладает по меньшей мере приблизительно 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95% или по меньшей мере приблизительно 98% идентичностью аминокислотной последовательности с белком или полипептидом с нативной последовательностью. Вариант предпочтительно сохраняет биологическую активность, например связывание той же мишенью, белка или полипептида, из которого он получен.

Термин "вариант" в контексте настоящего документа применительно к соответствующему белку лиганда CD137 или PD-L1 слитого белка согласно изобретению относится к CD137 или PD-L1 или его фрагменту, соответственно, имеющему одну или более, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или более замен, делеций и/или вставок аминокислот по сравнению с нативной последовательностью CD137 или PD-L1 (CD137 или PD-L1 дикого типа), например, CD137, депонированным как UniProt Q07011, или PD-L1, депонированным как UniProt Q9NZQ7, как описано в настоящем документе. Вариант CD137 или вариант PD-L1, соответственно, предпочтительно обладает по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичностью аминокислотной последовательности CD137 или PD-L1 дикого типа. Вариант CD137 или вариант PD-L1, как описано в настоящем документе, сохраняет способность связывать слитые белки, специфичные к CD137 и PD-L1, раскрытые в настоящем изобретении.

Термин "вариант", используемый в настоящем документе применительно к мутеину липокалина, относится к мутеину липокалина или его фрагменту согласно изобретению, где последовательность имеет мутации, включая замены, делеции и вставки, и/или химические модификации. Описанный в настоящем документе вариант мутеина липокалина сохраняет биологическую активность, например, связывание с CD137, мутеина липокалина, из которого он получен. Как правило, вариант мутеина липокалина обладает по меньшей мере приблизительно 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 98% идентичностью аминокислотной последовательности с мутеином липокалина, из которого он получен.

В контексте настоящего документа термин "мутагенез" относится к введению мутаций в полинуклеотидную или аминокислотную последовательность. Мутации предпочтительно вводят в таких экспе-

риментальных условиях, что природная аминокислота в данном положении последовательности белка или полипептида может быть изменена, например, заменена, по меньшей мере одной аминокислотой. Термин "мутагенез" также включает (дополнительную) модификацию длины сегментов последовательности путем делеции или вставки одной или более аминокислот. Таким образом, в рамках изобретения, например, одна аминокислота в выбранном положении последовательности может быть заменена отрезком из трех аминокислот, что приводит к добавлению двух аминокислотных остатков по сравнению с длиной соответствующего сегмента нативной аминокислотной последовательности белка или полипептида. Такая вставка или делеция могут быть введены независимо друг от друга в любой из сегментов последовательности, которые могут быть подвергнуты мутагенезу в изобретении. В одном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения вставка может быть введена в сегмент аминокислотной последовательности, соответствующий петле АВ липокалина с нативной последовательностью (см. публикацию международной патентной заявки WO 2005/019256, полностью включенную в настоящий документ посредством ссылки).

В контексте настоящего документа термин "случайный мутагенез" означает, что в определенном положении последовательности нет заранее определенной мутации (изменения аминокислоты), но что по меньшей мере две аминокислоты с определенной вероятностью могут быть включены в заранее определенное положение последовательности во время мутагенеза.

В контексте настоящего документа термин "идентичность последовательностей" или "идентичность" означает свойство последовательностей, которое является мерой их сходства или родства. Термин "идентичность последовательностей" или "идентичность" в контексте настоящего документа означает процент попарно идентичных остатков - после (гомологичного) выравнивания последовательности белка или полипептида согласно изобретению с рассматриваемой последовательностью - относительно количества остатков в более длинной из этих двух последовательностей. Идентичность последовательностей измеряют путем деления количества идентичных аминокислотных остатков на общее количество остатков и умножения результата на 100.

В контексте настоящего документа термин "гомология последовательностей" или "гомология" имеет свое обычное значение, и гомологичная аминокислота включает идентичные аминокислоты, а также аминокислоты, которые считаются консервативными заменами, в эквивалентных положениях в линейной аминокислотной последовательности белка или полипептида согласно изобретению (например, любых слитых белках или мутеинах липокалина согласно изобретению).

Специалисту известны доступные компьютерные программы, например, BLAST (Altschul et al., *Nucleic Acids Res*, 1997), BLAST2 (Altschul et al., *J Mol Biol*, 1990) и Смита-Ватермана (Smith and Waterman, *J Mol Biol*, 1981), для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей с использованием стандартных параметров. Процент гомологии последовательностей или идентичности последовательностей может, например, быть определен в настоящем документе с использованием программы BLASTP, версия 2.2.5 (16 ноября 2002 г.; (Altschul et al., *Nucleic Acids Res*, 1997). В этом варианте осуществления процент гомологии основан на выравнивании целых последовательностей белка или полипептида (матрица: BLOSUM 62; вес гэпов: 11,1; пороговое значение установлено на 10^{-3}), включая пропептидные последовательности, предпочтительно с использованием белкового каркаса дикого типа в качестве эталона при попарном сравнении. Он рассчитывается как процент числа "положительных" (гомологичных аминокислот), указанных в качестве результата в выходных данных программы BLASTP, деленный на общее количество аминокислот, выбранных программой для выравнивания.

В частности, чтобы определить, отличается ли аминокислотный остаток в аминокислотной последовательности мутеина липокалина от липокалина дикого типа, соответствующий определенному положению в аминокислотной последовательности липокалина дикого типа, специалист может использовать средства и методы, хорошо известные в данной области техники, например, выравнивания, вручную или с использованием компьютерных программ, таких как BLAST 2.0, что расшифровывается как средство поиска основного локального выравнивания, или ClustalW, или любой другой подходящей программы, которая подходит для генерации выравниваний последовательностей. Соответственно, последовательность липокалина дикого типа может служить "рассматриваемой последовательностью" или "референсной последовательностью", в то время как аминокислотная последовательность мутеина липокалина, отличная от липокалина дикого типа, описанного в настоящем документе, служит "искомой последовательностью". Термины "последовательность дикого типа", "референсная последовательность" и "рассматриваемая последовательность" используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Предпочтительной последовательностью липокалина дикого типа является последовательность hTLC, представленная в SEQ ID NO: 1, или hNGAL, представленная в SEQ ID NO: 2.

"Гэпы" представляют собой пропуски в выравнивании, которые являются результатом добавлений или делеций аминокислот. Таким образом, две копии одной и той же последовательности имеют 100% идентичность, но последовательности, которые не обладают столь высокой консервативностью и имеют делеции, добавления или замены, могут иметь более низкую степень идентичности.

В контексте настоящего документа термин "положение" означает положение либо аминокислоты в аминокислотной последовательности, показанной в настоящем документе, либо положение нуклеотида в

последовательности нуклеиновой кислоты, показанной в настоящем документе. Следует понимать, что при использовании термина "соответствует" или "соответствующий", в настоящем документе в контексте положений аминокислотной последовательности одного или более мутантов липокалина соответствующее положение определяется не только количеством предшествующих нуклеотидов или аминокислот. Соответственно, абсолютное положение данной аминокислоты согласно изобретению может варьироваться относительно соответствующего положения из-за делеций или добавлений аминокислот в других местах липокалина (мутантного или дикого типа). Аналогичным образом, абсолютное положение данного нуклеотида согласно настоящему изобретению может отличаться от соответствующего положения из-за делеций или дополнительных нуклеотидов в других местах в 5'-нетранслируемой области (UTR) мутеина липокалина или липокалина дикого типа, включая промотор и/или любые другие регуляторные последовательности или ген (включая экзоны и интроны).

"Соответствующее положение" согласно изобретению может представлять собой положение последовательности, которое совпадает с положением последовательности, которому оно соответствует при попарном или множественном выравнивании последовательностей согласно настоящему изобретению. Предпочтительно подразумевается, что для "соответствующего положения" согласно изобретению абсолютные положения нуклеотидов или аминокислот могут отличаться от соседних нуклеотидов или аминокислот, но указанные соседние нуклеотиды или аминокислоты, которые могли быть заменены, удалены, или добавлены, могут охватываться одним или более "соответствующими положениями".

Кроме того, для соответствующего положения в мутеине липокалина на основе референсной последовательности согласно изобретению предпочтительно подразумевается, что положения нуклеотидов или аминокислот мутеина липокалина могут структурно соответствовать положениям в других местах референсного липокалина (липокалина дикого типа) или другого мутеина липокалина, даже если они могут отличаться по абсолютным номерам положений, что ясно специалистам с учетом высококонсервативного общего характера фолдинга, присущего липокалинам.

Используемые здесь взаимозаменяемо, термины "конъюгат", "конъюгация", "гибридизовать", "слияние" или "связанный" относятся к соединению вместе двух или более субъединиц посредством всех форм ковалентного или нековалентного связывания, включая, помимо прочего, генетическое слияние, химическую конъюгацию, связывание с помощью линкера или сшивающего агента и нековалентную ассоциацию.

В контексте настоящего документа термин "слитый полипептид" или "слитый белок" относится к полипептиду или белку, содержащему две или более субъединиц. В некоторых вариантах осуществления слитый белок, как описано в настоящем документе, содержит две или более субъединиц, по меньшей мере одна из которых способна специфически связываться с CD137, а другая субъединица способна специфически связываться с PD-L1. Внутри слитого белка эти субъединицы могут быть связаны ковалентной или нековалентной связью. Предпочтительно, слитый белок представляет собой трансляционное слияние двух или более субъединиц. Трансляционное слияние может быть произведено путем генетической модификации кодирующей последовательности для одной субъединицы в рамках считывания с кодирующей последовательностью другой субъединицы. Обе субъединицы могут быть разделены нуклеотидной последовательностью, кодирующей линкер. Однако субъединицы слитого белка согласно настоящему изобретению также могут быть связаны посредством химической конъюгации. Субъединицы, образующие слитый белок, как правило, связаны друг с другом путем связывания С-конца одной субъединицы с N-концом другой субъединицы, или С-конца одной субъединицы с С-концом другой субъединицы, или N-конца одной субъединицы с N-концом другой субъединицы, или N-конца одной субъединицы с С-концом другой субъединицы. Субъединицы слитого белка могут быть связаны в любом порядке и могут включать более одной из любых составляющих субъединиц. Если одна или более субъединиц являются частью белка (комплекса), который состоит из более чем одной полипептидной цепи, термин "слитый белок" может также относиться к белку, содержащему слитые последовательности и все другие полипептидные цепи (цепь) белка (комплекса). В качестве иллюстративного примера, когда полноразмерный иммуноглобулин слит с мутеином липокалина посредством тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина, термин "слитый белок" может относиться к одной полипептидной цепи, содержащей мутеин липокалина и тяжелую или легкую цепь иммуноглобулина. Термин "слитый белок" может также относиться ко всему иммуноглобулину (как легкой, так и тяжелой цепям) и липокалину мутеина, слитому с одной или обеими из его тяжелой и/или легкой цепей.

В контексте настоящего документа термин "субъединица" слитого белка, описанного в настоящем документе, относится к одному белку или отдельной полипептидной цепи, которая сама по себе может образовывать стабильную свёрнутую структуру и определять уникальную функцию обеспечения связывающего мотива к мишени. В некоторых вариантах осуществления предпочтительной субъединицей согласно изобретению является мутеин липокалина. В некоторых других вариантах осуществления предпочтительной субъединицей согласно изобретению является полноразмерный иммуноглобулин или его антигенсвязывающий домен.

"Линкер", который может содержаться в слитом белке согласно настоящему изобретению, объединяет две или более субъединиц слитого белка, как описано в настоящем документе. Связь может быть

ковалентной или нековалентной. Предпочтительная ковалентная связь образована посредством пептидной связи, такой как пептидная связь между аминокислотами. Предпочтительным линкером является пептидный линкер. Соответственно, в предпочтительном варианте осуществления указанный линкер содержит одну или более аминокислот, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более аминокислот. В настоящем документе описаны предпочтительные пептидные линкеры, включая глицин-сериновые (GS) линкеры, гликозилированные GS линкеры и пролин-аланин-сериновые полимерные (PAS) линкеры. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления для соединения вместе субъединиц слитого белка используют GS линкер, представляющий собой $(G_4S)_3$, как описано в SEQ ID NO: 13. Другие предпочтительные линкеры включают химические линкеры.

В контексте настоящего документа термин "альбумин" включает все альбумины млекопитающих, такие как человеческий сывороточный альбумин, или бычий сывороточный альбумин, или крысиный сывороточный альбумин.

В контексте настоящего документа термин "органическая молекула" или "малая органическая молекула" обозначает органическую молекулу, содержащую по меньшей мере два атома углерода, но предпочтительно не более 7 или 12 вращающихся углеродных связей, имеющую молекулярную массу в диапазоне от 100 до 2000 дальтон, предпочтительно от 100 до 1000 дальтон, и необязательно включающую один или два атома металла.

"Образец" определен как биологический образец, взятый у любого субъекта. Биологические образцы включают, не ограничиваясь перечисленным, кровь, сыворотку, мочу, фекалии, сперму или ткань, включая опухолевую ткань.

"Субъект" представляет собой позвоночное животное, предпочтительно млекопитающее, более предпочтительно человека. Термин "млекопитающее" используется в настоящем документе для обозначения любого животного, классифицируемого как млекопитающее, включая, не ограничиваясь перечисленным, например, людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных из зоопарков, животных для спорта или домашних питомцев, таких как овцы, собаки, лошади, кошки, коровы, крысы, свиньи, обезьяны, такие как яванские макаки. Предпочтительно "млекопитающее" в контексте настоящего документа представляет собой человека.

"Эффективное количество" представляет собой количество, достаточное для получения полезных или желаемых результатов. Эффективное количество можно вводить за одно или несколько отдельных введений или доз.

В контексте настоящего документа "антитело" включает целые антитела или любой их антигенсвязывающий фрагмент (т.е. "антигенсвязывающую часть") или одну их цепь. Целое антитело относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC), соединенные дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельного домена тяжелой цепи (V_H или HCVR) и константной области тяжелой цепи (C_H). Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь состоит из варибельного домена легкой цепи (V_L или LCVR) и константной области легкой цепи (C_L). Константная область легкой цепи состоит из одного домена, C_L . Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гиперварибельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных в следующем порядке от аминоконца к карбоксиконцу: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Варибельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном (например, PD-L1). Константные области антител могут необязательно опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент ($C1q$) классической системы комплемента.

В контексте настоящего документа "антигенсвязывающий фрагмент" антитела относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, PD-L1). Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающий фрагмент" антитела, включают (i) фрагмент Fab, состоящий из доменов V_H , V_L , C_L и C_{H1} ; (ii) фрагмент $F(ab')_2$, содержащий два фрагмента Fab, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fab', состоящий из доменов V_H , V_L , C_L и C_{H1} и области между доменами C_{H1} и C_{H2} ; (iv) фрагмент Fd, состоящий из доменов V_H и C_{H1} ; (v) одноцепочечный фрагмент Fv, состоящий из доменов V_H и V_L одного плеча антитела, (vi) фрагмент dAb (Ward et al., Nature, 1989), состоящий из домена V_H ; и (vii) выделенную определяющую комплементарность область (CDR) или комбинацию двух или более выделенных CDR, которые необязательно могут быть соединены синтетическим линкером; (VIII) "диатело", содержащее V_H и V_L , соединенные в одной и той же полипептидной цепи с помощью короткого линкера (см., например, патентные документы EP 404,097; WO 93/11161; и Holliger et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1993); (ix) "фрагмент доменного антитела", содержащий только V_H или V_L , где в некоторых случаях ковалентно соединены две или более областей V_H .

Антитела могут быть поликлональными или моноклональными;

ксеногенными, аллогенными или сингенными; или их модифицированными формами (например, гуманизированными, химерными или полиспецифическими). Антитела также могут быть полностью человеческими.

В контексте настоящего документа "каркас" или "FR" относится к остаткам варибельного домена, отличным от остатков гиперварибельной области (CDR).

"Область кристаллизующегося фрагмента" или "Fc-область" относится к C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая Fc-области с нативной последовательностью и варианты области Fc. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG обычно определена как лежащая от аминокислотного остатка в положении Cys226, или от Pro230, до его карбоксильного конца, где нумерация соответствует индексу EU Кабат (Johnson and Wu, *Nucleic Acids Res*, 2000). C-концевой лизин (остаток 447 согласно индексу EU Кабат) Fc-области может быть удален, например, во время продуцирования или очистки антитела или путем генетической модификации нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Соответственно, композиция интактных антител может включать популяции антител с полностью удаленными остатками K447, популяции антител, в которых не удалены остатки K447, и популяции антител, содержащие смесь антител с остатком K447 и без него. Подходящие Fc-области с нативной последовательностью для применения в антителах согласно изобретению включают человеческий IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 и IgG4.

"Fc-рецептор" или "FcR" относится к рецептору, который связывается с Fc-областью антитела.

В контексте настоящего документа "выделенное антитело" относится к антителу, по существу свободному от его естественного окружения. Например, выделенное антитело практически не содержит клеточного материала и других белков из клеточного или тканевого источника, из которого оно получено. "Выделенное антитело" также относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью. В данном случае выделенное антитело, которое специфически связывает PD-L1, по существу не содержит антител, специфически связывающих антигены, отличные от PD-L1. Однако выделенное антитело, которое специфически связывает PD-L1, может иметь перекрестную реактивность с другими антигенами, такими как молекулы PD-L1 других видов.

В контексте настоящего документа "моноклональное антитело" относится к препарату молекул антитела с одним типом молекулы в составе. Композиция моноклонального антитела демонстрирует единственную специфичность связывания и аффинность к определенному эпитопу.

В контексте настоящего документа "гуманизированное антитело" относится к антителу, состоящему из CDR антител, полученных от млекопитающих, отличных от человека, и области FR и константной области человеческого антитела или полученных из человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит варибельный домен, который имеет аминокислотную последовательность варибельной области, которая, в целом, ближе к человеческой, чем к другим видам, по оценке с использованием инструмента DomainGapAlign от Immunogenetics Information System (IMGT), как описано Ehrenmann et al. (2010). В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело может быть использовано в качестве эффективного компонента терапевтического агента из-за пониженной антигенности. В контексте настоящего документа термин "терапевтический агент" или "терапевтически активный агент" относится к агенту, который является терапевтически пригодным. Терапевтический агент может представлять собой любой агент для предупреждения, облегчения или лечения заболеваний, физиологического состояния, симптома или для их оценки или диагностики.

В контексте настоящего документа "человеческое антитело" включает антитела, имеющие варибельные области, в которых как каркасная область, так и области CDR получены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, эта константная область также получена из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела согласно изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Однако термин "человеческое антитело" в контексте настоящего документа не подразумевает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты на человеческие каркасные последовательности.

III. Описание графических материалов

Фиг. 1: представляет собой обзор конструкции иллюстративных слитых белков, описанных в данном изобретении, которые являются биспецифическими для мишеней CD137 и PD-L1. Иллюстративные слитые белки были созданы на основе антитела, специфичного к PD-L1 (например, антитела, тяжелые цепи которого представлены SEQ ID NO: 86, или содержат варибельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 77, или содержат последовательности CDR GFSLSNYD (HCDR1, SEQ ID NO: 60), IWTGGAT (HCDR2, SEQ ID NO: 61) и VRDSNYRYDEPFTY (HCDR3; SEQ ID NO: 62), и легкие цепи представлены SEQ ID NO: 87, или содержат варибельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 82, или содержат последовательности CDR QSIGTN (LCDR1, SEQ ID NO: 63), YAS (LCDR2) и QQSNSWPYT (LCDR3; SEQ ID NO: 64)), и одного или более мутеинов липокалина, специфичных к CD137 (например, мутеина липока-

лина с SEQ ID NO: 42). Один или более мутеинов липокалина были генетически слиты с С- и/или N-концом тяжелой цепи либо легкой цепи PD-L1-специфического антитела, как показано на фиг. 1A-1I, в результате чего были получены слитые белки, например, SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93, SEQ ID NO: 94 и 87 и SEQ ID NO: 90 и 91. Полученные слитые белки могут быть бивалентными к CD137 (например, как продемонстрировано на фиг. 1A-1D), или четырехвалентными к CD137 (например, как продемонстрировано на фиг. 1E-1H), или иметь даже более высокую валентность к CD137 (например, как продемонстрировано на фиг. 1I). Дополнительные моноспецифические слитые белки были получены путем слияния одного или более CD137-специфических мутеинов липокалина (например, как продемонстрировано на фиг. 1J-1K) с С-концом Fc-области антитела, полученного, как описано в настоящем документе, посредством пептидного линкера. Полученные моноспецифические слитые белки представлены, например, в SEQ ID NO: 88 и SEQ ID NO: 89.

Фиг. 2: демонстрирует результаты экспериментов ELISA, в которых связывание с PD-L1 или CD137 иллюстративных слитых белков определяли, как описано в примере 4. PD-L1 или CD137 (с С-концевой меткой His или Fc) наносили на планшет для микротитрования и титровали тестируемые агенты, начиная с наивысшей концентрации 100 нМ. Изучаемые связанные агенты детектировали с помощью антител к человеческому IgG Fc-HRP или к NGAL-HRP, соответственно. Данные аппроксимировали моделью связывания 1:1 со значением EC_{50} и максимальным сигналом в качестве свободных параметров, и угловым коэффициентом, который был установлен равным единице. Полученные значения EC_{50} представлены в табл. 4.

Фиг. 3: иллюстрирует результаты эксперимента ELISA, в котором определяли способность иллюстративных слитых белков одновременно связывать обе мишени, PD-L1 и CD137, как описано в примере 5. Рекombинантный huPD-L1-His или huCD137-His наносили на планшет для микротитрования с последующим титрованием слитых белков, начиная с наивысшей концентрации 100 нМ. Затем добавляли постоянную концентрацию биотинилированного huCD137-His или биотинилированного huPD-L1-His, соответственно, которые детектировали с помощью ExtrAvidin-пероксидазы.

Фиг. 4: демонстрирует результаты оценки связывания с мишенью слитых белков с помощью точной цитометрии с использованием клеток Flp-In-CHO, экспрессирующих CD137 человека или яванского макака (фиг. 4A-4B), а также PD-L1 человека или яванского макака (фиг. 4C-4D), как описано в примере 6. Связывание не наблюдалось при использовании ложно трансфицированных клеток Flp-In-CHO (фиг. 4E). Средние геометрические значения интенсивности флуоресценции использовали для расчета значений EC_{50} с использованием нелинейной регрессии (общая нижняя асимптота, наклон = 1). Значения EC_{50} представлены в табл. 6.

Фиг. 5: демонстрирует связывание слитых белков с PD-L1-положительными опухолевыми клетками, оцененное с помощью проточной цитометрии путем инкубации клеток РКО и слитых белков, как описано в примере 7.

Фиг. 6: демонстрирует примеры эксперимента на основе SPR с мультисвязыванием, предназначенного для исследования того, затрудняет ли связывание CD137L с CD137 взаимодействия слитого белка с CD137, как описано в примере 8. Это оценивают путем создания комплекса huCD137 (С-концевое слияние с Fc) и huCD137L (с С-концевой His-меткой) на сенсорном чипе SPR и проверки того, могут ли слитые белки по-прежнему связывать комплекс huCD137 и CD137L. Для сравнения, huCD137 в отсутствие huCD137L также инкубируют с тестируемыми слитыми белками. Кривая SPR для связывания соответствующего слитого белка только с huCD137 отмечена стрелкой со сплошным стержнем. Кривая SPR для связывания соответствующего слитого белка с huCD137, насыщенного huCD137L, отмечена стрелкой с пунктирным стержнем. В качестве контролей использовали холостые введения без слитых белков. Эксперимент показывает, что все протестированные слитые белки способны связывать CD137 в присутствии CD137L.

Фиг. 7: демонстрирует, что слитые белки конкурируют с PD-L1 за связывание с PD-1, как проиллюстрировано в исследованиях методом конкурентного ELISA, как описано в примере 9. Постоянную концентрацию huPD-1-His наносили на планшет для микротитрования с последующим добавлением смеси тестируемых молекул в различных концентрациях и индикатора huPD-L1-Fc в фиксированной концентрации. Связанный индикатор детектировали с использованием меченого HRP антитела к Fc IgG. Наблюдали дозозависимое ингибирование связывания huPD-L1-Fc с PD-1 биспецифическими слитыми белками к CD137 и PD-L1 или специфическими антителами к PD-L1.

Фиг. 8: Потенциал иллюстративных слитых белков в отношении стимуляции активации Т-клеток зависимым от мишени PD-L1 образом оценивали с использованием биоанализа с CD137. Клетки NFκB-luc2/CD137 Jurkat культивировали совместно с линией опухолевых клеток RKO, экспрессирующих PD-L1, в присутствии различных концентраций слитых белков или контролей. Через 4 часа добавляли реагент для анализа люциферазы и измеряли люминесцентные сигналы. Анализ с использованием четырехпараметрической логистической кривой был выполнен с помощью GraphPad Prism® для расчета значений EC_{50} (см. табл. 9). Слитые белки стимулируют активацию Т-клеток только в присутствии PD-L1 (фиг. 8A и 8C), но не в отсутствие PD-L1 (фиг. 8B и 8D). Напротив, референсное mAb к CD137 (SEQ ID

NO: 28 и 29) демонстрирует аналогичную активацию в присутствии и в отсутствие PD-L1-положительных клеток RKO.

Фиг. 9: демонстрирует результаты иллюстративного эксперимента, в котором была исследована способность выбранных слитых белков индуцировать активацию Т-клеток. Антитела к PD-L1, включая соответствующее антитело к PD-L1-строительный блок, CD137-связывающие мутеины липокалина в виде слияний с Fc и референсное антитело анти-CD137, тестировали по отдельности и в комбинации в виде коктейля анти-PD-L1/анти-CD137. В эксперименте человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК) инкубировали со слитыми белками, антителами, слияниями мутеина липокалина с Fc, коктейлями или контролем в присутствии 1 нг/мл стафилококкового энтеротоксина В (SEB). Уровни секретируемого интерлейкина 2 (IL-2), отражающие активацию Т-клеток, определяли с помощью анализа на основе электрохемолуминесценции в качестве считываемой величины, отражающей активацию Т-клеток, и нормировали к уровням соответствующего контрольного IgG4, как описано в примере 11. Все слитые белки способны индуцировать активацию Т-клеток, и индуцируют в большей степени или по меньшей мере сопоставимо с отдельными строительными блоками или смесью референсных антител анти-PD-L1/анти-CD137.

Фиг. 10: демонстрирует способность иллюстративных слитых белков костимулировать активацию Т-клеток зависимым от мишени PD-L1 образом. Антитела к PD-L1, включая соответствующее антитело к PD-L1-строительный блок, CD137-связывающие мутеины липокалина в виде слияний с Fc и референсное антитело анти-CD137, тестировали по отдельности и в комбинации в виде коктейля анти-PD-L1/анти-CD137. Различные линии опухолевых клеток, экспрессирующие разные уровни PD-L1 (высокий: RKO; средний: HCC827; отрицательный: HepG), высевали в планшеты, покрытые антителами к человеческому CD3. Добавляли пан-Т-клетки и различные концентрации слитых белков и отдельных строительных блоков и инкубировали в течение 3 дней. Уровни секретируемого IL-2 определяли с помощью анализа на основе электрохемолуминесценции, как описано в примере 12. Все слитые белки способны повышать секрецию IL-2 зависимым от PD-L1 образом.

Фиг. 11: иллюстрирует стабильность слитых белков при хранении в PBS или 25 мМ гистидина, 60 мМ NaCl, 200 мМ аргинина при pH 6 после 1-, 2-, 3- или 4-недельной инкубации при 37°C или 40°C в концентрации 1 мг/мл или 20 мг/мл. Стабильность оценивают по проценту пика мономеров в аналитической эксклюзионной хроматографии или по проценту найденных функциональных белков в количественном ELISA, как описано в примере 13.

Фиг. 12: демонстрирует способность иллюстративного слитого белка (SEQ ID NO: 90 и 87) стимулировать секрецию IL-2 в реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR) с CD4⁺ Т-клетками. Слитые белки, антитело к PD-L1-строительный блок (SEQ ID NO: 86 и 87), CD137-связывающий мутеин липокалина в виде слияния с Fc (SEQ ID NO: 89) и референсное антитело к CD137 или референсное антитело к PD-L1, по отдельности или в комбинации в виде коктейля анти-PD-L1/анти-CD137, тестировали при эквимолярных концентрациях, как описано в примере 14. Секрецию IL-2 измеряли в супернатантах спустя 6 дней инкубации с общими человеческими CD4⁺ Т-клетками и моноцитарными дендритными клетками (moDC) от разных здоровых доноров. Фиг. 12А иллюстрирует, что слитый белок с последовательностями SEQ ID NO: 90 и 87 показал значительное повышение секреции IL-2 по сравнению с строительным блоком по отдельности (антитело к PD-L1 с последовательностями SEQ ID NO: 86 и 87 или CD137-специфический мутеин липокалина с последовательностью SEQ ID NO: 89) и референсным антителом к PD-L1 или к CD137 (SEQ ID NO: 26 и 27 или SEQ ID NO: 28 и 29, соответственно), при эквимолярных концентрациях (эквивалентных 10 или 0,1 мкг/мл тестируемого слитого белка). Приведены данные из 8 независимых экспериментов. Фиг. 12В демонстрирует, что слитый белок с последовательностями SEQ ID NO: 90 и 87 был способен индуцировать дозозависимую секрецию IL-2 в диапазоне концентраций от 0,001 до 20 мкг/мл. Уровни IL-2, индуцированные слитым белком, были выше по сравнению с эквимолярными концентрациями коктейля из референсного антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 26 и 27) и референсного антитела к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29). Показаны данные для иллюстративного донора.

Фиг. 13: демонстрирует способность иллюстративного слитого белка (SEQ ID NO: 90 и 87) индуцировать секрецию эффекторных молекул CD8⁺ Т-клеток. Слитый белок культивировали с moDC и CD8⁺ Т-клетками от несовместимых здоровых доноров в течение 6 дней, после чего количественно определяли секрецию IL-2 и эффекторных молекул CD8⁺ Т-клеток в супернатантах с использованием анализа Luminex, как описано в примере 15. Слитый белок с последовательностями SEQ ID NO: 90 и 87 показал повышение секреции IL-2 и цитотоксических факторов (перфорин, гранзим В и гранзим А) при 10 мкг/мл по сравнению с референсным антителом к PD-L1 (SEQ ID NO: 26 и 27) и референсным антителом к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29), при использовании по отдельности или в виде коктейля.

Фиг. 14: демонстрирует, что слитые белки связывают перекрывающиеся эпитопы с клинически активным антителом к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29), как проиллюстрировано в исследованиях методом конкурентного ELISA, как описано в примере 17. Постоянную концентрацию SEQ ID NO: 28 и 29 нанесли на планшет для микротитрования с последующим добавлением смеси тестируемых молекул в различных концентрациях и индикатора биотинилированного huCD137-Fc в фиксированной концентрации. Связанный индикатор детектировали с использованием ExtrAvidin-пероксидазы. Слитые белки конкури-

руют с антителом к CD137 за связывание с CD137.

Фиг. 15: демонстрирует потенциал иллюстративных слитых белков блокировать ингибирующий сигнал, опосредованный взаимодействием PD-1/PD-L1, оцененный с использованием биоанализа блокады PD-1/PD-L1, как описано в примере 18. Т-клетки PD-1-NFAT-luc Jurkat (линия клеток Jurkat, экспрессирующая PD-1 и NFAT-опосредованный ген люциферазы под контролем промотора NFAT) культивировали совместно с клетками PD-L1 aAPC/CHO-K1 в присутствии различных концентраций тестируемых молекул. Через 6 часов добавляли реагент для анализа люциферазы и измеряли люминесцентные сигналы. Фоновый сигнал представляет собой Т-клетки PD-1-NFAT-luc Jurkat, культивируемые только совместно с клетками PD-L1 aAPC/CHO-K1. Слитый белок с последовательностями SEQ ID NO: 90 и 87 блокирует сигнальный путь PD-1/PD-L1 на уровне, сопоставимом с протестированными антителами к PD-L1, включая антитело к PD-L1-строительный блок, представленное в SEQ ID NO: 86 и 87, и референсное антитело к PD-L1, представленное в SEQ ID NO: 26 и 27.

Фиг. 16: демонстрирует способность иллюстративного слитого белка индуцировать активацию Т-клеток. Также были протестированы антитело к PD-L1-строительный блок и референсное антитело к CD137 при использовании по отдельности и в комбинации с антителом к PD-L1. В эксперименте человеческие МНПК инкубировали со слитым белком, антителами, коктейлями или контролем в присутствии 0,1 нг/мл SEB. Уровни секретируемого IL-2 определяли с помощью анализа на основе электрохемилюминесценции в качестве считываемой величины, отражающей активацию Т-клеток, как описано в примере 19 и изображено на фиг. 16А. Фиг. 16В демонстрирует кратность повышения уровней секреции IL-2, индуцированного тестируемыми молекулами, по сравнению с уровнем фоновой секреции IL-2 (МНПК стимулировали с помощью 0,1 нг/мл SEB и без каких-либо тестируемых молекул). Слитый белок вызывает дозозависимое повышение секреции IL-2 на уровне, превышающем антитело к PD-L1 или антитело к CD137, по отдельности или в комбинации.

Фиг. 17: демонстрирует способность иллюстративного слитого белка осуществлять костимуляцию активации Т-клеток в присутствии PD-L1. Параллельно тестировали антитело к PD-L1-строительный блок, референсное антитело к CD137 и коктейль из антитела к CD137 и референсного антитела к PD-L1. Клетки CHO, трансфицированные человеческим PD-L1 (фиг. 17А) или ложно трансфицированные (отрицательные по человеческому PD-L1, фиг. 17В), высевали в планшеты, покрытые антителом к человеческому CD3. Добавляли пан-Т-клетки, а также различные концентрации тестируемых молекул, и инкубировали в течение 2 дней. Уровни секретируемого IL-2 в супернатанте определяли с помощью анализа на основе электрохемилюминесценции, как описано в примере 20. Уровни секреции IL-2 были нормированы к фоновым уровням (пан-Т-клетки + анти-CD3 + клетки CHO), чтобы отобразить кратность повышения секреции IL-2 в присутствии клеток CHO, экспрессирующих человеческий PD-L1 (фиг. 17С), или ложно трансфицированных клеток CHO (фиг. 17D). Слитый белок индуцирует сильное дозозависимое повышение секреции IL-2 только в присутствии PD-L1, на уровне, превышающем референсное антитело к CD137 по отдельности или в комбинации с референсным антителом к PD-L1.

Фиг. 18: демонстрирует результат фармакокинетических анализов биспецифических слитых белков и антитела к PD-L1-строительного блока (SEQ ID NO: 86 и 87) у мышей, как описано в примере 21. Самцам мышей CD-1 (3 мыши на временную точку) внутривенно вводили слитые белки в дозе 10 мг/кг. Уровни лекарственного средства определяли с помощью сэндвич-ELISA, детектируя целую молекулу посредством мишеней PD-L1 и CD137. Уровни антител к PD-L1 в плазме определяли с использованием сэндвич-ELISA с мишенями PD-L1 и человеческим Fc.

Фиг. 19: демонстрирует результаты фармакокинетического анализа иллюстративного слитого белка (SEQ ID NO: 90 и 87) по сравнению с двумя ранее описанными CD137- и PD-L1-связывающими слитыми белками (SEQ ID NO: 147 и SEQ ID NO: 148) у мышей, как описано в примере 22. Самцам мышей CD-1 (2 мыши на временную точку) внутривенно вводили тестируемые молекулы в дозе 2 мг/кг. Уровни лекарственного средства определяли с помощью ELISA в указанных временных точках. Данные были нанесены на график зависимости концентрации от времени. SEQ ID NO: 90 и 87, описанный в настоящем документе, но не SEQ ID NO: 147 или SEQ ID NO: 148, демонстрирует благоприятный фармакокинетический профиль или антителоподобную фармакокинетику.

IV. Подробное описание изобретения

Как описано в настоящем документе, настоящее изобретение включает установление того, что бивалентной CD137-связывающей молекулы, такой как антитело, самой по себе может быть недостаточно для кластеризации CD137 на Т-клетках или НК-клетках и обеспечения эффективной активации, подобно отсутствию активности трехвалентного растворимого CD137L. В недавних публикациях с использованием доклинических моделей на мышах *in vivo* были представлены доказательства того, что механизм действия других антител к TNFR требует взаимодействия антител посредством их Fc-части с Fc-гамма-рецепторами на клетках, экспрессирующих Fc-гамма-рецепторы (Bulliard et al., *Immunol Cell Biol*, 2014, Bulliard et al., *J Exp Med*, 2013). Таким образом, в механизме действия этих антител к TNFR может преобладать нецелевая кластеризация посредством Fc-гамма-рецепторов, в зависимости от присутствия клеток, экспрессирующих Fc-гамма-рецептор, который не обязательно может быть сверхэкспрессирован в микроокружении опухоли-мишени по сравнению с нормальными тканями.

Таким образом, существует неудовлетворенная потребность в создании терапевтических средств, которые кластеризуют и активируют CD137 со специфическим, нацеленным на опухоль механизмом действия.

Для удовлетворения этой неудовлетворенной потребности в настоящем описании предложены, среди прочего, новые подходы для одновременного связывания CD137 и PD-L1 с помощью одного или более слитых белков, обладающих специфичностью связывания с CD137 и специфичностью связывания с PD-L1. Предложенные слитые белки разработаны для способствования кластеризации CD137 путем соединения CD137-положительных Т-клеток с PD-L1, экспрессируемым в микроокружении опухоли. Такие биспецифические молекулы могут сочетать CD137-индуцированную активацию и экспансию Т-клеток с блокадой иммунных контрольных точек, опосредованной анти-PD-L1, и, таким образом, могут преодолевать определенные ограничения монотерапии и обеспечивать преимущества, например, для резистентных или невосприимчивых пациентов. Слитые белки также разработаны для обеспечения возможностей комбинированной терапии в одной молекуле, и в то же время позволяют осуществлять локализованную индукцию антигенспецифических Т-клеток в микроокружении опухоли, потенциально снижая периферическую токсичность.

В некоторых аспектах настоящего изобретения предложены слитые белки, связывающие CD137 и PD-L1, а также способы и их полезные применения. В изобретении также предложены способы получения слитых белков, связывающих CD137 и PD-L1, описанных в настоящем документе, а также композиции, содержащие такие белки. Слитые белки, связывающие CD137 и PD-L1, согласно изобретению, а также содержащие их композиции могут быть использованы в способах обнаружения CD137 и/или PD-L1 в образце, в способах связывания CD137 и/или PD-L1 у субъекта, или в способах модуляции иммунных ответов у субъекта. Подобные слитые белки, обладающие этими характеристиками, соответствующими применениям, предусмотренным настоящим изобретением, ранее не были описаны. В отличие от слитых белков, предложенных в настоящем документе, ранее известные слитые белки, нацеленные как на CD137, так и на PD-L1, имели один или более из следующих недостатков: плохая фармакокинетика, неприемлемая степень нецелевого связывания, сниженная или иным образом ухудшенная способность связывать одну или обе мишени отдельно взятого слитого белка (например, PD-L1 и/или CD137) и/или неприемлемая степень неспецифической (например, независимой от PD-L1) активации, например, иммунной системы.

А. Иллюстративные слитые белки, специфичные к CD137 и PD-L1, согласно изобретению.

В некоторых вариантах осуществления предложенный слитый белок содержит по меньшей мере две субъединицы в любом порядке: (1) первую субъединицу, содержащую полноразмерный иммуноглобулин или его антигенсвязывающий домен, специфичный к PD-L1, и (2) вторую субъединицу, содержащую мутеин липокалина, специфичный к CD137.

В некоторых вариантах осуществления предложенный слитый белок также может содержать по меньшей мере одну дополнительную субъединицу, например, третью субъединицу. Например, слитый белок может содержать третью субъединицу, специфичную к CD137. В некоторых вариантах осуществления третья субъединица может представлять собой или содержать мутеин липокалина, специфичный к CD137. Например, два мутеина липокалина могут быть слиты с первой субъединицей иммуноглобулина, один на С-конце и один на N-конце иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления мутеины липокалина могут быть слиты с тяжелой цепью или легкой цепью иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления предложенные слитые белки могут содержать одну или более дополнительных субъединиц (например, четвертую, пятую или шестую субъединицу).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна субъединица может быть слита на ее N-конце и/или ее С-конце с другой субъединицей.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна субъединица может быть связана с другой субъединицей посредством линкера. В некоторых дополнительных вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер, например, неструктурированный глицин-сериновый (GS) линкер, гликозилированный GS линкер или пролин-аланин-сериновый полимерный (PAS) линкер. В некоторых вариантах осуществления GS линкер представляет собой линкер $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ ($(\text{G}_4\text{S})_3$), представленный в SEQ ID NO: 13. Другие иллюстративные линкеры представлены в SEQ ID NO: 14-23. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер может содержать от 1 до 50 аминокислот, например, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот. Например, когда первая субъединица содержит полноразмерный иммуноглобулин, вторая субъединица может быть связана посредством пептидного линкера между N-концом второй субъединицы и С-концом константной области тяжелой цепи (CH) указанного иммуноглобулина. В некоторых дополнительных вариантах осуществления третья субъединица может быть связана посредством пептидного линкера между N-концом третьей субъединицы и С-концом константной области легкой цепи (CL) указанного иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления одна субъединица может быть связана с другой субъединицей по способу как описано на фиг. 1. Как правило, одна субъединица может быть слита на ее N-конце и/или ее С-конце с другой субъединицей. Например, в некоторых вариантах осуществления субъединица мутеина липокалина может быть слита на ее N-конце и/или на ее С-конце с субъединицей иммуноглобу-

лина. В качестве еще одного примера, один мутеин липокалина может быть связан, предпочтительно посредством пептидной связи, с С-концом домена тяжелой цепи иммуноглобулина (HC), N-концом HC, С-концом легкой цепи иммуноглобулина (LC) и/или N-концом LC (фиг. 1A-1D).

В некоторых вариантах осуществления субъединица мутеина липокалина может быть слита на ее N-конце и/или на ее С-конце с фрагментом иммуноглобулина. Например, в некоторых вариантах осуществления мутеин липокалина может быть связан, предпочтительно посредством пептидного линкера, на С-конце константной области тяжелой цепи (CH) или С-конце константной области легкой цепи (CL) иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления, когда одна субъединица содержит полноразмерный иммуноглобулин, вторая субъединица может быть связана между N-концом второй субъединицы и С-концом константной области тяжелой цепи (CH) указанного иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления третья субъединица может быть связана между N-концом третьей субъединицы и С-концом константной области легкой цепи (CL) указанного иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления в отношении слитого белка согласно изобретению, где по меньшей мере одна субъединица может представлять собой или содержать полноразмерный иммуноглобулин, Fc-функция Fc-области полноразмерного иммуноглобулина по отношению к Fc-рецептор-положительной клетке может быть сохранена, и слитый белок при этом может одновременно связывать CD137 и PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления, где по меньшей мере одна субъединица предложенного слитого белка может представлять собой или содержать полноразмерный иммуноглобулин, Fc-функция Fc-области полноразмерного иммуноглобулина по отношению к Fc-рецептор-положительной клетке может быть снижена или полностью подавлена посредством белковой инженерии, и слитый белок при этом может одновременно связывать CD137 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления это может быть достигнуто, например, путем замены остова IgG1 на IgG4, поскольку известно, что IgG4 демонстрирует сниженные взаимодействия с Fc-гамма-рецептором по сравнению с IgG1. В некоторых вариантах осуществления, чтобы дополнительно снизить остаточное связывание с Fc-гамма-рецепторами, в остов IgG4 могут быть введены мутации, такие как F234A и L235A. В некоторых вариантах осуществления мутация S228P также может быть введена в остов IgG4 для минимизации обмена половинами молекул IgG4 (Silva et al., J Biol Chem, 2015). В некоторых вариантах осуществления могут быть введены мутации F234A и L235A для снижения ADCC (антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности) и ADCP (антителозависимого клеточноопосредованного фагоцитоза) (Glaesner et al., Diabetes Metab Res Rev, 2010) и/или мутации M428L и N434S или мутации M252Y, S254T и T256E для увеличения периода полувыведения из сыворотки (Dall'Acqua et al., J Biol Chem, 2006, Zalevsky et al., Nat Biotechnol, 2010). В некоторых вариантах осуществления в тяжелой цепи иммуноглобулина в составе слитого белка может присутствовать дополнительная мутация N297A для того, чтобы удалить природный мотив гликозилирования.

В некоторых вариантах осуществления Fc-часть иммуноглобулина, включенная в слитый белок согласно изобретению, может способствовать поддержанию сывороточных уровней слитого белка. Например, когда Fc-часть связывается с Fc-рецепторами на эндотелиальных клетках и фагоцитах, слитый белок может интернализироваться и возвращаться обратно в кровоток, увеличивая свой период полувыведения из организма.

В одном из аспектов слитые белки согласно изобретению связывают CD137 с высокой аффинностью. В еще одном аспекте предложенные слитые белки связывают PD-L1 с высокой аффинностью. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления предложенные слитые белки одновременно связывают CD137 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления изобретения одновременное связывание с CD137 и PD-L1 позволяет предложенным слитым белкам демонстрировать устойчивый противоопухолевый или противои инфекционный ответ.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок согласно изобретению может быть способен связывать PD-L1 со значением K_D не более чем приблизительно 2 нМ или даже ниже, например, приблизительно 1,5 нМ или ниже, приблизительно 1 нМ или ниже, приблизительно 0,6 нМ или ниже или приблизительно 0,4 нМ или ниже. В некоторых вариантах осуществления слитый белок согласно изобретению может быть способен связывать PD-L1 со значением K_D , сопоставимым или более низким, чем значение K_D иммуноглобулина, специфичного к PD-L1, входящего в состав такого слитого белка, такого как антитело, имеющее тяжелую и легкую цепи, представленные SEQ ID NO: 86 и 87. Значения K_D предложенных слитых белков могут быть измерены, например, в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR), таком как анализ методом SPR, как по существу описано в примере 3.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок согласно изобретению может быть способен связывать CD137 со значением K_D не более чем приблизительно 10 нМ или даже ниже, например, приблизительно 7 нМ, приблизительно 6 нМ или приблизительно 5 нМ, приблизительно 4 нМ, приблизительно 3 нМ, приблизительно 2 нМ или даже ниже. В некоторых вариантах осуществления слитый белок согласно изобретению может быть способен связывать CD137 со значением K_D , сопоставимым или более низким, чем значение K_D мутеина липокалина, специфичного к CD137, включенного в состав конкретного слитого белка, например, SEQ ID NO: 42, или мутеина липокалина, слитого с Fc-областью антитела,

например, SEQ ID NO: 89. Значения K_D предложенных слитых белков могут быть измерены, например, в анализе методом SPR, таком как анализ методом SPR, как по существу описано в примере 3.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок согласно изобретению может быть способен связывать PD-L1 со значением EC_{50} не более чем приблизительно 0,5 нМ или даже ниже, например, приблизительно 0,3 нМ или ниже, приблизительно 0,2 нМ или ниже, приблизительно 0,15 нМ или ниже или приблизительно 0,1 нМ или ниже. В некоторых вариантах осуществления слитый белок согласно изобретению может быть способен связывать PD-L1 со значением EC_{50} , сопоставимым или более низким, чем значение EC_{50} иммуноглобулина, специфичного к PD-L1, входящего в состав конкретного слитого белка, такого как антитело, имеющее тяжелую и легкую цепи, представленные SEQ ID NO: 86 и 87. Значения EC_{50} предложенных слитых белков могут быть измерены, например, в анализе методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), таком как анализ ELISA, как по существу описано в примере 4.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок согласно изобретению может быть способен связывать CD137 со значением EC_{50} не более чем приблизительно 0,6 нМ или даже ниже, например, приблизительно 0,5 нМ или ниже, приблизительно 0,2 нМ или ниже, приблизительно 0,15 нМ или ниже или приблизительно 0,1 нМ или ниже. В некоторых вариантах осуществления слитый белок согласно изобретению может быть способен связывать CD137 со значением EC_{50} , сопоставимым или более низким, чем значение EC_{50} мутеина липокалина, специфичного к CD137, включенного в состав конкретного слитого белка, например, SEQ ID NO: 42, или мутеина липокалина, слитого с Fc-областью антитела, например, SEQ ID NO: 89. Значения EC_{50} предложенных слитых белков могут быть измерены, например, в анализе методом ELISA, таком как анализ ELISA, как по существу описано в примере 4.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению обладают перекрестной реактивностью с PD-L1 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления предложенный слитый белок может быть способен связывать PD-L1 яванского макака со значением EC_{50} не более чем приблизительно 0,5 нМ или даже ниже, например, приблизительно 0,2 нМ или ниже, приблизительно 0,1 нМ или ниже или приблизительно 0,05 нМ. или ниже. Значения EC_{50} предложенных слитых белков могут быть измерены, например, измерены в анализе методом ELISA, таком как анализ ELISA, как по существу описано в примере 4.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению обладают перекрестной реактивностью с CD137 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления предложенный слитый белок может быть способен связывать CD137 яванского макака со значением EC_{50} не более чем приблизительно 15 пМ или даже ниже, например, приблизительно 10 нМ или ниже, приблизительно 8 нМ или ниже, приблизительно 6 нМ или ниже, приблизительно 3 нМ или ниже, приблизительно 1 нМ или ниже, приблизительно 0,5 нМ или ниже, приблизительно 3 нМ или ниже или приблизительно 0,1 нМ или ниже. Значения EC_{50} предложенных слитых белков могут быть измерены, например, в анализе методом ELISA, таком как анализ ELISA, как по существу описано в примере 4. В некоторых вариантах осуществления связывание предложенного слитого белка с CD137 яванского макака может быть усилено за счет эффекта авидности, как описано в примере 22.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению могут быть способны одновременно связывать CD137 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления предложенный слитый белок может быть способен одновременно связывать CD137 и PD-L1 со значением EC_{50} не более чем приблизительно 1 нМ или даже ниже, например, 0,8 нМ или ниже, 0,6 нМ или ниже или 0,4 нМ или ниже. В некоторых других вариантах осуществления предложенный слитый белок может быть способен одновременно связывать CD137 и PD-L1 со значением EC_{50} не более чем приблизительно 10 нМ или даже ниже, например, 8 нМ или ниже, 6 нМ или ниже, 3 нМ или ниже или 2 нМ или ниже. Одновременное связывание может быть определено, например, в анализе методом ELISA, таком как анализ ELISA, как по существу описано в примере 5.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок согласно изобретению может быть способен связывать CD137, экспрессируемый на клетке, со значением EC_{50} не более чем приблизительно 60 нМ или даже ниже, например, приблизительно 50 нМ или даже ниже, приблизительно 40 нМ или даже ниже, приблизительно 30 нМ или ниже, приблизительно 10 нМ или ниже, приблизительно 7 нМ или ниже, приблизительно 5 нМ или ниже, приблизительно 3 нМ или ниже или приблизительно 1 нМ или даже ниже. Значение EC_{50} предложенного слитого белка может быть измерено, например, в анализе методом проточной цитометрии, как по существу описано в примере 6. Клетка, экспрессирующая CD137, может представлять собой, например, клетку CHO, трансфицированную человеческим CD137 или CD137 яванского макака.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок согласно изобретению может быть способен связывать PD-L1, экспрессируемый на клетке, со значением EC_{50} не более чем приблизительно 10 нМ или даже ниже, например, приблизительно 8 нМ или даже ниже, приблизительно 6 нМ или даже ниже, приблизительно 4 нМ или ниже, приблизительно 2 нМ или ниже или приблизительно 1 или даже ниже. Значение EC_{50} предложенного слитого белка может быть измерено, например, в анализе методом проточной цитометрии, как по существу описано в примере 6. Клетка, экспрессирующая PD-L1, может представлять собой, например, клетку CHO, трансфицированную человеческим PD-L1 или PD-L1 яван-

ского макака.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению могут быть способны связывать PD-L1, экспрессируемый на опухолевых клетках. В некоторых вариантах осуществления предложенный слитый белок может быть способен связывать PD-L1, экспрессируемый на опухолевой клетке, со значением EC_{50} не более чем приблизительно 2 нМ или даже ниже, например, приблизительно 1,5 нМ или ниже, приблизительно 1 нМ или ниже, приблизительно 0,6 нМ или ниже или приблизительно 0,3 нМ или даже ниже. Значение EC_{50} слитого белка для связывания опухолевых клеток, экспрессирующих PD-L1, может быть измерено, например, в анализе методом проточной цитометрии, как по существу описано в примере 7. Опухолевые клетки, экспрессирующие PD-L1, могут представлять собой, например, клетки RKO.

В некоторые варианты осуществления слитые белки согласно изобретению по существу не влияют на связывание CD137 с CD137L. В некоторых вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению могут быть способны связывать CD137, находящийся в комплексе с CD137L. В некоторых вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению могут быть способны связывать CD137 с помощью механизма, подобного антителу к CD137, имеющему тяжелую и легкую цепи, представленные SEQ ID NO: 28 и 29. Механизм связывания с CD137 слитого белка может быть определен, например, посредством анализа методом SPR, такого как анализ методом SPR, как по существу описано в примере 8.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению могут быть способны конкурировать с PD-1 за связывание с PD-L1. В некоторых вариантах осуществления предложенный слитый белок может быть способен конкурировать с PD-1 за связывание с PD-L1 со значением IC_{50} не более чем приблизительно 5 нМ или даже ниже, например, приблизительно 3 нМ или ниже, приблизительно 2 нМ или ниже или приблизительно 1 или даже ниже. Механизм ингибирующего действия может быть определен, например, посредством анализа методом ELISA, такого как анализ ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению могут быть способны конкурировать с антителом к CD137, представленным в SEQ ID NO: 28 и 29, за связывание с CD137. Такую конкуренцию можно оценить с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 17. В некоторых вариантах осуществления предложенный слитый белок может иметь перекрывающийся эпитоп с антителом к CD137, представленным в SEQ ID NO: 28 и 29.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению могут быть способны костимулировать Т-клеточные ответы. В некоторых вариантах осуществления предложенные слитые белки приводят к сопоставимой или более сильной активации Т-клеток по сравнению с антителом к PD-L1, таким как антитело к PD-L1-строительный блок с последовательностями SEQ ID NO: 86 и 87 или референсное антитело к PD-L1 с последовательностями SEQ ID NO: 26 и 27, или антитело к CD137, такое как референсное антитело с последовательностями SEQ ID NO: 28 и 29. В некоторых вариантах осуществления предложенные слитые белки приводят к активации Т-клеток с сопоставимой или лучшей эффективностью по сравнению с комбинацией антитела к PD-L1 и молекулы, нацеленной на CD137, такой как антитело к CD137 или ранее известный CD137-специфический мутеин липокалина. Стимулированный Т-клеточный ответ или активация Т-клеток могут быть измерены, например, в биоанализе с CD137, как по существу описано в примере 10, в биоанализе с блокадой PD-1/PD-L1, как описано в примере 18, или в функциональном анализе активации Т-клеток, как по существу описано в примере 11, примере 12, примере 19 и примере 20.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению могут быть способны индуцировать повышенную секрецию IL-2. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления предложенные слитые белки могут быть способны индуцировать зависимую от концентрации секрецию IL-2 и/или демонстрируют тенденцию к индукции повышенной секреции IL-2 при более высоких концентрациях, предпочтительно концентрациях при нанесении в виде покрытия. В некоторых вариантах осуществления предложенные слитые белки могут приводить к повышенной секреции IL-2 с сопоставимой или лучшей эффективностью по сравнению с комбинацией антитела к PD-L1 и молекулы, нацеленной на CD137, такой как антитело к CD137 или ранее известный CD137-специфический мутеин липокалина. Секреция IL-2 может быть измерена, например, в функциональном анализе активации Т-клеток, как по существу описано в примере 11 и примере 19.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению могут быть способны костимулировать Т-клеточные ответы PD-L1-зависимым образом. В некоторых вариантах осуществления предложенные слитые белки могут приводить к локальной индукции продукции IL-2 Т-клетками вблизи PD-L1-положительных клеток, таких как клетки, трансфицированные PD-L1, или PD-L1-положительные опухолевые клетки. "Вблизи PD-L1-положительных клеток" в контексте настоящего документа относится к Т-клетке и PD-L1-положительной клетке, сближенным друг с другом посредством предложенного слитого белка, который одновременно связывает CD137 и PD-L1. PD-L1-зависимая активация Т-клеток предложенными слитыми белками может быть определена, например, в биоанализе с CD137, по существу описанном в примере 10, в биоанализе с блокадой PD-1/PD-L1, по существу описанном в примере 18, или в функциональном анализе активации Т-клеток, по существу описанном в приме-

ре 12 и примере 20.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления предложенные слитые белки могут быть способны костимулировать Т-клеточные ответы в присутствии опухолевых клеток, экспрессирующих PD-L1, и/или в микроокружении опухоли. В некоторых вариантах осуществления предложенный слитый белок может быть способен костимулировать Т-клеточные ответы в присутствии PD-L1-положительных опухолевых клеток со значением EC_{50} приблизительно 1 нМ или ниже, приблизительно 0,5 нМ или ниже, приблизительно 0,3 нМ или ниже, приблизительно 0,1 нМ или ниже или приблизительно 0,05 нМ или ниже. Активация Т-клеток предложенными слитыми белками в присутствии опухолевых клеток, экспрессирующих PD-L1, и/или в микроокружении опухоли может быть оценена, например, в CD137-биоанализе, по существу описанном в примере 10, или в функциональном анализе активации Т-клеток, по существу описанном в примере 12.

В некоторых вариантах осуществления предложенные слитые белки неспособны костимулировать Т-клеточные ответы в отсутствие PD-L1. В некоторых вариантах осуществления предложенные слитые белки неспособны костимулировать Т-клеточные ответы в отсутствие клеток, экспрессирующих PD-L1. В некоторых вариантах осуществления предложенный слитый белок может быть лучше способен распознавать присутствие PD-L1 и приводить к соответствующей активации Т-клеток, чем антитело к CD137, представленное в SEQ ID NO: 28 и 29. PD-L1-зависимое действие слитых белков может быть определено, например, в биоанализе с CD137, по существу описанном в примере 10, в биоанализе с блокадой PD-1/PD-L1, по существу описанном в примере 18, или в функциональном анализе активации Т-клеток, по существу описанном в примере 12 и примере 20.

В некоторых вариантах осуществления предложенные слитые белки могут быть способны блокировать ингибирующий сигнал, опосредованный связыванием PD-1 с PD-L1. В некоторых вариантах осуществления предложенный слитый белок может быть способен ослабить тормоз активации Т-клеток или привести к успешной активации Т-клеток путем блокирования взаимодействия PD-1/PD-L1. Блокада ингибирующего сигнала PD-1 может быть измерена, например, в биоанализе с блокадой PD-1/PD-L1, как описано в примере 18.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению могут быть способны стимулировать пролиферацию и/или активацию Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления предложенные слитые белки могут быть способны стимулировать пролиферацию и/или активацию $CD4^+$ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления предложенные слитые белки могут быть способны индуцировать секрецию IL-2, предпочтительно дозозависимую секрецию IL-2. В некоторых вариантах осуществления предложенные слитые белки могут быть способны индуцировать более высокий уровень секреции IL-2 по сравнению с комбинацией антитела к PD-L1 и молекулы, нацеленной на CD137, такой как антитело к CD137 или ранее известный CD137-специфический мутеин липокалина. Секреция IL-2 в контексте настоящего документа может быть мерой активации Т-клеток. Пролиферация и/или активация $CD4^+$ Т-клеток, стимулированная предложенными слитыми белками, может быть оценена с помощью, например, анализа реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR), как по существу описано в примере 14.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению могут быть способны стимулировать пролиферацию и/или активацию $CD8^+$ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления предложенные слитые белки могут быть способны индуцировать продукцию IL-2 и эффекторных молекул, таких как перфорин, гранзим А и гранзим В. В некоторых вариантах осуществления предложенные слитые белки могут быть способны индуцировать повышенную продукцию IL-2 и цитотоксических факторов, таких как перфорин, гранзим В и гранзим А, по сравнению с комбинацией антитела к PD-L1 и молекулы, нацеленной на CD137, такой как антитело к CD137 или ранее известный CD137-специфический мутеин липокалина. Пролиферация и/или активация $CD8^+$ Т-клеток, стимулированная предложенными слитыми белками, может быть оценена с помощью, например, анализа MLR, как по существу описано в примере 15.

В некоторых вариантах осуществления предложенные слитые белки обладают благоприятным профилем стабильности и фармакокинетическим профилем. В некоторых вариантах осуществления предложенный слитый белок имеет фармакокинетический профиль, сопоставимый с антителом-строительным блоком с последовательностями SEQ ID NO: 86 и 87. В некоторых вариантах осуществления предложенный слитый белок имеет антителоподобную фармакокинетическую. В некоторых вариантах осуществления предложенный слитый белок имеет конечный период полувыведения приблизительно 200 часов или дольше, приблизительно 250 часов или дольше, приблизительно 300 часов или дольше, приблизительно 350 часов или дольше, приблизительно 400 часов или дольше, или даже дольше. В некоторых вариантах осуществления предложенный слитый белок имеет более благоприятный фармакокинетический профиль, чем SEQ ID NO: 147. В некоторых вариантах осуществления предложенный слитый белок имеет более благоприятный фармакокинетический профиль, чем SEQ ID NO: 148. Фармакокинетические профили предложенных слитых белков могут быть проанализированы, как описано в примере 21 и примере 22. В некоторых вариантах осуществления можно считать, что благоприятный фармакокинетический профиль или антителоподобная фармакокинетика достигнуты, если $\% c_{max}$ был выше 10% спустя 336 часов.

В некоторых вариантах осуществления предложенный слитый белок содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 88-94.

В некоторых вариантах осуществления предложенный слитый белок содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или даже более высокой идентичностью последовательности с аминокислотными последовательностями, представленными в любой из SEQ ID NO: 88-94.

В некоторых вариантах осуществления предложенный слитый белок содержит аминокислоты, представленные в SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93, SEQ ID NO: 94 и 87 или SEQ ID NO: 90 и 91.

В некоторых вариантах осуществления предложенный слитый белок содержит аминокислотные последовательности, обладающие по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или даже более высокой идентичностью последовательности с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93, SEQ ID NO: 94 и 87 или SEQ ID NO: 90 и 91.

В. Иллюстративные иммуноглобулины, входящие в состав слитых белков.

В некоторых вариантах осуществления в отношении предложенного слитого белка первая субъединица может представлять собой или содержать полноразмерный иммуноглобулин или его антигенсвязывающий домен, специфичный к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулин, например, может представлять собой IgG1, IgG2 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулин представляет собой или содержит IgG4. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулин представляет собой моноклональное антитело к PD-L1.

Иллюстративные примеры PD-L1-связывающих антител согласно изобретению могут содержать антигенсвязывающую область, которая перекрестно блокирует или связывается с тем же эпитопом, что и PD-L1-связывающее антитело, содержащее области переменного домена тяжелой цепи (V_H) и переменного домена легкой цепи (V_L) известного антитела, такого как атезолизумаб (также известно как MPDL3280A или RG7446, торговое наименование Tecentriq®), авелумаб (также известно как MSB0010718C, торговое наименование Bavencio®), дурвалумаб (ранее известно как MEDI4736, торговое наименование Imfinzi®) и BMS-936559 (также известно как MDX-1105), 5C10 (включая гуманизированное 5C10), 5F10 (включая гуманизированное 5F10) и 9F6 (включая гуманизированное 9F6). В некоторых вариантах осуществления PD-L1-связывающее антитело согласно изобретению может содержать антигенсвязывающую область, такую как любая из трех определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и трех CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из антитела, выбранного из группы, состоящей из атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба, BMS-936559, 5C10, 5F10 и 9F6.

В некоторых вариантах осуществления предложенное антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий домен может иметь переменную область тяжелой цепи (HCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 75-79, и/или переменную область легкой цепи (LCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 80-84.

В некоторых вариантах осуществления предложенное антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий домен может иметь тяжелую цепь, представляющую собой любую из SEQ ID NO: 85-86, и/или легкую цепь, представляющую собой SEQ ID NO: 87.

В некоторых вариантах осуществления пара тяжелой цепи и легкой цепи предложенного антитела к PD-L1 или его антигенсвязывающего домена представляет собой или содержит следующие HCVR и LCVR, соответственно: SEQ ID NO: 75 и 80, SEQ ID NO: 76 и 81, SEQ ID NO: 77 и 82, SEQ ID NO: 78 и 83 или SEQ ID NO: 79 и 84.

В некоторых вариантах осуществления пара тяжелой цепи и легкой цепи предложенного антитела к PD-L1 представляет собой или содержит аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 85 и 87 или SEQ ID NO: 86 и 87.

В некоторых вариантах осуществления предложенное антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий домен может иметь HCVR, обладающую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или даже более высокой идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 75-79, и/или LCVR, обладающую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или даже более высокой идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 80-84. В других вариантах осуществления предложенное антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий домен может иметь тяжелую цепь, обладающую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по

меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или даже более высокой идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85-86, и/или легкую цепь, обладающую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или даже более высокой идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 87.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи предложенного антитела к PD-L1 или его антигенсвязывающего домена может иметь три CDR, имеющие следующие последовательности: GFSLSNYD (HCDR1, SEQ ID NO: 60), IWTGGAT (HCDR2, SEQ ID NO: 61), VRDSNYRY-DEPFTY (HCDR3; SEQ ID NO: 62). В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи предложенного антитела к PD-L1 или его антигенсвязывающего домена может иметь три CDR, имеющие следующие последовательности: GFDIKDQY (HCDR1, SEQ ID NO: 65), IDPADGNT (HCDR2, SEQ ID NO: 66), ARGLGAWFAS (HCDR3; SEQ ID NO: 67). В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи предложенного антитела к PD-L1 или его антигенсвязывающего домена может иметь три CDR, имеющие следующие последовательности: GFNIKDQY (HCDR1, SEQ ID NO: 70), IDPANGNT (HCDR2, SEQ ID NO: 71), SRGPPGGIGEYIYAMDY (HCDR3; SEQ ID NO: 72).

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи предложенного антитела к PD-L1 или его антигенсвязывающего домена может иметь три CDR, имеющие следующие последовательности: QSIGTN (LCDR1, SEQ ID NO: 63), YAS (LCDR2), QQSNSWPYT (LCDR3; SEQ ID NO: 64). В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи предложенного антитела к PD-L1 или его антигенсвязывающего домена может иметь три CDR, имеющие следующие последовательности: QDITNS (LCDR1, SEQ ID NO: 68), YTS (LCDR2), QQGHTLPPT (LCDR3; SEQ ID NO: 69). В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи предложенного антитела к PD-L1 или его антигенсвязывающего домена может иметь три CDR, имеющие следующие последовательности: SSVSSSY (LCDR1, SEQ ID NO: 73), STS (LCDR2), HQYHRSPPT (LCDR3; SEQ ID NO: 74).

В некоторых вариантах осуществления предложенное антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую три CDR, имеющие следующие последовательности: GFSLSNYD (HCDR1, SEQ ID NO: 60), IWTGGAT (HCDR2, SEQ ID NO: 61), VRDSNYRYDEPFTY (HCDR3; SEQ ID NO: 62), и вариабельную область легкой цепи, имеющую три CDR, имеющие следующие последовательности: QSIGTN (LCDR1, SEQ ID NO: 63), YAS (LCDR2), QQSNSWPYT (LCDR3; SEQ ID NO: 64). В некоторых вариантах осуществления предложенное антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую три CDR, имеющие следующие последовательности: GFDIKDQY (HCDR1, SEQ ID NO: 65), IDPADGNT (HCDR2, SEQ ID NO: 66), ARGLGAWFAS (HCDR3; SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, имеющую три CDR, имеющие следующие последовательности: QDITNS (LCDR1, SEQ ID NO: 68), YTS (LCDR2), QQGHTLPPT (LCDR3; SEQ ID NO: 69). В некоторых вариантах осуществления предложенное антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую три CDR, имеющие следующие последовательности: GFNIKDQY (HCDR1, SEQ ID NO: 70), IDPANGNT (HCDR2, SEQ ID NO: 71), SRGPPGGIGEYIYAMDY (HCDR3; SEQ ID NO: 72), и вариабельную область легкой цепи, имеющую три CDR, имеющие следующие последовательности: SSVSSSY (LCDR1, SEQ ID NO: 73), STS (LCDR2), HQYHRSPPT (LCDR3; SEQ ID NO: 74).

Если не указано иное, все раскрытые в настоящем документе последовательности CDR определены согласно методу IMGT, как описано в Lefranc, M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999). CDR1 состоит из положений с 27 по 38, CDR2 состоит из положений с 56 по 65, CDR3 для генов V зародышевой линии состоит из положений со 105 по 116, CDR3 для реаранжированных генов V-J или генов V-D-J состоит из положений со 105 по 117 (положение, предшествующее J-PHE или J-TRP 118) с гэпами наверху петли для реаранжированной CDR3-IMGT с менее чем 13 аминокислотами, или с дополнительными положениями 112.1, 111.1, 112.2, 111.2 и т.д. для реаранжированной CDR3-IMGT с более чем 13 аминокислотами. Положения, приведенные в этом абзаце, соответствуют нумерации IMGT, описанной в Lefranc, M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999).

Антитела, специфически связывающиеся с PD-L1, входящие в состав слитых белков согласно изобретению, могут содержать Fc-часть, которая позволяет продлить период полувыведения *in vivo* биспецифической связывающей молекулы согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления такая Fc-часть предпочтительно имеет происхождение от человека, более предпочтительно, представляет собой человеческую Fc-часть антитела IgG1 или IgG4, еще более предпочтительно генетически модифицированную человеческую Fc-часть IgG1 или IgG4 с активированными или подавленными эффекторными функциями. В некоторых вариантах осуществления подавление эффекторных функций может быть предпочтительнее активации эффекторных функций. В некоторых вариантах осуществления такую Fc-часть генетически модифицируют для подавления эффекторных функций посредством мутации(ий) в положениях 234 и/или 235, нумерация согласно индексу EU Кабат (Johnson and Wu, *Nucleic Acids Res*, 2000). В некоторых вариантах осуществления для подавления эффекторных функций могут быть введе-

ны мутации в положениях F234 и L235 предложенного антитела к PD-L1. В других вариантах осуществления для подавления эффекторной функции могут быть введены мутации в положениях D265 и P329 предложенного антитела к PD-L1. Нумерация для обоих наборов этих возможных мутаций приведена согласно индексу EU Кабат (Shields et al., J Biol Chem, 2001).

Различные способы получения антител и их фрагментов хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в Altshuler et al. (2010). Таким образом, например, поликлональные антитела могут быть получены из крови животного после иммунизации антигеном в смеси с добавками и адьювантами, а моноклональные антитела могут быть получены любым методом, который обеспечивает антитела, продуцируемые культурами стабильных клеточных линий. Примеры таких методов описаны, например, Harlow and Lane (1999), (1988), и включают гибридную технологию, впервые описанную Köhler and Milstein, 1975, триомную технологию, технологию гибридомы из человеческих В-клеток (см., например, Li et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2006, Kozbor and Roder, Immunol Today, 1983) и технологию EBV-гибридомы для получения человеческих моноклональных антител (Cole et al., Cancer Res, 1984). Кроме того, рекомбинантные антитела могут быть получены из моноклональных антител или могут быть получены *de novo* с использованием различных методов дисплея, таких как фаговый, рибосомный, мРНК или клеточный дисплей. В некоторых вариантах осуществления подходящая система для экспрессии рекомбинантных (гуманизированных) антител или их фрагментов может быть выбрана, например, из линий клеток бактерий, дрожжей, насекомых, млекопитающих или трансгенных животных или растений см., например, патент США № 6,080,560; Holliger and Hudson, Nat Biotechnol, 2005). Кроме того, методы, описанные для получения одноцепочечных антител (см., среди прочего, патент США № 4,946,778), могут быть адаптированы для получения одноцепочечных антител, специфичных к мишени согласно данному изобретению. Поверхностный плазмонный резонанс, используемый в системе BIAcore, может быть использован для повышения эффективности фаговых антител.

С. Иллюстративные мутации липокалина согласно изобретению.

Липокалина представляют собой белковые связывающие молекулы, которые естественным образом эволюционировали до связывания лигандов. Липокалина содержатся во многих организмах, включая позвоночных, насекомых, растений и бактерий. Члены семейства белков липокалинов (Pervaiz and Brew, FASEB J, 1987), как правило, представляют собой небольшие секреторируемые белки и имеет одну полипептидную цепь. Они характеризуются рядом различных свойств молекулярного распознавания: их связыванием с различными, преимущественно гидрофобными малыми молекулами (такими как ретиноиды, жирные кислоты, холестерин, простагландины, биливердины, феромоны, вкусовые добавки и душики) и их связыванием с определенными рецепторами клеточной поверхности и образованием ими макромолекулярных комплексов. Хотя в прошлом их классифицировали в первую очередь как транспортные белки, теперь ясно, что липокалина выполняют множество физиологических функций. Они включают роль в транспорте ретинола, обонянии, феромоновой сигнализации и синтезе простагландинов. Липокалина также участвуют в регуляции иммунного ответа и опосредовании клеточного гомеостаза (обзор приведен, например, в Flower et al., Biochim Biophys Acta, 2000, Flower, Biochem J, 1996).

Липокалина обладают необычно низким уровнем общей консервативности последовательностей, часто с идентичностью последовательностей менее 20%. Напротив, их общий характер фолдинга в высокой степени консервативен. Центральная часть структуры липокалина состоит из одного восьмичленистого антипараллельного β -листа, образующего замкнутую фигуру, представляющую собой непрерывно связанный водородными связями β -цилиндр. Этот β -цилиндр образует центральную полость. Один конец цилиндра стерически заблокирован N-концевым пептидным сегментом, который проходит через его дно, а также тремя пептидными петлями, соединяющими β -цепи. Другой конец β -цилиндра открыт для растворителя и охватывает сайт связывания мишени, который образован четырьмя гибкими пептидными петлями (AB, CD, EF и GH). Именно разнообразие петель в составе в остальном жесткого каркаса липокалина приводит к возникновению различных механизмов связывания, каждый из которых способен вмещать мишени различного размера, формы и химического характера (обзор приведен, например, в Skerza, Biochim Biophys Acta, 2000, Flower et al., Biochim Biophys Acta, 2000, Flower, Biochem J, 1996).

Мутации липокалина согласно настоящему изобретению может представлять собой мутации любого липокалина. Примеры подходящих липокалинов (также иногда называемых "референсный липокалин", "липокалин дикого типа", "референсные белковые каркасы" или просто "каркасы"), мутации которых можно использовать, включают, не ограничиваясь перечисленным, липокалин слезной жидкости (липокалин-1, T1c или белок железа фон Эбнера), ретинол-связывающий белок, нейтрофильную простагландин-D-синтазу липокалинового типа, β -лактоглобулин, билин-связывающий белок (BBP), аполипопротеин D (APOD), липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов (NGAL), белок, связанный с α 2-микроглобулином (A2m), 24p3/утерокалин (24p3), белок железа фон Эбнера 1 (VEGF 1), белок железа фон Эбнера 2 (VEGF 2) и мажорный аллерген Can f 1 (ALL-1). В связанных вариантах осуществления мутации липокалина получают из группы липокалинов, состоящей из человеческого липокалина слезной жидкости (hT1c), человеческого липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов (hNGAL),

человеческого аполипопротеина D (hAPOD) и билин-связывающего белка из *Pieris brassicae*.

Аминокислотная последовательность мутеина липокалина согласно изобретению может обладать высокой идентичностью последовательности по сравнению с референсным липокалином (или липокалином дикого типа), из которого он получен, например, hTIC или hNGAL, по сравнению с идентичностью последовательностей с другим липокалином (см. также выше). В этом общем контексте аминокислотная последовательность мутеина липокалина согласно изобретению по меньшей мере по существу схожа с аминокислотной последовательностью соответствующего референсного липокалина (дикого типа) при условии, что при выравнивании могут быть использованы гэпы (как определено в настоящем документе), которые являются результатом добавлений или делеций аминокислот. Соответствующая последовательность мутеина липокалина согласно изобретению, будучи по существу схожей с последовательностями соответствующего референсного липокалина (дикого типа), в некоторых вариантах осуществления обладает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90% идентичностью, в том числе по меньшей мере 95% идентичностью последовательности соответствующего липокалина. При этом мутеин липокалина согласно изобретению, безусловно, может содержать замены, как описано в настоящем документе, которые придают мутеину липокалина способность связываться с CD137.

Как правило, мутеин липокалина содержит один или более мутированных аминокислотных остатков - относительно аминокислотной последовательности липокалина дикого типа или референсного липокалина, например, hTIC и hNGAL - в четырех петлях на открытом конце, которые содержат лиганд-связывающий карман и образуют вход в лиганд-связывающий карман (см. выше). Как объяснялось выше, эти области имеют ключевое значение для определения специфичности связывания мутеина липокалина к желаемой мишени. В некоторых вариантах осуществления мутеин липокалина согласно изобретению может также содержать области мутированных аминокислотных остатков за пределами четырех петель. В некоторых вариантах осуществления мутеин липокалина согласно изобретению может содержать один или более мутированных аминокислотных остатков в одной или более из трех пептидных петель (обозначенных BC, DE и FG), соединяющих р-цепи на закрытом конце липокалина. В некоторых вариантах осуществления мутеин, полученный из липокалина слезной жидкости, липокалина NGAL или его гомолога, может иметь 1, 2, 3, 4 или более мутантных аминокислотных остатков в любом положении последовательности в N-концевой области и/или в трех пептидных петлях BC, DE и FG, расположенных на конце β -цилиндрической структуры, противоположной естественному связывающему карману липокалина. В некоторых вариантах осуществления мутеин, полученный из липокалина слезной жидкости, липокалина NGAL или его гомолога, может не иметь мутированных аминокислотных остатков в пептидной петле DE, расположенной на конце β -цилиндрической структуры, по сравнению с последовательностью липокалина слезной жидкости дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления мутеин липокалина согласно изобретению может включать один или более, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или даже более мутированных аминокислотных остатков по сравнению с аминокислотной последовательностью соответствующего референсного липокалина (дикого типа), при условии, что такой мутеин липокалина должен быть способен связываться с CD137. В некоторых вариантах осуществления мутеин липокалина согласно изобретению включает по меньшей мере два, включая 2, 3, 4, 5 или даже более, мутированных аминокислотных остатков, где нативный аминокислотный остаток соответствующего референсного липокалина (дикого типа) замещен остатком аргинина.

Рассматриваются любые типы и количества мутаций, включая замены, делеции и вставки, при условии, что полученный мутеин липокалина сохраняет свою способность связывать CD137 и/или обладает по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, или более высокой идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью референсного липокалина (дикого типа), например, зрелого hTIC или зрелого hNGAL.

В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой консервативную замену. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой неконсервативную замену или одну или более из приведенных ниже иллюстративных замен.

В частности, чтобы определить, соответствует ли аминокислотный остаток в аминокислотной последовательности мутеина липокалина, отличающийся от референсного липокалина (дикого типа), определенному положению в аминокислотной последовательности референсного липокалина (дикого типа), специалист может использовать средства и методы, хорошо известные в данной области техники, например, выравнивания, вручную или с использованием компьютерных программ, таких как BLAST 2.0, что расшифровывается как средство поиска основного локального выравнивания, или ClustalW, или любой другой подходящей программы, которая подходит для генерации выравниваний последовательностей. Соответственно, аминокислотная последовательность референсного липокалина (дикого типа) может служить "рассматриваемой последовательностью" или "референсной последовательностью", в то

время как аминокислотная последовательность мутеина липокалина служит "искомой последовательностью" (см. также выше).

Консервативные замены обычно представляют собой следующие замены, перечисленные в соответствии с подлежащей мутации аминокислотой, за каждой из которых следует одна или более замен, которые можно считать консервативными: Ala→Ser, Thr или Val; Arg→Lys, Gln, Asn или His; Asn→Gln, Glu, Asp или His; Asp→Glu, Gln, Asn или His; Gln→Asn, Asp, Glu или His; Glu→Asp, Asn, Gln или His; His→Arg, Lys, Asn, Gln, Asp или Glu; Ile→Thr, Leu, Met, Phe, Val, Trp, Tyr, Ala или Pro; Leu→Thr, Ile, Val, Met, Ala, Phe, Pro, Tyr или Trp; Lys→Arg, His, Gln или Asn; Met→Thr, Leu, Tyr, Ile, Phe, Val, Ala, Pro или Trp; Phe→Thr, Met, Leu, Tyr, Ile, Pro, Trp, Val или Ala; Ser→Thr, Ala или Val; Thr→Ser, Ala, Val, Ile, Met, Val, Phe, Pro или Leu; Trp→Tyr, Phe, Met, Ile или Leu; Tyr→Trp, Phe, Ile, Leu или Met; Val→Thr, Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Ser или Pro. Другие замены также допустимы и могут быть определены эмпирически или в соответствии с другими известными консервативными или неконсервативными заменами. В качестве дополнительного ориентира каждая из следующих групп содержит аминокислоты, которые обычно можно использовать для определения консервативных замен друг друга:

- (a) Аланин (Ala), серин (Ser), треонин (Thr), валин (Val).
- (b) Аспарагиновая кислота (Asp), глутаминовая кислота (Glu), глутамин (Gln), аспарагин (Asn), гистидин (His).
- (c) Аргинин (Arg), лизин (Lys), глутамин (Gln), аспарагин (Asn), гистидин (His).
- (d) Изолейцин (Ile), лейцин (Leu), метионин (Met), валин (Val), аланин (Ala), фенилаланин (Phe), треонин (Thr), пролин (Pro).
- (e) Изолейцин (Ile), лейцин (Leu), метионин (Met), фенилаланин (Phe), тирозин (Tyr), триптофан (Trp).

Если такие консервативные замены приводят к изменению биологической активности, могут быть внесены более существенные изменения, такие как следующие, или как дополнительно описано ниже со ссылкой на классы аминокислот, и продукты могут быть подвергнуты скринингу на наличие желаемых характеристик. Примерами таких более существенных изменений являются: Ala→Leu или Phe; Arg→Glu; Asn→Ile, Val или Trp; Asp→Met; Cys→Pro; Gln→Phe; Glu→Arg; His→Gly; Ile→Lys, Glu или Gln; Leu→Lys или Ser; Lys→Tyr; Met→Glu; Phe→Glu, Gln или Asp; Trp→Cys; Tyr→Glu или Asp; Val→Lys, Arg, His.

В некоторых вариантах осуществления существенные модификации физических и биологических свойств липокалина (мутеина) достигаются путем выбора замен, которые значительно различаются по своему влиянию на поддержание (a) структуры полипептидного остова в области замены, например, в виде листовой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте, или (c) объема боковой цепи.

Природные остатки делятся на группы на основе общих свойств боковой цепи: (1) гидрофобные: метионин, аланин, валин, лейцин, изолейцин; (2) нейтральные гидрофильные: цистеин, серин, треонин, аспарагин, глутамин; (3) кислые: аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота; (4) основные: гистидин, лизин, аргинин; (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: глицин, пролин; и (6) ароматические: триптофан, тирозин, фенилаланин. В некоторых вариантах осуществления замены могут повлечь за собой замену члена одного из этих классов на другой класс.

Любой остаток цистеина, не участвующий в поддержании надлежащей конформации соответствующего липокалина, также может быть заменен, обычно серином, для улучшения окислительной устойчивости молекулы и предотвращения aberrантного перекрестного связывания. И наоборот, цистеиновая связь (связи) может быть добавлена к липокалину для улучшения его стабильности.

D. Иллюстративные CD137-специфические мутеины липокалина согласно изобретению.

Как отмечалось выше, липокалин представляет собой полипептид, определяемый его супервторичной структурой, а именно, супервторичной структурной областью цилиндрического β-складчатого листа, содержащей восемь β-цепей, соединенных попарно четырьмя петлями на одном конце, образуя, таким образом, связывающий карман. Настоящее описание не ограничивается мутеинами липокалина, конкретно раскрытыми в настоящем документе. В этой связи изобретение относится к мутеину липокалина, имеющему супервторичную структурную область цилиндрического β-складчатого листа, содержащую восемь β-цепей, соединенных попарно четырьмя петлями на одном конце, образуя, таким образом, связывающий карман, в котором по меньшей мере одна аминокислота каждой из по меньшей мере трех из четырех указанных петель была мутирована, и где указанный липокалин эффективен для связывания CD137 с обнаружимой аффинностью.

В некоторых вариантах осуществления мутеины липокалина, раскрытые в настоящем документе, могут представлять собой или содержать мутеин зрелого человеческого липокалина слезной жидкости (hTfс). Мутеин зрелого hTfс может называться в настоящем документе "мутеином hTfс". В некоторых других вариантах осуществления мутеин липокалина, раскрытый в настоящем документе, представляет собой мутеин зрелого человеческого липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов (hNGAL). Мутеин зрелого hNGAL может называться в настоящем документе "мутеином hNGAL".

В одном из аспектов настоящее изобретение включает любое количество мутеинов липокалина, полученных из референсного липокалина (дикого типа), предпочтительно полученных из зрелого hTIC или зрелого hNGAL, которые связывают CD137 с обнаружимой аффинностью. В связанном аспекте изобретение включает различные мутеины липокалинов, способные активировать нисходящие сигнальные пути CD137 путем связывания с CD137. В этом смысле CD137 можно рассматривать как неприродную мишень референсного липокалина (дикого типа), предпочтительно hTIC или hNGAL, где "неприродная мишень" относится к веществу, которое не связывается с референсным липокалином (дикого типа) при физиологических условиях. Путем генетической модификации референсных липокалинов (дикого типа) с помощью одной или более мутаций в определенных положениях последовательности авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что возможно достижение высокой аффинности и высокой специфичности к неприродной мишени, CD137. В некоторых вариантах осуществления в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или даже более триплетах нуклеотидов, кодирующих определенные положения последовательности в липокалине дикого типа, может быть осуществлен случайный мутагенез путем замены подмножества нуклеотидных триплетов в этих положениях с целью создания мутеина липокалина, способного связывать CD137.

В некоторых вариантах осуществления мутеины липокалинов согласно изобретению могут иметь мутацию, включая замену, делецию и вставку аминокислотного остатка(ов) в одном или более положениях последовательности, соответствующих линейной полипептидной последовательности референсного липокалина, предпочтительно hTIC или hNGAL. В некоторых вариантах осуществления количество аминокислотных остатков мутеина липокалина согласно изобретению, которые являются мутированными по сравнению с аминокислотной последовательностью референсного липокалина, предпочтительно hTIC или hNGAL, составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более, например, 25, 30, 35, 40, 45 или 50, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 является предпочтительным, а 9, 10 или 11 даже более предпочтительным. Однако предпочтительно, чтобы мутеин липокалина согласно изобретению оставался способным связывать CD137.

В некоторых вариантах осуществления в мутеине липокалина согласно настоящему изобретению может отсутствовать 1, 2, 3, 4 или более аминокислот на его N-конце и/или 1, 2 или более аминокислот на его C-конце, по сравнению с соответствующим референсным липокалином (дикого типа); например, SEQ ID NO: 34-40. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение охватывает мутеины hTIC, как определено выше, в которых первые один, два, три или четыре N-концевых аминокислотных остатка последовательности зрелого hTIC (His-His-Leu-Leu; положения 1-4) и/или последние один или два C-концевых аминокислотных остатка (Ser-Asp; положения 157-158) линейной полипептидной последовательности зрелого hTIC были подвергнуты делеции (например, SEQ ID NO: 34-40). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение охватывает мутеины hNGAL, как определено выше, в которых аминокислотные остатки (Lys-Asp-Pro, положения 46-48) линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL были подвергнуты делеции (SEQ ID NO: 45). Кроме того, мутеин липокалина согласно изобретению может включать (природную) аминокислотную последовательность дикого типа референсного липокалина (дикого типа), предпочтительно hTIC или hNGAL, вне мутированных положений аминокислотной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления один или более мутированных аминокислотных остатков, включенных в мутеин липокалина согласно изобретению, существенно не затрудняют или не препятствуют связывающей активности к выбранной мишени и фолдингу мутеина. Такие мутации, включая замену, делецию и вставку, могут быть выполнены на уровне ДНК с использованием принятых стандартных методов (Sambrook and Russell, 2001, *Molecular cloning: a laboratory manual*). В некоторых вариантах осуществления мутированный аминокислотный остаток (остатки) в одном или более положениях последовательности, соответствующих линейной полипептидной последовательности референсного липокалина (дикого типа), предпочтительно hTIC или hNGAL, введен посредством случайного мутагенеза путем замены триплета(ов) нуклеотидов, кодирующих соответствующие положения последовательности референсного липокалина, подмножеством триплетов нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления предложенный мутеин липокалина, который связывается с CD137 с обнаружимой аффинностью, может включать по меньшей мере одну аминокислотную замену нативного остатка цистеина другой аминокислотой, например, остатком серина. В некоторых вариантах осуществления мутеин липокалина, который связывает CD137 с обнаружимой аффинностью, может включать один или более ненативных остатков цистеина, заменяющих одну или более аминокислот референсного липокалина (дикого типа), предпочтительно hTIC или hNGAL. В некоторых вариантах осуществления мутеин липокалина согласно изобретению включает по меньшей мере две аминокислотные замены нативной аминокислоты остатком цистеина, чтобы образовать таким образом один или более цистеиновых мостиков. В некоторых вариантах осуществления указанный цистеиновый мостик может соединять по меньшей мере две петлевые области. Определение этих областей используется в настоящем документе в соответствии с (Biochim Biophys Acta, 2000), Flower (1996) и Breustedt et al. (2005).

Как правило, мутеин липокалина согласно изобретению может обладать по меньшей мере 70%, в том числе по меньшей мере приблизительно 80%, например, по меньшей мере приблизительно 85%

идентичностью аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью зрелого hT1c (SEQ ID NO: 1) или зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 2).

В некоторых аспектах настоящего изобретения предложены CD137-связывающие мутеины hT1c. В этом отношении в изобретении предложены один или более мутеинов hT1c, способных связывать CD137 с аффинностью, измеряемой посредством K_D , равной приблизительно 300 нМ, 200 нМ, 150 нМ, 100 нМ или ниже. В некоторых вариантах осуществления предложенные мутеины hT1c способны связывать CD137 со значением EC_{50} приблизительно 250 нМ, 150 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 20 нМ или даже ниже. В некоторых других вариантах осуществления CD137-связывающие мутеины hT1c могут обладать перекрестной реактивностью с CD137 яванского макака (суCD137).

В некоторых вариантах осуществления мутеин hT1c согласно изобретению может препятствовать связыванию CD137L с CD137.

В некоторых вариантах осуществления предложенные мутеины hT1c могут содержать мутированный аминокислотный остаток в одном или более положениях, соответствующих положениям 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 и 153 линейной полипептидной последовательности зрелого hT1c (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления предложенные мутеины hT1c могут содержать мутированный аминокислотный остаток в одном или более положениях, соответствующих положениям 26-34, 55-58, 60-61, 65, 104-106 и 108 линейной полипептидной последовательности зрелого hT1c (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления предложенные мутеины hT1c могут дополнительно содержать мутированный аминокислотный остаток в одном или более положениях, соответствующих положениям 101, 111, 114 и 153 линейной полипептидной последовательности зрелого hT1c (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления предложенные мутеины hT1c могут содержать мутированный аминокислотный остаток в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или даже более положениях, соответствующих положениям 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 и 153 линейной полипептидной последовательности зрелого hT1c (SEQ ID NO: 1). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления предложенные мутеины hT1c способны связывать CD137, в частности, человеческий CD137.

В некоторых вариантах осуществления предложенные мутеины hT1c могут содержать мутированный аминокислотный остаток в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или даже более положениях, соответствующих положениям 26-34, 55-58, 60-61, 65, 104-106 и 108 линейной полипептидной последовательности зрелого hT1c (SEQ ID NO: 1). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления предложенные мутеины hT1c способны связывать CD137, в частности, человеческий CD137.

В некоторых вариантах осуществления мутеин липокалина согласно изобретению может включать по меньшей мере одну аминокислотную замену нативного остатка цистеина, например, остатком серина. В некоторых вариантах осуществления мутеин hT1c согласно изобретению включает аминокислотную замену нативного остатка цистеина в положениях, соответствующих положениям 61 и/или 153 линейной полипептидной последовательности зрелого hT1c (SEQ ID NO: 1), другой аминокислотой, такой как остаток серина. В этом контексте следует отметить, что было обнаружено, что удаление структурной дисульфидной связи (на уровне соответствующей наивной библиотеки нуклеиновых кислот) hT1c дикого типа, которая образована остатками цистеина 61 и 153 (cf. Breustedt et al., J Biol Chem, 2005), может обеспечить мутеины hT1c, которые не только стабильно свернуты, но также способны связывать выбранную неприродную мишень с высокой аффинностью. В некоторых вариантах осуществления устранение структурной дисульфидной связи может обеспечить дополнительное преимущество, состоящее в возможности создания или преднамеренного введения неприродных дисульфидных связей в мутеины согласно изобретению, что повышает стабильность мутеинов. Однако мутеины hT1c, которые связывают CD137 и которые имеют дисульфидный мостик, образованный между Cys 61 и Cys 153, также являются частью настоящего изобретения.

В некоторых частных вариантах осуществления мутеин hT1c согласно изобретению может включать одну или более аминокислотных замен Cys 61→Ala, Phe, Lys, Arg, Thr, Asn, Gly, Gln, Asp, Asn, Leu, Tyr, Met, Ser, Pro или Trp и/или Cys 153→Ser или Ala, в положениях, соответствующих положениям 61 и/или 153 линейной полипептидной последовательности зрелого hT1c (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления либо два, либо все три цистеиновых кодона в положениях, соответствующих положениям 61, 101 и 153 линейной полипептидной последовательности зрелого hT1c (SEQ ID NO: 1), заменены кодоном другой аминокислоты. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления мутеин hT1c согласно изобретению включает аминокислотную замену нативного остатка цистеина в положении, соответствующем положению 101 линейной полипептидной последовательности зрелого hT1c (SEQ ID NO: 1), остатком серина или гистидина.

В некоторых вариантах осуществления мутеин согласно изобретению содержит аминокислотную замену нативной аминокислоты остатком цистеина в положениях, соответствующих положениям 28 или 105 линейной полипептидной последовательности зрелого hT1c (SEQ ID NO: 1). Кроме того, в некоторых вариантах осуществления мутеин согласно изобретению содержит аминокислотную замену нативного

остатка аргинина в положении, соответствующем положению 111 линейной полипептидной последовательности зрелого hTlc (SEQ ID NO: 1), остатком пролина. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления мутеин согласно изобретению содержит аминокислотную замену нативного остатка лизина в положении, соответствующем положению 114 линейной полипептидной последовательности зрелого hTlc (SEQ ID NO: 1), остатком триптофана или глутаминовой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления предложенные CD137-связывающие мутеины hTlc могут содержать в одном или более положениях, соответствующих положениям 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 и 153 линейной полипептидной последовательности зрелого hTlc (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих мутированных аминокислотных остатков: Ala 5→Val или Thr; Arg 26→Glu; Glu 27→Gly; Phe 28→Cys; Pro 29→Arg; Glu 30→Pro; Met 31→Trp; Leu 33→Ile; Glu 34→Phe; Thr 42→Ser; Gly 46→Asp; Lys 52→Glu; Leu 56→Ala; Ser 58→Asp; Arg 60→Pro; Cys 61→Ala; Lys 65→Arg или Asn; Thr 71→Ala; Val 85→Asp; Lys 94→Arg или Glu; Cys 101→Ser; Glu 104→Val; Leu 105→Cys; His 106→Asp; Lys 108→Ser; Arg 111→Pro; Lys 114→Trp; Lys 121→Glu; Ala 133→Thr; Arg 148→Ser; Ser 150→Ile; и Cys 153→Ser. В некоторых вариантах осуществления мутеин hTlc согласно изобретению содержит два или более, например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или более, или даже все мутированные аминокислотные остатки в этих положениях последовательности зрелого hTlc (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления предложенные CD137-связывающие мутеины hTlc могут содержать один из следующих наборов мутированных аминокислотных остатков по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hTlc (SEQ ID NO: 1):

(a) Arg 26→Glu; Glu 27→Gly; Phe 28→Cys; Pro 29→Arg; Glu 30→Pro; Met 31→Trp; Leu 33→Ile; Glu 34→Phe; Leu 56→Ala; Ser 58→Asp; Arg 60→Pro; Cys 61→Ala; Cys 101→Ser; Glu 104→Val; Leu 105→Cys; His 106→Asp; Lys 108→Ser; Arg 111→Pro; Lys 114→Trp; и Cys 153→Ser;

(b) Ala 5→Thr; Arg 26→Glu; Glu 27→Gly; Phe 28→Cys; Pro 29→Arg; Glu 30→Pro; Met 31→Trp; Leu 33→Ile; Glu 34→Phe; Leu 56→Ala; Ser 58→Asp; Arg 60→Pro; Cys 61→Ala; Lys 65→Arg; Val 85→Asp; Cys 101→Ser; Glu 104→Val; Leu 105→Cys; His 106→Asp; Lys 108→Ser; Arg 111→Pro; Lys 114→Trp; Lys 121→Glu; Ala 133→Thr; и Cys 153→Ser;

(c) Arg 26→Glu; Glu 27→Gly; Phe 28→Cys; Pro 29→Arg; Glu 30→Pro; Met 31→Trp; Leu 33→Ile; Glu 34→Phe; Leu 56→Ala; Ser 58→Asp; Arg 60→Pro; Cys 61→Ala; Lys 65→Asn; Lys 94→Arg; Cys 101→Ser; Glu 104→Val; Leu 105→Cys; His 106→Asp; Lys 108→Ser; Arg 111→Pro; Lys 114→Trp; Lys 121→Glu; Ala 133→Thr; и Cys 153→Ser;

(d) Ala 5→Val; Arg 26→Glu; Glu 27→Gly; Phe 28→Cys; Pro 29→Arg; Glu 30→Pro; Met 31→Trp; Leu 33→Ile; Glu 34→Phe; Leu 56→Ala; Ser 58→Asp; Arg 60→Pro; Cys 61→Ala; Lys 65→Arg; Lys 94→Glu; Cys 101→Ser; Glu 104→Val; Leu 105→Cys; His 106→Asp; Lys 108→Ser; Arg 111→Pro; Lys 114→Trp; Lys 121→Glu; Ala 133→Thr; и Cys 153→Ser;

(e) Arg 26→Glu; Glu 27→Gly; Phe 28→Cys; Pro 29→Arg; Glu 30→Pro; Met 31→Trp; Leu 33→Ile; Glu 34→Phe; Thr 42→Ser; Leu 56→Ala; Ser 58→Asp; Arg 60→Pro; Cys 61→Ala; Cys 101→Ser; Glu 104→Val; Leu 105→Cys; His 106→Asp; Lys 108→Ser; Arg 111→Pro; Lys 114→Trp; Ser 150→Ile; и Cys 153→Ser;

(f) Arg 26→Glu; Glu 27→Gly; Phe 28→Cys; Pro 29→Arg; Glu 30→Pro; Met 31→Trp; Leu 33→Ile; Glu 34→Phe; Lys 52→Glu; Leu 56→Ala; Ser 58→Asp; Arg 60→Pro; Cys 61→Ala; Thr 71→Ala; Cys 101→Ser; Glu 104→Val; Leu 105→Cys; His 106→Asp; Lys 108→Ser; Arg 111→Pro; Lys 114→Trp; Ala 133→Thr; Arg 148→Ser; Ser 150→Ile; и Cys 153→Ser; и

(g) Ala 5→Thr; Arg 26→Glu; Glu 27→Gly; Phe 28→Cys; Pro 29→Arg; Glu 30→Pro; Met 31→Trp; Leu 33→Ile; Glu 34→Phe; Gly 46→Asp; Leu 56→Ala; Ser 58→Asp; Arg 60→Pro; Cys 61→Ala; Thr 71→Ala; Cys 101→Ser; Glu 104→Val; Leu 105→Cys; His 106→Asp; Lys 108→Ser; Arg 111→Pro; Lys 114→Trp; Ser 150→Ile; и Cys 153→Ser.

В некоторых вариантах осуществления остаточная область, то есть область, отличная от положений, соответствующих положениям 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 и 153 линейной полипептидной последовательности зрелого hTlc (SEQ ID NO: 1), в мутеине hTlc согласно изобретению может содержать (природную) аминокислотную последовательность дикого типа линейной полипептидной последовательности зрелого hTlc вне мутированных положений аминокислотной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления мутеин hTlc согласно изобретению обладает по меньшей мере 70% идентичностью последовательности или по меньшей мере 70% гомологией последовательности с последовательностью зрелого hTlc (SEQ ID NO: 1). В качестве иллюстративного примера мутеин SEQ ID NO: 34 обладает идентичностью аминокислотной последовательности или гомологией последовательности, равной приблизительно 84%, с аминокислотной последовательностью зрелого hTlc.

В некоторых вариантах осуществления мутеин hTlc согласно изобретению содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 34-40, или ее фрагмент или вариант.

В некоторых вариантах осуществления мутеин hTlc согласно изобретению обладает по меньшей

мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или более высокой идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-40.

Настоящее изобретение также включает структурные гомологи мутеина hTc, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-40, причем структурные гомологи обладают гомологией или идентичностью аминокислотной последовательности относительно указанного мутеина hTc, равной более приблизительно 60%, предпочтительно более 65%, более 70%, более 75%, более 80%, более 85%, более 90%, более 92% и наиболее предпочтительно более 95%.

В некоторых аспектах настоящего изобретения предложены CD137-связывающие мутеины hNGAL. В этом отношении в изобретении предложены один или более мутеинов hNGAL, способных связывать CD137 с аффинностью, измеряемой посредством K_D , равной приблизительно 800 нМ, 700 нМ, 200 нМ, 140 нМ, 100 нМ или ниже, предпочтительно приблизительно 70 нМ, 50 нМ, 30 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 2 нМ, или даже ниже. В некоторых вариантах осуществления предложенные мутеины hNGAL способны связывать CD137 со значением EC_{50} приблизительно 1000 нМ, 500 нМ, 100 нМ, 80 нМ, 50 нМ, 25 нМ, 18 нМ, 15 нМ, 10 нМ, 5 нМ или ниже.

В некоторых вариантах осуществления CD137-связывающие мутеины hNGAL могут обладать перекрестной реактивностью с CD137 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления предложенные мутеины hNGAL способны связывать CD137 яванского макака с аффинностью, измеряемой посредством K_D , равной приблизительно 50 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 2 нМ или даже ниже. В некоторых вариантах осуществления предложенные мутеины hNGAL способны связывать CD137 яванского макака со значением EC_{50} приблизительно 100 нМ, 80 нМ, 50 нМ, 30 нМ или даже ниже.

В некоторых вариантах осуществления мутеин hNGAL согласно изобретению может препятствовать связыванию CD137L с CD137 или конкурировать за него. В некоторых других вариантах осуществления мутеин hNGAL согласно изобретению может быть способен связывать CD137 в присутствии CD137L и/или связывать комплекс CD137/CD137L.

В некоторых вариантах осуществления предложенные мутеины hNGAL могут содержать мутированный аминокислотный остаток в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 2).

В некоторых вариантах осуществления предложенные мутеины hNGAL могут содержать мутированный аминокислотный остаток в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или даже более положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 2). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления предложенные мутеины hNGAL способны связывать CD137, в частности, человеческий CD137.

В некоторых вариантах осуществления предложенные мутеины hNGAL могут содержать мутированный аминокислотный остаток в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 2). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления предложенные мутеины hNGAL способны связывать CD137, в частности, человеческий CD137.

В некоторых вариантах осуществления предложенные мутеины hNGAL могут содержать мутированный аминокислотный остаток в одном или более положениях, соответствующих положениям 36, 87 и 96 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 2), и в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 94, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 2).

В некоторых других вариантах осуществления предложенные мутеины hNGAL могут содержать мутированный аминокислотный остаток в одном или более положениях, соответствующих положениям 20, 25, 28, 33, 36, 40-41, 44, 49, 52, 59, 68, 70-73, 77-82, 87, 92, 96, 98, 100, 101, 103, 122, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 2).

В других вариантах осуществления предложенные мутеины hNGAL могут содержать мутированный аминокислотный остаток в одном или более положениях 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 96, 100, 103, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 2), и в одном или более положениях, соответствующих положениям 20, 25, 33, 44, 59, 71, 78, 80, 82, 87, 92, 98, 101 и 122 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 2).

В некоторых вариантах осуществления мутеин липокалина согласно изобретению может содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену нативного остатка цистеина, например, остатком серина. В некоторых вариантах осуществления мутеин hNGAL согласно изобретению может содержать аминокислотную замену нативного остатка цистеина в положениях, соответствующих положениям 76 и/или 175 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 2), другой аминокислотой, такой как остаток серина. В этом контексте следует отметить, что было обнаружено, что удаление структурной дисульфидной связи (на уровне соответствующей наивной библиотеки нуклеиновых ки-

слот) hNGAL дикого типа, которая образована остатками цистеина 76 и 175 (cf. Breustedt et al., J Biol Chem, 2005), может обеспечить мутеины hNGAL, которые не только стабильно свернуты, но также способны связывать выбранную неприродную мишень с высокой аффинностью. В некоторых вариантах осуществления устранение структурной дисульфидной связи может обеспечить дополнительное преимущество, состоящее в возможности создания или преднамеренного введения неприродных дисульфидных связей в мутеины согласно изобретению, что повышает стабильность мутеинов. Однако мутеины hNGAL, которые связывают CD137 и которые имеют дисульфидный мостик, образованный между Cys 76 и Cys 175, также являются частью настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления предложенные CD137-связывающие мутеины hNGAL могут содержать в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 2), один или более из следующих мутированных аминокислотных остатков. Gln 28→His; Leu 36→Gln; Ala 40→Ile; Ile 41→Arg или Lys; Gln 49→Val, Ile, His, Ser или Asn; Tyr 52→Met; Asn 65→Asp; Ser 68→Met, Ala или Gly; Leu 70→Ala, Lys, Ser или Thr; Arg 72→Asp; Lys 73→Asp; Asp 77→Met, Arg, Thr или Asn; Trp 79→Ala или Asp; Arg 81→Met, Trp или Ser; Phe 83→Leu; Cys 87→Ser; Leu 94→Phe; Asn 96→Lys; Tyr 100→Phe; Leu 103→His; Tyr 106→Ser; Lys 125→Phe; Ser 127→Phe; Tyr 132→Glu и Lys 134→Tyr. В некоторых вариантах осуществления мутеин hNGAL согласно изобретению содержит два или более, например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, даже более, например, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, или все мутированные аминокислотные остатки в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 2).

В некоторых вариантах осуществления предложенные CD137-связывающие мутеины hNGAL могут содержать в одном или более положениях, соответствующих положениям 20, 25, 28, 33, 36, 40-41, 44, 49, 52, 59, 68, 70-73, 77-82, 87, 92, 96, 98, 100, 101, 103, 122, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 2), один или более из следующих мутированных аминокислотных остатков. Gln 20→Arg; Asn 25→Tyr или Asp; Gln 28→His; Val 33→Ile; Leu 36→Met; Ala 40→Asn; Ile 41→Leu; Glu 44→Val или Asp; Gln 49→His; Tyr 52→Ser или Gly; Lys 59→Asn; Ser 68→Asp; Leu 70→Met; Phe 71→Leu; Arg 72→Leu; Lys 73→Asp; Asp 77→Gln или His; Tyr 78→His; Trp 79→Ile; Ile 80→Asn; Arg 81→Trp или Gln; Thr 82→Pro; Cys 87→Ser; Phe 92→Leu или Ser; Asn 96→Phe; Lys 98→Arg; Tyr 100→Asp; Pro 101→Leu; Leu 103→His или Pro; Phe 122→Tyr; Lys 125→Ser; Ser 127→Ile; Tyr 132→Trp; и Lys 134→Gly.

В некоторых вариантах осуществления предложенные CD137-связывающие мутеины hNGAL могут содержать в одном или более положениях, соответствующих положениям 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 96, 100, 103, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 2), один или более из следующих мутированных аминокислотных остатков. Leu 36→Met; Ala 40→Asn; Ile 41→Leu; Gln 49→His; Tyr 52→Ser или Gly; Ser 68→Asp; Leu 70→Met; Arg 72→Leu; Lys 73→Asp; Asp 77→Gln или His; Trp 79→Ile; Arg 81→Trp или Gln; Asn 96→Phe; Tyr 100→Asp; Leu 103→His или Pro; Lys 125→Ser; Ser 127→Ile; Tyr 132→Trp; и Lys 134→Gly. В некоторых вариантах осуществления предложенные CD137-связывающие мутеины hNGAL могут содержать в одном или более положениях, соответствующих положениям 20, 25, 33, 44, 59, 71, 78, 80, 82, 87, 92, 98, 101 и 122 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 2), один или более из следующих мутированных аминокислотных остатков. Gln 20→Arg; Asn 25→Tyr или Asp; Val 33→Ile; Glu 44→Val или Asp; Lys 59→Asn; Phe 71→Leu; Tyr 78→His; Ile 80→Asn; Thr 82→Pro; Phe 92→Leu или Ser; Lys 98→Arg; Pro 101→Leu; и Phe 122→Tyr.

В некоторых вариантах осуществления предложенные CD137-связывающие мутеины hNGAL могут содержать один из следующих наборов мутированных аминокислотных остатков по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 2):

(a) Gln 28→His; Leu 36→Gln; Ala 40→Ile; Ile 41→Lys; Gln 49→Asn; Tyr 52→Met; Ser 68→Gly; Leu 70→Thr; Arg 72→Asp; Lys 73→Asp; Asp 77→Thr; Trp 79→Ala; Arg 81→Ser; Cys 87→Ser; Asn 96→Lys; Tyr 100→Phe; Leu 103→His; Tyr 106→Ser; Lys 125→Phe; Ser 127→Phe; Tyr 132→Glu; и Lys 134→Tyr;

(b) Gln 28→His; Leu 36→Gln; Ala 40→Ile; Ile 41→Arg; Gln 49→Ile; Tyr 52→Met; Asn 65→Asp; Ser 68→Met; Leu 70→Lys; Arg 72→Asp; Lys 73→Asp; Asp 77→Met; Trp 79→Asp; Arg 81→Trp; Cys 87→Ser; Asn 96→Lys; Tyr 100→Phe; Leu 103→His; Tyr 106→Ser; Lys 125→Phe; Ser 127→Phe; Tyr 132→Glu; и Lys 134→Tyr;

(c) Gln 28→His; Leu 36→Gln; Ala 40→Ile; Ile 41→Arg; Gln 49→Asn; Tyr 52→Met; Asn 65→Asp; Ser 68→Ala; Leu 70→Ala; Arg 72→Asp; Lys 73→Asp; Asp 77→Thr; Trp 79→Asp; Arg 81→Trp; Cys 87→Ser; Asn 96→Lys; Tyr 100→Phe; Leu 103→His; Tyr 106→Ser; Lys 125→Phe; Ser 127→Phe; Tyr 132→Glu; и Lys 134→Tyr;

(d) Gln 28→His; Leu 36→Gln; Ala 40→Ile; Ile 41→Lys; Gln 49→Asn; Tyr 52→Met; Asn 65→Asp; Ser 68→Ala; Leu 70→Ala; Arg 72→Asp; Lys 73→Asp; Asp 77→Thr; Trp 79→Asp; Arg 81→Trp; Cys 87→Ser; Asn 96→Lys; Tyr 100→Phe; Leu 103→His; Tyr 106→Ser; Lys 125→Phe; Ser 127→Phe; Tyr 132→Glu; и Lys 134→Tyr;

134→Tyr;

(e) Gln 28→His; Leu 36→Gln; Ala 40→Ile; Ile 41→Lys; Gln 49→Ser; Tyr 52→Met; Asn 65→Asp; Ser 68→Gly; Leu 70→Ser; Arg 72→Asp; Lys 73→Asp; Asp 77→Thr; Trp 79→Ala; Arg 81→Met; Cys 87→Ser; Asn 96→Lys; Tyr 100→Phe; Leu 103→His; Tyr 106→Ser; Lys 125→Phe; Ser 127→Phe; Tyr 132→Glu; и Lys 134→Tyr;

(f) Gln 28→His; Leu 36→Gln; Ala 40→Ile; Ile 41→Lys; Gln 49→Val; Tyr 52→Met; Asn 65→Asp; Ser 68→Gly; Leu 70→Thr; Arg 72→Asp; Lys 73→Asp; Asp 77→Arg; Trp 79→Asp; Arg 81→Ser; Cys 87→Ser; Leu 94→Phe; Asn 96→Lys; Tyr 100→Phe; Leu 103→His; Tyr 106→Ser; Lys 125→Phe; Ser 127→Phe; Tyr 132→Glu; и Lys 134→Tyr;

(g) Gln 28→His; Leu 36→Gln; Ala 40→Ile; Ile 41→Arg; Gln 49→His; Tyr 52→Met; Asn 65→Asp; Ser 68→Gly; Leu 70→Thr; Arg 72→Asp; Lys 73→Asp; Asp 77→Thr; Trp 79→Ala; Arg 81→Ser; Cys 87→Ser; Asn 96→Lys; Tyr 100→Phe; Leu 103→His; Tyr 106→Ser; Lys 125→Phe; Ser 127→Phe; Tyr 132→Glu; и Lys 134→Tyr;

(h) Gln 28→His; Leu 36→Gln; Ala 40→Ile; Ile 41→Lys; Gln 49→Asn; Tyr 52→Met; Asn 65→Asp; Ser 68→Gly; Leu 70→Thr; Arg 72→Asp; Lys 73→Asp; Asp 77→Thr; Trp 79→Ala; Arg 81→Ser; Phe 83→Leu; Cys 87→Ser; Leu 94→Phe; Asn 96→Lys; Tyr 100→Phe; Leu 103→His; Tyr 106→Ser; Lys 125→Phe; Ser 127→Phe; Tyr 132→Glu; и Lys 134→Tyr; или

(i) Gln 28→His; Leu 36→Gln; Ala 40→Ile; Ile 41→Arg; Gln 49→Ser; Tyr 52→Met; Asn 65→Asp; Ser 68→Ala; Leu 70→Thr; Arg 72→Asp; Lys 73→Asp; Asp 77→Asn; Trp 79→Ala; Arg 81→Ser; Cys 87→Ser; Asn 96→Lys; Tyr 100→Phe; Leu 103→His; Tyr 106→Ser; Lys 125→Phe; Ser 127→Phe; Tyr 132→Glu; и Lys 134→Tyr.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления в остаточной области, то есть области, отличной от положений 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 2), мутеин hNGAL согласно изобретению может включать (природную) аминокислотную последовательность дикого типа зрелого hNGAL вне мутированных положений аминокислотной последовательности.

В некоторых других вариантах осуществления предложенные CD137-связывающие мутеины hNGAL могут содержать один из следующих наборов мутированных аминокислотных остатков по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 2):

(a) Leu 36→Met; Ala 40→Asn; Ile 41→Leu; Gln 49→His; Tyr 52→Ser; Ser 68→Asp; Leu 70→Met; Arg 72→Leu; Lys 73→Asp; Asp 77→Gln; Trp 79→Ile; Arg 81→Trp; Asn 96→Phe; Tyr 100→Asp; Leu 103→His; Lys 125→Ser; Ser 127→Ile; Tyr 132→Trp; и Lys 134→Gly;

(b) Leu 36→Met; Ala 40→Asn; Ile 41→Leu; Gln 49→His; Tyr 52→Ser; Ser 68→Asp; Leu 70→Met; Arg 72→Leu; Lys 73→Asp; Asp 77→Gln; Trp 79→Ile; Arg 81→Trp; Phe 92→Leu; Asn 96→Phe; Lys 98→Arg; Tyr 100→Asp; Pro 101→Leu; Leu 103→His; Lys 125→Ser; Ser 127→Ile; Tyr 132→Trp; и Lys 134→Gly;

(c) Asn 25→Tyr; Leu 36→Met; Ala 40→Asn; Ile 41→Leu; Gln 49→His; Tyr 52→Gly; Ser 68→Asp; Leu 70→Met; Phe 71→Leu; Arg 72→Leu; Lys 73→Asp; Asp 77→Gln; Trp 79→Ile; Arg 81→Gln; Phe 92→Ser; Asn 96→Phe; Tyr 100→Asp; Leu 103→His; Lys 125→Ser; Ser 127→Ile; Tyr 132→Trp; и Lys 134→Gly;

(d) Leu 36→Met; Ala 40→Asn; Ile 41→Leu; Gln 49→His; Tyr 52→Gly; Ser 68→Asp; Leu 70→Met; Arg 72→Leu; Lys 73→Asp; Asp 77→Gln; Tyr 78→His; Trp 79→Ile; Arg 81→Trp; Phe 92→Leu; Asn 96→Phe; Tyr 100→Asp; Leu 103→His; Lys 125→Ser; Ser 127→Ile; Tyr 132→Trp; и Lys 134→Gly;

(e) Asn 25→Asp; Leu 36→Met; Ala 40→Asn; Ile 41→Leu; Gln 49→His; Tyr 52→Gly; Ser 68→Asp; Leu 70→Met; Arg 72→Leu; Lys 73→Asp; Asp 77→Gln; Trp 79→Ile; Arg 81→Trp; Phe 92→Leu; Asn 96→Phe; Tyr 100→Asp; Leu 103→His; Lys 125→Ser; Ser 127→Ile; Tyr 132→Trp; и Lys 134→Gly;

(f) Val 33→Ile; Leu 36→Met; Ala 40→Asn; Ile 41→Leu; Gln 49→His; Tyr 52→Gly; Ser 68→Asp; Leu 70→Met; Arg 72→Leu; Lys 73→Asp; Asp 77→Gln; Trp 79→Ile; Arg 81→Trp; Phe 92→Leu; Asn 96→Phe; Tyr 100→Asp; Leu 103→His; Lys 125→Ser; Ser 127→Ile; Tyr 132→Trp; и Lys 134→Gly;

(g) Gln 20→Arg; Leu 36→Met; Ala 40→Asn; Ile 41→Leu; Glu 44→Val; Gln 49→His; Tyr 52→Gly; Ser 68→Asp; Leu 70→Met; Arg 72→Leu; Lys 73→Asp; Asp 77→Gln; Trp 79→Ile; Arg 81→Trp; Phe 92→Leu; Asn 96→Phe; Tyr 100→Asp; Leu 103→His; Phe 122→Tyr; Lys 125→Ser; Ser 127→Ile; Tyr 132→Trp; и Lys 134→Gly;

(h) Leu 36→Met; Ala 40→Asn; Ile 41→Leu; Gln 49→His; Tyr 52→Ser; Ser 68→Asp; Leu 70→Met; Arg 72→Leu; Lys 73→Asp; Asp 77→Gln; Trp 79→Ile; Ile 80→Asn; Arg 81→Trp; Thr 82→Pro; Asn 96→Phe; Tyr 100→Asp; Pro 101→Leu; Leu 103→Pro; Lys 125→Ser; Ser 127→Ile; Tyr 132→Trp; и Lys 134→Gly;

(i) Leu 36→Met; Ala 40→Asn; Ile 41→Leu; Gln 49→His; Tyr 52→Gly; Lys 59→Asn; Ser 68→Asp; Leu 70→Met; Arg 72→Leu; Lys 73→Asp; Asp 77→Gln; Trp 79→Ile; Arg 81→Trp; Phe 92→Leu; Asn 96→Phe; Tyr 100→Asp; Leu 103→His; Lys 125→Ser; Ser 127→Ile; Tyr 132→Trp; и Lys 134→Gly; и

(j) Leu 36→Met; Ala 40→Asn; Ile 41→Leu; Glu 44→Asp; Gln 49→His; Tyr 52→Ser; Ser 68→Asp; Leu

70→Met; Phe 71→Leu; Arg 72→Leu; Lys 73→Asp; Asp 77→His; Trp 79→Ile; Arg 81→Trp; Phe 92→Leu; Asn 96→Phe; Tyr 100→Asp; Leu 103→His; Lys 125→Ser; Ser 127→Ile; Tyr 132→Trp; и Lys 134→Gly.

В некоторых вариантах осуществления в остаточной области, то есть области, отличной от положений 20, 25, 28, 33, 36, 40-41, 44, 49, 52, 59, 68, 70-73, 77-82, 87, 92, 96, 98, 100, 101, 103, 122, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 2), мутеин hNGAL согласно изобретению может включать (природную) аминокислотную последовательность дикого типа зрелого hNGAL вне мутированных положений аминокислотной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления мутеин hNGAL согласно изобретению обладает по меньшей мере 70% идентичностью последовательности или по меньшей мере 70% гомологией последовательности с последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 2). В качестве иллюстративного примера мутеин SEQ ID NO: 42 обладает идентичностью аминокислотной последовательности или гомологией последовательности, равной приблизительно 87%, с аминокислотной последовательностью зрелого hNGAL.

В некоторых вариантах осуществления мутеин hNGAL согласно изобретению содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 41-59, или ее фрагмент или вариант.

В некоторых вариантах осуществления мутеин hNGAL согласно изобретению обладает по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или более высокой идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 41-59.

Настоящее изобретение также включает структурные гомологи мутеина hNGAL, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 41-59, причем структурные гомологи обладают гомологией или идентичностью аминокислотной последовательности относительно указанного мутеина hNGAL, равной приблизительно 60%, предпочтительно более 65%, более 70%, более 75%, более 80%, более 85%, более 90%, более 92% и наиболее предпочтительно более 95%.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен мутеин липокалина, который связывает CD137 с аффинностью, измеряемой посредством K_D , равной приблизительно 5 нМ или ниже, где мутеин липокалина обладает по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или более высокой идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления мутеин липокалина согласно настоящему изобретению может содержать гетерологичную аминокислотную последовательность на его N- или C-конце, предпочтительно C-конце, такую как метка Strep II tag (SEQ ID NO: 12) или последовательность сайта расщепления для некоторых ферментов рестрикции, не оказывающие влияния на биологическую активность мутеина липокалина (связывание с его мишенью, например, CD137).

В некоторых вариантах осуществления в мутеин липокалина могут быть введены дополнительные модификации для того, чтобы модулировать некоторые характеристики мутеина, например, для улучшения стабильности фолдинга, стабильности в сыворотке, устойчивости белка или растворимости в воде, или для уменьшения склонности к агрегации, или чтобы придать мутину новые характеристики. В некоторых вариантах осуществления модификация(и) может привести к модуляции двух или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) характеристик предложенного мутеина.

Например, можно мутировать одно или более положений аминокислотной последовательности мутеина липокалина, чтобы ввести новые реакционноспособные группы, например, для конъюгации с другими соединениями, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ), гидроксипропилкрахмал (ГЭК), биотин, пептиды или белки, или для образования не встречающихся в природе дисульфидных связей. Конъюгированное соединение, например, ПЭГ и ГЭК, может в некоторых случаях увеличивать период полувыведения из сыворотки соответствующего мутеина липокалина.

В некоторых вариантах осуществления реакционноспособная группа мутеина липокалина может естественным образом содержаться в его аминокислотной последовательности, например, природные остатки цистеина в указанной аминокислотной последовательности. В некоторых других вариантах осуществления такая реакционноспособная группа может быть введена посредством мутагенеза. В случае, если реакционноспособная группа вводится посредством мутагенеза, одной из возможностей является мутация аминокислоты в соответствующем положении в остаток цистеина. Примеры таких возможных мутаций для введения остатка цистеина в аминокислотную последовательность мутеина hTc включают замены Thr 40→Cys, Glu 73→Cys, Arg 90→Cys, Asp 95→Cys и Glu 131→Cys последовательности hTc дикого типа (SEQ ID NO: 1). Примеры таких возможных мутаций для введения остатка цистеина в аминокислотную последовательность мутеина hNGAL включают введение остатка цистеина в одно или более положений последовательности, которые соответствуют положениям 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 или 158 последовательности hNGAL дикого типа (SEQ ID NO: 2). Образованный тиольный фрагмент может быть использован для ПЭГилирования или ГЭКилирования мутеина, например, для увеличения периода полувыведения из сыворотки соответствующего мутеина липокалина.

В некоторых вариантах осуществления, чтобы обеспечить подходящие боковые цепи аминокислот

в качестве новых реакционноспособных групп для конъюгирования одного из вышеуказанных соединений с мутеином липокалина, в аминокислотную последовательность мутеина липокалина могут быть введены искусственные аминокислоты. Обычно такие искусственные аминокислоты предназначены для того, чтобы быть более реакционноспособными и, таким образом, облегчить конъюгацию с желаемым соединением. Такие искусственные аминокислоты могут быть введены путем мутагенеза, например, с использованием искусственной тРНК может быть введен пара-ацетилфенилаланин.

В некоторых вариантах осуществления мутеин липокалина согласно изобретению слит на его N-конце или его C-конце с белком, белковым доменом или пептидом, например, антителом, сигнальной последовательностью и/или аффинной меткой. В некоторых других вариантах осуществления мутеин липокалина согласно изобретению конъюгирован на его N-конце или его C-конце с партнером, представляющим собой белок, белковый домен или пептид, например, антитело, сигнальную последовательность и/или аффинную метку.

Аффинные метки, такие как метка Strep-tag или метка Strep-tag II (Schmidt et al., J Mol Biol, 1996), метка с-мус, FLAG-метка, His-метка или HA-метка, или белки, такие как глутатион-S-трансфераза, которые позволяют легко обнаруживать и/или очищать рекомбинантные белки, являются примерами подходящих партнеров по слиянию. Белки с хромогенными или флуоресцентными свойствами, такие как зеленый флуоресцентный белок (GFP) или желтый флуоресцентный белок (YFP), также являются подходящими партнерами по слиянию для мутеинов липокалина согласно изобретению. В целом мутеины липокалина согласно изобретению могут быть мечены любым подходящим химическим веществом или ферментом, который прямо или опосредованно генерирует детектируемое соединение или сигнал в химической, физической, оптической или ферментативной реакции. Например, флуоресцентная или радиоактивная метка может быть конъюгирована с мутеином липокалина для генерации флуоресценции или рентгеновских лучей в качестве детектируемого сигнала. Щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена и р-галактозидаза являются примерами ферментных меток (и в то же время оптических меток), которые катализируют образование хромогенных продуктов реакции. В целом все метки, обычно используемые для антител (за исключением меток, используемых исключительно с сахарным фрагментом в Fc-части иммуноглобулинов), также можно использовать для конъюгации с мутеинами липокалина согласно изобретению.

В некоторых вариантах осуществления мутеин липокалина согласно изобретению может быть слит или конъюгирован с фрагментом, который продлевает период полувыведения мутеина из сыворотки (в этой связи см. также публикацию международной патентной заявки WO 2006/056464, где описаны такие стратегии с ссылкой на мутеины человеческого липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов (hNGAL), с аффинностью связывания с CTLA-4). Фрагмент, продлевающий период полувыведения из сыворотки, может представлять собой, например, молекулу ПЭГ, молекулу ГЭК, молекулу жирной кислоты, такую как пальмитиновая кислота (Vajo and Duckworth, Pharmacol Rev, 2000), Fc-часть иммуноглобулина, домен C_H3 иммуноглобулина, домен C_H4 иммуноглобулина, альбумин-связывающий пептид, альбумин-связывающий белок или трансферрин.

В некоторых вариантах осуществления, если в качестве партнера по конъюгации используется ПЭГ, молекула ПЭГ может быть замещенной, незамещенной, линейной или разветвленной. Он также может представлять собой активированное производное полиэтилена. Примерами подходящих соединений являются молекулы ПЭГ, как описано в публикации международной патентной заявки WO 1999/64016, в патенте США № 6,177,074 или в патенте США № 6,403,564 в отношении интерферона, или как описано для других белков, таких как ПЭГ-модифицированная аспарагиназа, ПЭГ-аденозиндезаминаза (ПЭГ-АДА) или ПЭГ-супероксиддисмутаза (Fuertges and Abuchowski, Journal of Controlled Release, 1990). Молекулярная масса такого полимера, такого как полиэтиленгликоль, может находиться в диапазоне от приблизительно 300 до приблизительно 70000 дальтон, включая, например, полиэтиленгликоль с молекулярной массой приблизительно 10000, приблизительно 20000, приблизительно 30000 или приблизительно 40000 дальтон. Более того, как, например, описано в патентах США № 6,500,930 или 6,620,413, углеводные олигомеры и полимеры, такие как ГЭК, могут быть конъюгированы с мутеином согласно изобретению с целью увеличения периода полувыведения из сыворотки.

В некоторых вариантах осуществления, если Fc-часть иммуноглобулина используется с целью увеличения периода полувыведения из сыворотки мутеинов липокалина согласно изобретению, может быть использована технология SynFusion™, коммерчески доступная от Syntonix Pharmaceuticals, Inc. (Массачусетс, США). Использование этой технологии Fc-слияния позволяет создавать биофармацевтические препараты длительного действия и может, например, состоять из двух копий мутеина, связанного с Fc-областью антитела, для улучшения фармакокинетики, растворимости и эффективности производства.

Примерами альбумин-связывающих пептидов, которые могут быть использованы для увеличения периода полувыведения из сыворотки мутеина липокалина, являются, например, пептиды, имеющие консенсусную последовательность Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys, где Хаа₁ представляет собой Asp, Asn, Ser, Thr или Trp; Хаа₂ представляет собой Asn, Gln, His, Ile, Leu или Lys; Хаа₃ представляет собой Ala, Asp, Phe, Trp или Tyr; и Хаа₄ представляет собой Asp, Gly, Leu, Phe, Ser или Thr, как описано в патентной публикации US 20030069395 или в Dennis et al. (2002). Альбумин-связывающий белок, слитый или

конъюгированный с мутеином липокалина для увеличения периода полувыведения из сыворотки, может представлять собой бактериальный альбумин-связывающий белок, антитело, фрагмент антитела, включая доменные антитела (см., например, патент США 6,696,245), или мутеин липокалина со связывающей активностью к альбумину. Примеры бактериальных альбумин-связывающих белков включают стрептококковый белок G (Konig and Skerra, J Immunol Methods, 1998).

В некоторых вариантах осуществления, если альбумин-связывающий белок представляет собой фрагмент антитела, он может представлять собой доменное антитело. Доменные антитела (dAb) сконструированы для точного контроля биофизических свойств и периода полувыведения *in vivo* для создания оптимального профиля безопасности и эффективности продукта. Доменные антитела, например, коммерчески доступны от Domantis Ltd. (Кембридж, Великобритания и Массачусетс, США).

В некоторых вариантах осуществления в качестве партнера мутеина липокалина согласно изобретению для увеличения периода полувыведения из сыворотки может быть использован альбумин как таковой (Osborn et al., J Pharmacol Exp Ther, 2002) или биологически активный фрагмент альбумина. Термин "альбумин" включает все альбумины млекопитающих, такие как человеческий сывороточный альбумин, или бычий сывороточный альбумин, или крысиный альбумин. Альбумин или его фрагмент могут быть получены рекомбинантно, как описано в патенте США № 5,728,553 или европейских патентных публикациях EP0330451 и EP0361991. Соответственно, рекомбинантный человеческий альбумин (например, Recombumin® от Novozymes Delta Ltd., Ноттингем, Великобритания) может быть конъюгирован или слит с мутеином липокалина согласно изобретению.

В некоторых вариантах осуществления, если в качестве партнера для увеличения периода полувыведения из сыворотки мутеинов липокалинов согласно изобретению используется трансферрин, мутеины могут быть генетически слиты с N-или C-концом, или с обоими, негликозилированного трансферрина. Негликозилированный трансферрин имеет период полувыведения 14-17 дней, и слитый с трансферрином белок аналогичным образом будет иметь увеличенный период полувыведения. Трансферрин в качестве носителя также обеспечивает высокую биодоступность, биораспределение и стабильность в кровотоке. Эта технология коммерчески доступна от BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, Пенсильвания, США). Рекомбинантный человеческий трансферрин (DeltaFerrin™) для применения в качестве стабилизатора белка/партнера для увеличения периода полувыведения также коммерчески доступен от Novozymes Delta Ltd. (Ноттингем, Великобритания).

Еще одним вариантом продления периода полувыведения мутеинов липокалинов согласно изобретению является слияние с N- или C-концом мутеина длинных, неструктурированных, гибких богатых глицином последовательностей (например, полиглицина с приблизительно 20-80 последовательно расположенными остатками глицина). Этот подход, раскрытый, например, в международной патентной публикации WO2007/038619, также был назван "рПЭГ" (рекомбинантная ПЭГ).

Е. Примеры вариантов и областей применения слитых белков, специфичных к CD137 и PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению могут обеспечивать синергетический эффект посредством двойного нацеливания на CD137 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению могут обеспечивать синергетический эффект посредством стимуляции CD137 и блокады сигнального пути PD-1/PD-L1. В некоторых вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению могут обеспечивать локализованное противоопухолевое действие посредством двойного нацеливания на CD137 и PD-L1. Таким образом, существует множество возможных вариантов медицинского применения слитых белков согласно изобретению.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению одного или более слитых белков, раскрытых в настоящем документе, или одной или более композиций, содержащих такие слитые белки, для одновременного связывания CD137 и PD-L1.

Настоящее изобретение также включает применение одного или более описанных слитых белков для образования комплекса с CD137 и/или PD-L1.

Следовательно, в одном из аспектов изобретения предложенные слитые белки могут применяться для обнаружения CD137 и PD-L1. Такое применение может включать в себя стадии приведения одного или более указанных слитых белков, в подходящих условиях, в контакт с образцом, предположительно содержащим CD137 и/или PD-L1, тем самым обеспечивая возможность образования комплекса между слитыми белками и CD137 и/или PD-L1, и обнаружение комплекса с помощью подходящего сигнала. Детектируемый сигнал может быть вызван меткой, как объяснено выше, или изменением физических свойств из-за связывания, т.е. образованием комплекса как таковым. Одним из примеров является поверхностный плазмонный резонанс, значение которого изменяется во время связывания партнеров по связыванию, один из которых иммобилизован на поверхности, такой как золотая фольга.

Слитые белки согласно изобретению могут быть также использованы для разделения CD137 и/или PD-L1. Такое применение может включать в себя стадии приведения одного или более указанных слитых белков, в подходящих условиях, в контакт с образцом, предположительно содержащим CD137 и/или PD-L1, тем самым обеспечивая возможность образования комплекса между слитыми белками и CD137 и/или PD-L1, и отделение комплекса от образца.

В некоторых аспектах настоящего изобретения предложены диагностические и/или аналитические наборы, содержащие один или более слитых белков согласно изобретению.

Помимо применения в диагностике в еще одном аспекте изобретения рассматриваются фармацевтические композиции, содержащие один или более слитых белков согласно изобретению и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены слитые белки, одновременно связывающие CD137 и/или PD-L1, для применения в качестве противоопухолевых и/или противомикробных агентов, а также иммуномодуляторов. В некоторых вариантах осуществления предусмотрено применение слитых белков согласно настоящему изобретению в способе предупреждения, облегчения или лечения заболеваний человека, таких как различные раковые заболевания, в том числе PD-L1-положительные раковые заболевания. Соответственно, также предложены способы предупреждения, облегчения или лечения заболеваний человека, таких как различные раковые заболевания, в том числе PD-L1-положительные раковые заболевания, у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества одного или более слитых белков согласно изобретению.

Примеры раковых заболеваний, подлежащих лечению с помощью слитых белков согласно изобретению, включают рак печени, рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы и шеи, рак молочной железы, рак легкого, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, рак почки, рак матки, рак яичника, колоректальный рак, рак ободочной кишки, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак яичка, рак матки, карциному маточных труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, неходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, саркому мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, солидные опухоли детского возраста, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль оси позвоночника, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, раковые заболевания, вызванные факторами окружающей среды, в том числе вызванные асбестом, гематологические злокачественные новообразования, включая, например, множественную миелому, В-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина/первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, неходжкинские лимфомы, острую миелоидную лимфому, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфолейкоз, фолликулярную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, лимфому Беркитта, иммунобластную крупноклеточную лимфому, В-лимфобластную лимфому из клеток-предшественников, лимфому из клеток мантийной зоны, острый лимфобластный лейкоз, фунгоидный микоз, анапластическую крупноклеточную лимфому, Т-клеточную лимфому и Т-лимфобластную лимфому из клеток-предшественников, а также любые комбинации указанных раковых заболеваний. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также применимо для лечения метастатических раковых заболеваний.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению могут одновременно нацеливаться на опухолевые клетки, в которых экспрессируется PD-L1, и активировать лимфоциты иммунной системы хозяина вблизи таких опухолевых клеток. В некоторых вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению могут увеличивать направленную противоопухолевую активность Т-клеток, повышать противоопухолевый иммунитет и/или оказывать прямое ингибирующее действие на рост опухоли, тем самым обеспечивая синергетические противоопухолевые результаты. В некоторых вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению могут активировать иммунные ответы в микроокружении опухоли. В некоторых вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению могут снижать побочные действия эффекторных лимфоцитов на здоровые клетки, т.е. нецелевую токсичность, например, посредством локального ингибирования активности онкогена и индукции активации лимфоцитов.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение охватывает применение слитого белка согласно изобретению или композиции, содержащей предложенный слитый белок, для индукции локализованного ответа лимфоцитов вблизи PD-L1-положительных опухолевых клеток. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам индукции локализованного ответа лимфоцитов вблизи PD-L1-положительных опухолевых клеток, включающим применение одного или более слитых белков согласно изобретению или одной или более композиций, содержащих такие слитые белки. "Локализованный" означает, что при одновременном связывании Т-клеток посредством CD137 и взаимодействии с PD-L1-положительными опухолевыми клетками Т-клетки продуцируют цитокины, в частности, IL-2 и/или IFN гамма, вблизи PD-L1-положительных клеток. Такие цитокины отражают активацию Т-клеток, которые затем могут быть способны уничтожать PD-L1-положительные клетки, прямо или опосредованно, путем привлечения других клеток-киллеров, таких как Т-клетки или NK-клетки.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает применение слитого белка согласно изобретению или композиции, содержащей такой слитый белок, для стимуляции Т-клеток

и/или активации нисходящих сигнальных путей CD137. Предпочтительно предложенный слитый белок костимулирует Т-клетки и/или активирует нисходящие сигнальные пути CD137 при связывании с опухолевыми клетками, на которых экспрессируется PD-L1. Соответственно, в настоящем изобретении предложены способы индукции пролиферации Т-лимфоцитов и/или активации нисходящих сигнальных путей CD137, предпочтительно при связывании с опухолевыми клетками, на которых экспрессируется PD-L1, включающие применение одного или более слитых белков согласно изобретению и/или одной или более композиций, содержащих такие слитые белки.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает применение слитого белка согласно изобретению или композиции, содержащей такой слитый белок, для индукции кластеризации и активации CD137 на Т-клетках и направления таких Т-клеток на опухолевые клетки, на которых экспрессируется PD-L1.

Дополнительные цели, преимущества и особенности данного изобретения будут ясны специалистам в данной области техники после изучения следующих примеров и прилагаемых к ним графических материалов, которые не должны толковаться ограничительно. Таким образом, следует понимать, что, хотя настоящее изобретение конкретно раскрыто с помощью иллюстративных вариантов осуществления и необязательных признаков, специалисты в данной области техники могут прибегать к модификации и вариации раскрытых в настоящем документе вариантов изобретения, и что такие модификации и вариации рассматриваются как входящие в объем данного изобретения.

Ф. Получение иллюстративных предложенных слитых белков, специфичных к CD137 и PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены молекулы нуклеиновой кислоты (ДНК и РНК), которые включают нуклеотидные последовательности, кодирующие предложенные слитые белки. В некоторых вариантах осуществления изобретение охватывает клетку-хозяина, содержащую предложенную молекулу нуклеиновой кислоты. Поскольку вырожденность генетического кода допускает замены отдельных кодонов другими кодонами, определяющими ту же аминокислоту, изобретение не ограничивается конкретной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, как описано в настоящем документе, скорее, оно охватывает все молекулы нуклеиновой кислоты, которые включают нуклеотидные последовательности, кодирующие функциональный слитый белок. В этой связи настоящее изобретение также относится к нуклеотидным последовательностям, кодирующим предложенные слитые белки.

Молекула нуклеиновой кислоты, такая как ДНК, называется "способной экспрессировать молекулу нуклеиновой кислоты" или "способной обеспечивать экспрессию нуклеотидной последовательности", если она включает элементы последовательности, содержащие информацию, касающуюся регуляции транскрипции и/или трансляции, и такие последовательности "функционально связаны" с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок. Функциональная связь представляет собой связь, в которой элементы регуляторной последовательности и экспрессируемая последовательность связаны таким образом, чтобы обеспечить экспрессию гена. Точная природа регуляторных областей, необходимых для экспрессии генов, может различаться у разных видов, но в целом эти области включают промотор, который у прокариот содержит как промотор как таковой, то есть элементы ДНК, управляющие инициацией транскрипции, так и элементы ДНК, которые при транскрибировании в РНК будут сигнализировать об инициации трансляции. Такие промоторные области обычно включают 5'-некодирующие последовательности, участвующие в инициации транскрипции и трансляции, такие как -35/-10 боксы и элемент Шайна-Далгарно у прокариот или ТАТА-боксы, последовательности СААТ и 5'-кэпирующие элементы у эукариот. Эти области могут также включать энхансерные или репрессорные элементы, а также транслируемые сигнальные и лидерные последовательности для направления нативного белка в конкретный компартмент клетки-хозяина.

Кроме того, 3'-некодирующие последовательности могут содержать регуляторные элементы, участвующие в терминации транскрипции, полиаденилировании и т.п. Если, однако, эти терминирующие последовательности неудовлетворительно функционируют в конкретной клетке-хозяине, то они могут быть заменены сигналами, функционирующими в этой клетке.

Следовательно, молекула нуклеиновой кислоты согласно изобретению может быть "функционально связана" с одной или более регуляторными последовательностями, такими как промоторная последовательность, для обеспечения возможности экспрессии этой молекулы нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты согласно изобретению включает промоторную последовательность и последовательность терминации транскрипции. Подходящими прокариотическими промоторами являются, например, промотор tet, промотор lacUV5 или промотор T7. Примерами промоторов, подходящих для экспрессии в эукариотических клетках, являются промотор SV40 или промотор CMV.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая мутеин липокалина, раскрытый в данной заявке, может быть "функционально связана" с другой молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноглобулин согласно изобретению, чтобы обеспечить экспрессию слитого белка, раскрытого в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления предложенные способы могут включать подвергание по

меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей зрелый hTc, мутагенезу по нуклеотидным триплетам, кодирующим одно или более положений, соответствующих положениям 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 и 153 линейной полипептидной последовательности hTc (SEQ ID NO: 1), для получения мутеинов липокалинов, входящих в состав предложенных слитых белков. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы могут включать подвергание по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей зрелый hNGAL, мутагенезу по нуклеотидным триплетам, кодирующим одно или более положений, соответствующих положениям 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности hNGAL (SEQ ID NO: 2), для получения мутеинов липокалинов, входящих в состав предложенных слитых белков. В некоторых вариантах осуществления предложенный способ может включать подвергание по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей зрелый hNGAL, мутагенезу по нуклеотидным триплетам, кодирующим одно или более положений, соответствующих положениям 20, 25, 28, 33, 36, 40-41, 44, 49, 52, 59, 68, 70-73, 77-82, 87, 92, 96, 98, 100, 101, 103, 122, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности hNGAL (SEQ ID NO: 2), для получения мутеинов липокалинов, входящих в состав предложенных слитых белков.

Кроме того, применительно к мутеинам hTc или мутеинам hNGAL согласно изобретению, входящим в состав слитых белков, в некоторых вариантах осуществления природная дисульфидная связь между Cys 61 и Cys 153 или Cys 76 и Cys 175, соответственно, может быть удалена. Соответственно, такие мутеины могут продуцироваться в клеточном компартменте, имеющем восстанавливающую окислительно-восстановительную среду, например, в цитоплазме грамотрицательных бактерий.

Кроме того, применительно к предложенным мутеинам hTc или мутеинам hNGAL согласно изобретению, входящим в состав слитых белков, изобретение также включает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие такие мутеины, которые в некоторых вариантах осуществления могут включать одну или более дополнительных мутаций вне указанных положений экспериментального мутагенеза в последовательности. Такие мутации часто допустимы или даже могут оказаться полезными, например, если они вносят вклад в улучшенную эффективность фолдинга, стабильность в сыворотке, термостабильность или аффинность связывания лиганда мутеинов липокалинов и/или слитых белков.

В некоторых вариантах осуществления предложенные молекулы нуклеиновой кислоты также могут быть частью вектора или любого другого типа клонирующего носителя, такого как плаزمид, фагмида, фаг, бакуловирус, космида или искусственная хромосома.

В некоторых вариантах осуществления предложенная молекула нуклеиновой кислоты может быть включена в фагмиду. В данном контексте фагмидный вектор означает вектор, кодирующий межгенную область умеренного фага, такого как M13 или f1, или его функциональную часть, слитую с представляющей интерес кДНК. Например, в некоторых вариантах осуществления после суперинфекции бактериальных клеток-хозяев таким предоставленным фагмидным вектором и подходящим фагом-помощником (например, M13K07, VCS-M13 или R408) получают интактные фаговые частицы, тем самым обеспечивая физическое связывание кодируемой гетерологичной кДНК с ее соответствующим полипептидом, экспонируемым на поверхности фага (Lowman, *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1997, Rodi and Makowski, *Curr Opin Biotechnol*, 1999).

В соответствии с различными вариантами осуществления клонирующие носители могут включать, помимо регуляторных последовательностей, описанных выше, и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, как описано в настоящем документе, репликационные и контрольные последовательности, происходящие от видов, совместимых с клеткой-хозяином, которая используется для экспрессии, а также селективируемые маркеры, придающие селективируемый фенотип трансформированным или трансфицированным клеткам. Большое количество подходящих клонирующих векторов известно в данной области техники и коммерчески доступно.

В некоторых вариантах осуществления изобретение также относится к способам получения слитых белков согласно изобретению, начиная с нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок или любые его субъединицы, с использованием методов геной инженерии. В некоторых вариантах осуществления предложенный способ можно осуществлять *in vivo*, где предложенный слитый белок может, например, быть продуцирован в бактериальном или эукариотическом организме-хозяине, а затем выделен из этого организма-хозяина или его культуры. Также возможно получить слитый белок согласно изобретению *in vitro*, например, с использованием системы трансляции *in vitro*.

При получении слитого белка *in vivo* нуклеиновая кислота, кодирующая такой слитый белок, может быть введена в подходящий бактериальный или эукариотический организм-хозяин с использованием технологии рекомбинантных ДНК, хорошо известной в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления молекула ДНК, кодирующая слитый белок, как описано в настоящем документе (например, SEQ ID NO: 138-144), и, в частности, клонирующий вектор, содержащий кодирующую последовательность такого слитого белка, может быть трансформирована в клетку-хозяина, способную экспрессировать ген. Трансформация может быть проведена стандартными методами. Таким образом, изобретение также относится к клеткам-хозяевам, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, как раскрыто в на-

стоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления трансформированные клетки-хозяева можно культивировать в условиях, подходящих для экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей слитый белок согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева могут быть прокариотическими, такими как *Escherichia coli* (*E. coli*) или *Bacillus subtilis*, или эукариотическими, такими как *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, клетки насекомых SF9 или High5, иммортализованные линии клеток млекопитающих (например, клетки HeLa или клетки CHO) или первичная культура клеток млекопитающих.

В некоторых вариантах осуществления, где мутеин липокалина согласно изобретению, в том числе входящий в состав слитого белка, раскрытого в настоящем документе, включает внутримолекулярные дисульфидные связи, может быть предпочтительным направлять формирующийся белок в клеточный компартмент, имеющий окисляющую окислительную-восстановительную среду, с использованием соответствующей сигнальной последовательности. Такая окисляющая среда может быть обеспечена периплазмой грамотрицательных бактерий, таких как *E. coli*, во внеклеточной среде грамположительных бактерий или просвете эндоплазматического ретикула эукариотических клеток, и обычно способствует образованию структурных дисульфидных связей.

В некоторых вариантах осуществления также возможно продуцировать слитый белок согласно изобретению в цитозоле клетки-хозяина, предпочтительно *E. coli*. В этом случае предложенный слитый белок может быть либо непосредственно получен в растворимом и свернутом состоянии, либо выделен в форме телец включения с последующей ренатурацией *in vitro*. Еще одним вариантом является использование определенных штаммов-хозяев, имеющих окисляющую внутриклеточную среду, которая может, таким образом, обеспечить возможность образования дисульфидных связей в цитозоле (Venturi et al., *J Mol Biol*, 2002).

В некоторых вариантах осуществления слитый белок согласно изобретению, описанный в настоящем документе, не обязательно должен быть создан или продуцирован полностью или частично с использованием генной инженерии.

Скорее, такой белок также может быть получен любым из многих традиционных и хорошо известных методов, таких как простые стратегии органического синтеза, методы твердофазного синтеза, коммерчески доступные автоматические синтезаторы, или с помощью транскрипции и трансляции *in vitro*. Например, возможно, что многообещающие слитые белки или мутеины липокалинов, включенные в такие слитые белки, будут идентифицированы с помощью молекулярного моделирования, синтезированы *in vitro* и исследованы на предмет связывающей активности к представляющей интерес мишени(ям). Методы твердофазного и/или жидкофазного синтеза белков хорошо известны в данной области техники (см., например, Bruckdorfer et al., *Curr Pharm Biotechnol*, 2004).

В некоторых вариантах осуществления слитый белок согласно изобретению может быть получен путем транскрипции/трансляции *in vitro* с использованием общепризнанных методов, известных специалистам в данной области техники.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления слитые белки, как описано в настоящем документе, также могут быть получены обычными рекомбинантными методами, отдельно или в сочетании с обычными методами синтеза.

Более того, в некоторых вариантах осуществления слитый белок согласно настоящему изобретению может быть получен путем конъюгирования вместе отдельных субъединиц, например, иммуноглобулинов и мутеинов, входящих в состав слитого белка. Такая конъюгация может быть достигнута, например, с помощью всех форм ковалентной или нековалентной связи с использованием обычных методов.

Специалисту известны способы, подходящие для получения слитых белков, которые предусмотрены настоящим изобретением, но белковые последовательности или последовательности нуклеиновых кислот которых не раскрыты в настоящем документе в явном виде. В общих чертах, такие модификации аминокислотной последовательности включают, например, направленный мутагенез отдельных положений аминокислот для упрощения субклонирования гена белка или его частей путем включения сайтов расщепления для отдельных ферментов рестрикции. Кроме того, эти мутации могут быть включены для дальнейшего улучшения аффинности слитого белка к его мишеням (например, CD137 и PD-L1). Кроме того, могут быть введены мутации для модуляции одной или нескольких характеристик белка, например, для улучшения стабильности фолдинга, стабильности в сыворотке, устойчивости белка или растворимости в воде, или для уменьшения склонности к агрегации, если это необходимо.

V. Примеры

Пример 1: Экспрессия и анализ иллюстративных слитых белков.

В этом примере были получены иллюстративные слитые белки антитело-мутеин липокалина путем слияния PD-L1-специфического антитела, имеющего тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO: 86, или содержащего переменный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 77, или содержащего CDR с последовательностями GFSLSNYD (HCDR1, SEQ ID NO: 60), IWTGGAT (HCDR2, SEQ ID NO: 61), VRDSNYRY-DEPFTY (HCDR3; SEQ ID NO: 62), и легкие цепи, представленные SEQ ID NO: 87, или содержащего переменный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 82, или содержащего CDR с последовательностями

QSIGTN (LCDR1, SEQ ID NO: 63), YAS (LCDR2), QQSNSWPYT (LCDR3; SEQ ID NO: 64), и CD137-специфического мутеина липокалина с последовательностью SEQ ID NO: 42 посредством линкера, такого как неструктурированный линкер (G₄S)₃ с последовательностью SEQ ID NO: 13, для одновременного связывания PD-L1 и CD137. Различные созданные форматы показаны на фиг. 1. Например, такие слитые белки, например, SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93, SEQ ID NO: 94 и 87 и SEQ ID NO: 90 и 91, были получены путем слияния одного или более мутеинов липокалина с последовательностью SEQ ID NO: 42 с одним или более из четырех концов антитела, содержащего тяжелую цепь, представленную тяжелой цепью, представленной SEQ ID NO: 86, или содержащего вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 77, или содержащего CDR с последовательностями GFSLSNYD (HCDR1, SEQ ID NO: 60), IWTGGAT (HCDR2, SEQ ID NO: 61), VRDSNYRYDEPFTY (HCDR3; SEQ ID NO: 62), и легкие цепи, представленные SEQ ID NO: 87, или содержащего вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 82, или содержащего CDR с последовательностями QSIGTN (LCDR1, SEQ ID NO: 63), YAS (LCDR2), QQSNSWPYT (LCDR3; SEQ ID NO: 64). Полученные слитые белки могут быть бивалентными к CD137 (например, как продемонстрировано на фиг. 1A-1D), или четырехвалентными к CD137 (например, как продемонстрировано на фиг. 1E-1H), или иметь даже более высокую валентность к CD137 (например, как продемонстрировано на фиг. 1I).

PD-L1-специфические антитела, а также все слитые белки антитела и мутеина липокалина, описанные в этом примере, имели сконструированный остов IgG4, который содержал мутацию S228P для минимизации обмена половинами молекул IgG4 *in vitro* и *in vivo* (Silva et al., J Biol Chem, 2015). Дополнительные мутации в остовах IgG4 также могут существовать во всех описанных здесь антителах и слитых белках, включая любую одну или более мутаций F234A, L235A, M428L, N434S, M252Y, S254T и T256E.

Мутации F234A и L235A могут быть введены для снижения ADCC и ADCP (Glaesner et al., Diabetes Metab Res Rev, 2010). Мутации M428L и N434S или мутации M252Y, S254T и T256E могут быть введены для увеличения периода полувыведения из сыворотки (Dall'Acqua et al., J Biol Chem, 2006, Zalevsky et al., Nat Biotechnol, 2010). Все антитела были экспрессированы без карбоксиконцевого лизина, чтобы избежать неоднородности.

Кроме того, были получены моноспецифические слияния мутеина липокалина и Fc путем слияния одного или более CD137-специфических мутеинов липокалина с последовательностью SEQ ID NO: 42 посредством линкера, например, неструктурированного (G₄S)₃ линкера с последовательностью SEQ ID NO: 13, с C-концом Fc-области антитела, представленного в SEQ ID NO: 30, как показано на фиг. 1J-1K. Полученная конструкция представлена в SEQ ID NO: 88-89.

Настоящее изобретение также включает форматы асимметричного слияния антитела и мутеина липокалина, в которых, например, одна легкая цепь антитела может быть слита с мутеином липокалина, а другая - нет.

Конструкции слитых белков были созданы путем генного синтеза и клонированы в вектор экспрессии млекопитающих. Затем они были временно экспрессированы в клетках Expi293FTM (Life Technologies). Концентрацию слитых белков в среде для культивирования клеток измеряли с помощью ВЭЖХ (Agilent Technologies) с использованием аффинной колонки POROS® с белком А (Applied Biosystems). Сводные данные по титрам слитых белков приведены в табл. 1.

Слитые белки очищали с использованием хроматографии с белком А с последующей эксклюзионной хроматографией (SEC) в натрий-фосфатном буфере (PBS). После очистки методом SEC фракции, содержащие мономерный белок, объединяли и снова анализировали с помощью аналитической SEC.

Таблица 1

Титры временной экспрессии

SEQ ID NO:	Титр экспрессии [мг/мл]
SEQ ID NO: 90 и 87	0,05
SEQ ID NO: 86 и 91	0,07
SEQ ID NO: 92 и 87	0,06
SEQ ID NO: 86 и 93	0,09
SEQ ID NO: 94 и 87	0,06
SEQ ID NO: 90 и 91	0,10
SEQ ID NO: 88	0,24
SEQ ID NO: 86 и 87	0,07

Пример 2: Экспрессия слитых белков.

Конструкции иллюстративных слитых белков были созданы путем генного синтеза, включая оптимизацию кодонов, и клонированы в вектор экспрессии млекопитающих. Затем они были стабильно экспрессированы в клетках яичника китайского хомячка (CHO). Концентрацию слитых белков в среде для культивирования клеток измеряли с помощью Octet (ForteBio, Pall Corp.) с сенсорами на белок А и определяли количественно с использованием стандарта человеческого IgG1. Сводные данные по титрам слитых белков приведены в табл. 2. Данные дают основания полагать, что геометрия слитых белков может влиять на выход продукта и продуктивность клеток.

Таблица 2

Титры стабильной экспрессии

SEQ ID NO:	Титр экспрессии [мг/мл]
SEQ ID NO: 90 и 87	1,423
SEQ ID NO: 86 и 91	1,502
SEQ ID NO: 92 и 87	0,456
SEQ ID NO: 86 и 93	0,294
SEQ ID NO: 94 и 87	0,293
SEQ ID NO: 90 и 91	1,297
SEQ ID NO: 88	0,150
SEQ ID NO: 86 и 87	1,018

Пример 3: Связывание слитых белков с PD-L1 или CD137, определенное методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Кинетику связывания и аффинность иллюстративных слитых белков к huPD-L1-His или huCD137-His (человеческий PD-L1 или человеческий CD137 с C-концевой полигистидиновой меткой, R&D Systems) определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием Biacore 8K или Biacore T200 (GE Healthcare).

Антитело к человеческому Fc IgG (GE Healthcare) иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 с использованием стандартной реакции аминов: карбоксильные группы на чипе были активированы с использованием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS). Затем раствор антитела к Fc человеческого IgG (GE Healthcare) в концентрации 25 мкг/мл в 10 мМ ацетате натрия (pH 5,0) наносили при скорости потока 5 мкл/мин до уровня иммобилизации 6000-10000 единиц резонанса (RU). Остаточные непрореагировавшие сложные эфиры NHS блокировали пропусканием через поверхность раствора 1M этаноламина. Аналогичным образом был обработан референсный канал. Затем тестируемые слитые белки (SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93, SEQ ID NO: 94 и 87, SEQ ID NO: 90 и 91, SEQ ID NO: 88 и SEQ ID NO: 89) при 0,25 мкг/мл или 0,5 мкг/мл в буфере HBS-EP+ захватывали антителом к человеческому Fc-IgG на поверхности чипа в течение 180 сек при скорости потока 10 мкл/мин. После каждого шага захвата иглу промывали. Антитела к PD-L1, включая референсное антитело (SEQ ID NO: 26 и 27) и антитело, входящее в состав слитых белков (SEQ ID NO: 86 и 87), и референсное антитело к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29) также тестировали в качестве контролей.

Для определения аффинности были приготовлены разведения huPD-L1-His (10 нМ, 5 нМ и 2,5 нМ или huCD137-His (900 нМ, 300 нМ и 100 нМ) в буфере HBS-EP+ и нанесены на подготовленную поверхность чипа. Анализ связывания проводили при времени контакта 180 сек, времени диссоциации 900 сек и скорости потока 30 мкл/мин. Все измерения проводились при 25°C. Регенерация поверхности чипа достигалась введениями 3 М MgCl₂ в течение 120 сек. Перед измерением белка было проведено три пусковых цикла для целей подготовки. Данные оценивали с помощью программного обеспечения для оценки Biacore T200 (v2.0) или с помощью программного обеспечения для оценки Biacore 8K (V1.1.1). Для аппроксимации необработанных данных использовали двойное сравнение с контролем и модель связывания 1:1.

Сводные значения, определенные для k_{on} , k_{off} и результирующей константы равновесной диссоциации (K_D) для иллюстративных слитых белков приведены в табл. 3. Все биспецифические слитые белки (SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93, SEQ ID NO: 94 и 87, и SEQ ID NO: 90 и 91) связывают PD-L1, а также CD137 с аффинностью в субнанолярном или низком нанолярном диапазоне. Моноспецифические CD137-специфические слияния мутеин липокалина-Fc (SEQ ID NO: 88 и SEQ ID NO: 89) связывают только CD137 с аффинностью в низком нанолярном диапазоне.

Таблица 3

Кинетические константы и аффинности слитых белков, определенные с помощью SPR

SEQ ID NO:	huPD-L1			huCD137		
	K_{on} [M ⁻¹ x c ⁻¹]	K_{off} [c ⁻¹]	K_D [нМ]	K_{on} [M ⁻¹ x c ⁻¹]	K_{off} [c ⁻¹]	K_D [нМ]
90 и 87	1,30E+06	7,69E-04	0,592	3,93E+04	2,55E-04	6,484
86 и 91	1,32E+06	7,48E-04	0,568	3,42E+04	1,75E-04	5,106
92 и 87	7,87E+05	8,03E-04	1,021	3,48E+04	2,08E-04	5,966
86 и 93	5,46E+05	7,54E-04	1,381	3,68E+04	1,30E-04	3,548
94 и 87	1,51E+06	9,16E-04	0,608	4,07E+04	2,24E-04	5,504
90 и 91	1,60E+06	8,61E-04	0,537	3,91E+04	2,24E-04	5,726
88	НД	НД	НД	3,94E+04	1,63E-04	4,155
86 и 87	1,09E+06	6,49E-04	0,593	НД	НД	НД
89	НД	НД	НД	3,66E+04	1,32E-04	3,595
26 и 27	6,38E+05	2,01E-04	0,314	НД	НД	НД
28 и 29	НД	НД	НД	4,72E+05	2,94E-03	6,237

Пример 4. Связывание слитых белков с PD-L1 или CD137 в твердофазном иммуноферментном анализе (ELISA).

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) использовали для определения силы связывания иллюстративных слитых белков с человеческим PD-L1 и PD-L1 яванского макака.

Рекомбинантный huPD-L1-His или cyPD-L1-His (PD-L1 человека или яванского макака с С-концевой полигистидиновой меткой, R&D Systems или Sino Biologics) в концентрации 1 мкг/мл в PBS наносили на ночь на планшеты для микротитрования при 4°C. После промывки PBS-0,05%T (PBS с добавкой 0,05% (об./об.) Tween 20) планшеты блокировали 2% BSA (мас./об.) в PBS-0,1%T (PBS с добавкой 0,1% (об./об.) Tween 20) в течение 1 ч при комнатной температуре. После пятикратной промывки 100 мкл PBS-0,05%T иллюстративные слитые белки (SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93, SEQ ID NO: 94 и 87, SEQ ID NO: 90 и 91), CD137-специфические слияния Fc с мутеином липокалина (SEQ ID NO: 88 и SEQ ID NO: 89) и антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 26 и 27, SEQ ID NO: 86 и 87) в различных концентрациях добавляли в лунки и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего следовала еще одна стадия промывки. Изучаемые связанные молекулы детектировали путем инкубации с разведенным 1:5000 античеловеческим IgG Fc-HRP (Jackson Laboratory) в PBS-0,1%T-2%BSA. После дополнительной стадии промывки в каждую лунку добавляли флуорогенный субстрат HRP (QuantaBlu, Thermo) и определяли интенсивность флуоресценции с помощью считывающего флуоресценцию устройства для микропланшетов.

Такую же схему ELISA также использовали для определения силы связывания слитых белков с CD137, где на планшет для микротитрования взамен наносили huCD137-His (человеческий CD137 с С-концевой полигистидиновой меткой, R&D Systems) или cyCD137-Fc (CD137 яванского макака, слитый с Fc на С-конце). Тестируемые агенты титровали аналогичным образом и детектировали связанные агенты с помощью антитела к NGAL-HRP.

Результаты иллюстративных экспериментов представлены на фиг. 2A-2D вместе с аппроксимирующими кривыми, полученными в результате аппроксимации сигмоидальной кривой связывания 1:1, где значение EC₅₀ и максимальный сигнал были свободными параметрами, а наклон был установлен равным единице. Полученные значения EC₅₀ представлены в табл. 4.

Наблюдаемые значения EC₅₀ по отношению к двум человеческим мишеням предложенных слитых белков (SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93, SEQ ID NO: 94 и 87, SEQ ID NO: 90 и 91, SEQ ID NO: 88, и SEQ ID NO: 89) были очень похожи или сопоставимы с тестируемыми антителами к PD-L1 (референсное антитело к PD-L1 с последовательностями SEQ ID NO: 26 и 27 и антитело к PD-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 86 и 87, включенные в слитые белки), и/или CD137-специфическим мутеином липокалина, входящим в состав слитых белков (SEQ ID NO: 42).

Все протестированные слитые белки демонстрируют перекрестную реактивность с PD-L1 яванского макака, при этом значения EC₅₀ сопоставимы с референсным антителом к PD-L1 (SEQ ID NO: 26 и 27) или антителом к PD-L1, включенным в слитые белки (SEQ ID NO: 86 и 87). Только слитые белки, которые являются четырехвалентными к CD137 (SEQ ID NO: 94 и 87, SEQ ID NO: 90 и 91 и SEQ ID NO: 88), демонстрируют перекрестную реактивность с CD137 яванского макака на уровне, сопоставимом с человеческим CD137, т.е. связывают CD137 яванского макака со значениями EC₅₀ в том же диапазоне, что и

соответствующие EC_{50} для человеческого CD137.

Таблица 4

Данные ELISA для связывания PD-L1 или CD137

SEQ ID NO:	EC_{50} [нМ] Связывание с huPD-L1	EC_{50} [нМ] Связывание с суPD-L1	EC_{50} [нМ] Связывание с huCD137	EC_{50} [нМ] Связывание с суCD137
90 и 87	0,15	0,13	0,28	5,9
86 и 91	0,23	0,18	0,57	13
92 и 87	0,16	0,15	0,41	9,8
86 и 93	0,19	0,17	0,35	8,1
94 и 87	0,18	0,15	0,16	0,19
90 и 91	0,20	0,17	0,14	0,21
88	НД	НД	0,15	0,12
86 и 87	0,12	0,1	НД	НД
89	НД	НД	0,29	0,82
26 и 27	0,09	0,09	НД	НД
42	НД	НД	0,27	НД

Пример 5. Одновременное связывание слитых белков с PD-L1 и CD137 в ELISA.

Чтобы продемонстрировать одновременное связывание иллюстративных слитых белков с PD-L1 и CD137, использовали формат ELISA с двойным связыванием.

Рекомбинантный huPD-L1-His (R&D Systems) в PBS (1 мкг/мл) наносили на ночь на планшеты для микротитрования при 4°C. Планшеты промывали пять раз после каждой стадии инкубации 100 мкл PBS-0,05%Т. Планшеты блокировали 2% BSA (мас./об.) в PBS-0,1%Т в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем снова промывали. В лунки добавляли различные концентрации тестируемых слитых белков и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей стадией промывки. Затем добавляли биотинилированный huCD137-His (huCD137-His-Bio, Sino Biological) при постоянной концентрации 1 мкг/мл в PBS-0,1%Т-2%BSA на 1 ч. После промывки в лунки добавляли разведенный 1:5000 ExtrAvidin-HRP (Sigma-Aldrich) в PBS-0,1%Т-2% BSA и инкубировали в течение 1 ч. После дополнительной стадии промывки в каждую лунку добавляли флуорогенный субстрат HRP (QuantaBlu, Thermo) и определяли интенсивность флуоресценции с помощью считывающего флуоресценцию устройства для микропланшетов.

Двойное связывание иллюстративных слитых белков также тестировали с использованием обратной схемы, где рекомбинантный 1 мкг/мл huCD137-His (R&D Systems) наносили на планшеты для микротитрования, а связанные слитые белки детектировали путем добавления биотинилированного huPD-L1-His (R&D Systems).

Данные по двойному связыванию слитых белков (SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93, SEQ ID NO: 94 и 87, и SEQ ID NO: 90 и 91) показаны на фиг. 3А и 3В вместе с аппроксимирующими кривыми, полученными в результате аппроксимации сигмоидальной кривой связывания 1:1, где значение EC_{50} и максимальный сигнал были свободными параметрами, а наклон был установлен равным единице. Сводные значения EC_{50} приведены в табл. 5. Все биспецифические слитые белки демонстрируют явные сигналы связывания, что говорит о том, что слитые белки способны одновременно связывать PD-L1 и CD137. Данные также дают основания полагать, что слияние CD137-специфических мутеинов липокалинов с С-концами PD-L1-специфических антител может быть более предпочтительным, чем с N-концами.

Таблица 5

Данные ELISA по одновременному целевому связыванию PD-L1 и CD137

SEQ ID NO:	EC_{50} [нМ] Захват PD-L1_детекция CD137	EC_{50} [нМ] Захват CD137_детекция PD-L1
90 и 87	0,58	2,9
86 и 91	0,59	3,3
92 и 87	1,2	7,2
86 и 93	0,74	6,7
94 и 87	0,48	2,6
90 и 91	0,49	2,3

Пример 6. Анализ связывания слитых белков с клетками, экспрессирующими CD137 и PD-L1 человека и яванского макака, методом проточной цитометрии.

Целевое специфическое связывание слитых белков с клетками, экспрессирующими PD-L1 человека и яванского макака, и клетками, экспрессирующими CD137 человека и яванского макака, оценивали методом проточной цитометрии.

Клетки CHO стабильно трансфицировали человеческим PD-L1, PD-L1 яванского макака, человеческим CD137, CD137 яванского макака или имитационным контролем с использованием системы Flp-In (Life technologies) в соответствии с инструкциями производителя.

Трансфицированные клетки CHO поддерживали в среде F12 Хэма (Life technologies) с добавкой 10% фетальной телячьей сыворотки (Biocrom) и 500 мкг/мл гигромицина В (Roth). Клетки культивировали в колбах для клеточных культур в соответствии с инструкциями производителя (37°C, атмосфера 5% CO₂).

Для анализа методом проточной цитометрии соответствующие клеточные линии инкубировали со слитыми белками (SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93, SEQ ID NO: 94 и 87, SEQ ID NO: 90 и 91, SEQ ID NO: 88, и SEQ ID NO: 89) и детектировали с использованием флуоресцентно меченого антитела к человеческому IgG в анализе FACS, как описано ниже: 5×10^4 клеток на лунку инкубировали в течение 1 ч в ледяном PBS, содержащем 5% фетальной телячьей сыворотки (PBS-FCS). К клеткам добавляли последовательные разведения слитых белков и контрольных антител и инкубировали в течение 1 ч на льду. Клетки дважды промывали PBS и затем инкубировали с козым антителом к hIgG, меченым Alexa647, в течение 30 мин на льду. Затем клетки промывали и анализировали с помощью проточного цитометра iQue (Intellicyte Screener). Средние геометрические значения сигналов флуоресценции наносили на график и аппроксимировали с помощью программного обеспечения Graphpad с использованием нелинейной регрессии (общая нижняя асимптота, наклон = 1).

Способность слитых белков связывать PD-L1 и CD137 человека и яванского макака показана на фиг. 4. Аффинности связывания (EC₅₀) биспецифических слитых белков (SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93, SEQ ID NO: 94 и 87, и SEQ ID NO: 90 и 91) к клеткам, экспрессирующим PD-L1 человека и яванского макака, находятся в одноразрядном наномолярном диапазоне, демонстрируя полную перекрестную реактивность с яванским макаком (сводные данные представлены в табл. 6). Аффинности связывания слитых белков с клетками, экспрессирующими человеческий CD137, находится в низком наномолярном диапазоне. Протестированные слитые белки полностью перекрестно реагируют с CD137 яванского макака (SEQ ID NO: 94 и 87, SEQ ID NO: 90 и 91 и SEQ ID NO: 88), связывают CD137 яванского макака со сниженной в 6-13 раз аффинностью по сравнению с соответствующими аффинностями связывания с человеческим CD137 (SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91 и SEQ ID NO: 89), или не связывают CD137 яванского макака (SEQ ID NO: 92 и 87 и 86 и 93). Ни один из слитых белков не связывается с ложно трансфицированными клетками.

Таблица 6

Аффинности связывания слитых белков с клетками, экспрессирующими PD-L1 или CD137 человека и яванского макака

SEQ ID NO:	EC ₅₀ [нМ] Flp-In-CHO::huCD137	EC ₅₀ [нМ] Flp-In-CHO::cynoCD137	EC ₅₀ [нМ] Flp-In-CHO::huPDL-1	EC ₅₀ [нМ] Flp-In-CHO::cynoPDL-1
90 и 87	3,74	51,35	3,64	4,48
86 и 91	6,48	39,15	1,43	1,41
92 и 87	11,91	--	2,95	2,03
86 и 93	12,73	--	4,63	2,03
94 и 87	4,15	6,92	6,99	5,89
90 и 91	4,69	3,66	4,09	3,37
86 и 87	--	--	2,96	3,55
89	5,74	26,70	--	--
88	4,33	3,81	--	--
28 и 29	1,31	--	--	--

Пример 7. Аффинности связывания слитых белков с PD-L1-положительными опухолевыми клетками.

Связывание слитых белков с опухолевыми клетками, экспрессирующими PD-L1, оценивали методом проточной цитометрии.

Экспрессирующую PD-L1 линию клеток колоректального рака RKO поддерживали в RPMI1640 (Life technologies) с добавкой 10% FCS при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂.

Для анализа методом проточной цитометрии клетки RKO инкубировали со слитыми белками и детектировали с использованием флуоресцентно меченого антитела к человеческому IgG, как описано в примере 6.

Способность слитых белков (SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93, SEQ ID NO: 94 и 87, и SEQ ID NO: 90 и 91) связывать PD-L1-положительные опухолевые клетки показана на фиг. 5, а сводные данные по соответствующим аффинностям связывания (EC_{50}) представлены в табл. 7. Аффинности связывания слитых белков с PD-L1-экспрессирующими клетками RKO находилась в низком наномолярном или субнаномолярном диапазоне и были сопоставимы с антителом к PD-L1, включенным в слитые белки (SEQ ID NO: 86 и 87).

Таблица 7

Аффинности связывания слитых белков с PD-L1-положительными опухолевыми клетками

SEQ ID NO:	EC_{50} [нМ] RKO
90 и 87	0,51
86 и 91	0,45
92 и 87	1,00
86 и 93	1,38
94 и 87	0,69
90 и 91	0,53
86 и 87	0,32

Пример 8. Определение конкуренции между CD137L и слитыми белками за связывание с CD137 методом SPR.

Для исследования конкуренции между человеческим CD137L (huCD137L-His, R&D Systems) и иллюстративными слитыми белками за связывание с человеческим CD137 использовали анализ методом SPR. Анализ конкуренции проводили при 25°C на приборе Biacore T200 (GE Healthcare).

Реагент BiotinCAPture (GE Healthcare) иммобилизовали на сенсорном чипе CAP при концентрации 50 мкг/мл и скорости потока 2 мкл/мин в течение 300 сек. Аналогичным образом был обработан референсный канал. Биотинилированный huCD137-Fc (R&D systems) был захвачен на поверхности чипа в течение 300 сек при концентрации 1 мкг/мл и при скорости потока 5 мкл/мин по другому каналу.

Чтобы проанализировать, конкурируют ли тестируемые слитые белки (SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93, SEQ ID NO: 90 и 91, SEQ ID NO: 88, и SEQ ID NO: 89) с CD137L за связывание CD137, подвижный буфер (буфер HBS-EP+) либо 500 нМ huCD137L-His наносили на поверхность чипа на 180 с со скоростью потока 30 мкл/мин. Затем тестируемые слитые белки наносили на подготовленную поверхность чипа в буфере HBS-EP+ при фиксированной концентрации 1 мкМ. Анализ связывания проводили при времени контакта 180 сек, времени диссоциации 15 сек и скорости потока 30 мкл/мин. В качестве контроля осуществляли введения буфера с теми же параметрами. Регенерация поверхности чипа достигалась введениями 6М гуанидина-HCl, 0,25M NaOH в течение 120 сек при скорости потока 10 мкл/мин, с последующей дополнительной стадией промывки H₂O (120 сек, 10 мкл/мин).

Иллюстративные примеры для релевантного сегмента полученных сенсограмм представлены на фиг. 6 для слитых белков SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93, SEQ ID NO: 90 и 91, SEQ ID NO: 88 и SEQ ID NO: 89. Кривая SPR для связывания соответствующего слитого белка только с huCD137-Fc отмечена стрелкой со сплошным стержнем. Кривая SPR для связывания слитого белка с huCD137-Fc, насыщенного huCD137L-His, отмечена стрелкой с пунктирным стержнем. Данные показывают, что все слитые белки связываются с huCD137 в присутствии huCD137L, но со слегка уменьшенными сигналами по сравнению с их связыванием с CD137 в отсутствие CD137L. Это дает основания полагать, что тестируемые слитые белки могут быть в некоторой степени стерически затруднены связыванием CD137L с CD137. Такое поведение связывания слитых белков (SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93, SEQ ID NO: 90 и 91, SEQ ID NO: 88 и SEQ ID NO: 89) аналогично поведению антитела к CD137 с последовательностями SEQ ID NO: 28 и 29.

Пример 9. Конкуренция слитых белков с PD-L1 за связывание с PD-1, определенная с помощью ELISA.

Чтобы продемонстрировать способность слитых белков ингибировать взаимодействие между PD-1 и PD-L1, использовали конкурентный формат ELISA.

Рекомбинантный huPD-1-His (Acrobiosystems) в PBS (1 мкг/мл) наносили на ночь на планшеты для микротитрования при 4°C. Планшеты промывали пять раз после каждой стадии инкубации 100 мкл PBS-0,05%T (PBS с добавкой 0,05% (об./об.) Tween 20). Планшеты блокировали 2% BSA (мас./об.) в PBS-0,1%T (PBS с добавкой 0,1% (об./об.) Tween 20) в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем снова

промывали. Слитые белки в различных концентрациях смешивали с 15 нМ рекомбинантного huPD-L1-Fc (R&D systems) в качестве индикатора и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Смеси слитых белков и индикатора добавляли в планшеты и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре, после чего проводили пять этапов промывки 100 мкл PBS-0,05%Т. Затем в лунки добавляли разведенные 1:5000 козы антитела к человеческому Fc-IgG HRP (Jackson) и инкубировали в течение 1 ч. После дополнительной стадии промывки в каждую лунку добавляли флуорогенный субстрат HRP (QuantaBlu, Thermo) и определяли интенсивность флуоресценции с помощью считывающего флуоресценцию устройства для микропланшетов.

Данные по конкуренции иллюстративных слитых белков (SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93 и SEQ ID NO: 90 и 91) показаны на фиг. 7 вместе с аппроксимирующими кривыми, полученными в результате аппроксимации сигмоидальной кривой связывания 1:1, где значение IC_{50} и максимальный сигнал были свободными параметрами, а наклон был установлен равным единице. Сводные значения IC_{50} приведены в табл. 9. Все биспецифические слитые белки продемонстрировали явное ингибирование взаимодействия PD-1/PD-L1 со значениями IC_{50} , сопоставимыми с антителом-строительным блоком (SEQ ID NO: 86 и 87) и референсным антителом к PD-L1 (SEQ ID NO: 26 и 27).

Таблица 8
Конкуренция слитых белков с PD-L1 за связывание с PD-1

SEQ ID NO:	IC_{50} [нМ]
90 и 87	2,3
86 и 91	3,0
92 и 87	3,4
86 и 93	3,2
94 и 87	2,4
90 и 91	2,8
86 и 87	3,5
26 и 27	3,8

Пример 10. PD-L1-зависимая костимуляция Т-клеток с помощью биоанализа с CD137.

Потенциал выбранных слитых белков в отношении индукции активации сигнального пути CD137 в присутствии PD-L1 оценивали с использованием коммерчески доступной дважды стабильно трансфицированной линии клеток Jurkat, экспрессирующей CD137 и ген luc2 (гуманизованная версия люциферазы светлячка), где экспрессия luc2 регулируется NFκB-отвечающим элементом. В этом биоанализе связывание CD137 приводит к внутриклеточной передаче сигнала CD137, что приводит к люминесценции, опосредованной NFκB.

Экспрессирующую PD-L1 линию клеток колоректального рака RKO культивировали, как описано в примере 7. За день до анализа клетки RKO высевали из расчета $1,25 \times 10^4$ клеток на лунку и оставляли на ночь для прикрепления при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂.

На следующий день в каждую лунку добавляли $3,75 \times 10^4$ клеток NF-κB-Luc2/CD137 Jurkat с последующим добавлением различных концентраций, обычно в диапазоне от 0,001 до 5 нМ, слитых белков или референсного антитела к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29). Планшеты закрывали газопроницаемой пленкой и инкубировали при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Спустя 4 часа в каждую лунку добавляли 30 мкл реагента Bio-Glo™ и количественно определяли биолуминесцентный сигнал с помощью люминометра (PHERAstar). Анализ с использованием четырехпараметрической логистической кривой был выполнен с помощью GraphPad Prism® для расчета значений EC_{50} (общая нижняя асимптота, фиксированный наклон), которые обобщены в табл. 9. Чтобы продемонстрировать зависимость связывания CD137 слитыми белками от PD-L1, параллельно проводили этот же эксперимент в отсутствие клеток RKO. Анализ проводили в трех повторностях.

Результаты иллюстративного эксперимента представлены на фиг. 8A-8D.

Данные показывают, что все протестированные слитые белки (SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87 и SEQ ID NO: 86 и 93) индуцировали сильную костимуляцию Т-клеток, опосредованную CD137. На фиг. 8B и 8D показано, что активация CD137 слитыми белками зависит от PD-L1, поскольку активация клеток NF-κB-Luc2/CD137 Jurkat не была обнаружена в отсутствие опухолевых клеток, экспрессирующих PD-L1. Напротив, референсное mAb к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29) продемонстрировало опосредованную CD137 костимуляцию Т-клеток независимо от наличия или отсутствия клеток-мишеней.

Таблица 9

Оценка активации Т-клеток с помощью биоанализа с CD137

SEQ ID NO:	EC ₅₀ [нМ] с клетками RKO
90 и 87	0,0809
86 и 91	0,0889
92 и 87	0,1811
86 и 93	0,2636
28 и 29	0,8135

Пример 11. Оценка активации Т-клеток с использованием человеческих мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК).

Анализ на Т-клетках использовали для оценки способности выбранных слитых белков костимулировать Т-клеточные ответы, а также предотвращать коингибирование, опосредованное связыванием PD-L1 с PD-1. С этой целью слитые белки в различных концентрациях добавляли к стафилококковому энтеротоксину В (SEB), стимулированному человеческими мононуклеарными клетками периферической крови (МНПК), и инкубировали в течение 4 дней при 37°C. В супернатантах измеряли уровни секреции IL-2.

МНПК от здоровых добровольцев-доноров выделяли из лейкоцитомоноцитарного слоя центрифугированием в градиенте плотности полисахарозы (Bioscoll, 1,077 г/мл, Biochrom), следуя протоколам Biochrom. Очищенные МНПК ресуспендировали в буфере, состоящем из 90% FCS и 10% ДМСО, немедленно замораживали и хранили в жидком азоте до дальнейшего использования. Для анализа МНПК размораживали и помещали в культуральную среду (RPM11640, Life Technologies) с добавкой 10% FCS и 1% пенициллин-стрептомицина (Life Technologies) на 16 ч при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂.

Следующая процедура была проведена в трех повторностях для каждого условия эксперимента: 2,5×10⁴ МНПК инкубировали в каждой лунке 384-луночных планшетов с плоским дном для тканевых культур в культуральной среде. Последовательные разведения слитых белков (SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93, SEQ ID NO: 94 и 87 и SEQ ID NO: 90 и 91), антитела к PD-L1-строительного блока (SEQ ID NO: 86 и 87), референсного антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 26 и 27), референсного антитела к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29), коктейля из референсного антитела к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29) и антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 86 и 87 или SEQ ID NO: 26 и 27) или изотипического контроля (SEQ ID NO: 24 и 25), обычно в диапазоне от 10 до 0,002 нМ, и SEB в концентрации 0,1 нг/мл добавляли в соответствующие лунки. Планшеты закрывали газопроницаемой пленкой (4titude) и инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в течение четырех дней. Затем оценивали уровни IL-2 в супернатанте с использованием набора для определения человеческого IL-2 DuoSet (R&D Systems), как описано в следующих процедурах.

384-луночные планшеты покрывали на 2 ч при комнатной температуре 1 мкг/мл "антитела захвата к человеческому IL-2" в PBS. Затем лунки 5 раз промывали 80 мкл PBS с добавкой 0,05% Tween (PBS-T). Спустя 1 ч блокирования в PBS-0,05%T, содержащем 1% казеина (мас./мас), супернатанты из анализа и серию концентраций стандарта IL-2, разведенного в культуральной среде, переносили в соответствующие лунки и инкубировали в течение ночи при 4°C. На следующий день добавляли смесь 100 нг/мл козьего детектирующего антитела анти-hIL-2-Bio (R&D Systems) и 1 мкг/мл меченого Sulfotag стрептавидина (Mesoscale Discovery) в PBS-T, содержащем 0,5% казеина, и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывки в каждую лунку добавляли 25 мкл буфера для считывания (Mesoscale Discovery) и детектировали полученный сигнал электрохемилюминесценции (ECL) считывающим устройством Mesoscale Discovery. Анализ и количественную оценку проводили с использованием программного обеспечения Mesoscale Discovery.

Результат иллюстративного эксперимента представлен на фиг. 9.

Биспецифические слитые белки SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93, SEQ ID NO: 94 и 87 и SEQ ID NO: 90 и 91 способны индуцировать активацию Т-клеток, о чем свидетельствуют повышенные уровни секреции IL-2 по сравнению с изотипическим контролем (hlgG4, Sigma). Самое большое повышение секреции IL-2 наблюдается для слитых белков, четырехвалентных к CD137 (SEQ ID NO: 94 и 87 и SEQ ID NO: 90 и 91), за ними следуют слитые белки, бивалентные к CD137, где мутеин липокалина слит с С-концом PD-L1-специфического антитела (SEQ ID NO: 90 и 87 и SEQ ID NO: 86 и 91). Самое маленькое повышение наблюдается для слитых белков, бивалентных к CD137, где мутеин липокалина слит с N-концом PD-L1-специфического антитела (SEQ ID NO: 92 и 87 и SEQ ID NO: 86 и 93), однако оно все еще сопоставимо с коктейлем из референсного антитела к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29) и референсного антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 26 и 27). Все слитые белки демонстрируют более высокие уровни секреции IL-2, чем отдельные строительные блоки, т.е. CD137-специфический мутеин липокалина-Fc (SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 89) или mAb к PD-L1-

строительный блок (SEQ ID NO: 86 и 87).

Пример 12. Оценка активации Т-клеток в присутствии опухолевых клеток, экспрессирующих различные уровни PD-L1.

Дополнительный анализ на Т-клетках использовали для оценки способности слитых белков костимулировать активацию Т-клеток зависимым от мишени PD-L1 образом. Слитые белки применяли в различных концентрациях к Т-клеткам, стимулированным антителом к CD3, в присутствии линий опухолевых клеток с различными уровнями экспрессии PD-L1. Протестированные линии опухолевых клеток включают RKO (высокий уровень PD-L1), HCC827 (умеренный уровень PD-L1) и Hep-G2 (PD-L1-отрицательные). В супернатантах измеряли уровни секреции IL-2.

МНПК от здоровых добровольцев-доноров выделяли из лейкоцитомоноцитарного слоя, как описано в примере 11. Т-лимфоциты дополнительно выделяли из МНПК с помощью магнитно-активированной сортировки клеток с использованием набора для очистки пан-Т-клеток (Miltenyi Biotec GmbH) в соответствии с инструкциями производителя. Очищенные пан-Т-клетки ресуспендировали в буфере, состоящем из 90% FCS и 10% ДМСО, немедленно замораживали и хранили в жидком азоте до дальнейшего использования.

Для анализа Т-клетки размораживали и помещали в культуральную среду (RPMI 1640, Life Technologies) с добавкой 10% FCS и 1% пенициллин-стрептомицина (Life Technologies) на 16 ч при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂.

Следующая процедура была проведена в трех повторах для каждого условия эксперимента: планшеты с плоским дном для тканевых культур предварительно покрывали 0,25 мкг/мл антитела к CD3 на 1 ч при 37°C, а затем дважды промывали PBS. Линии опухолевых клеток RKO, HCC827 или Hep-G2 обрабатывали в течение 30 минут 30 мкг/мл митомицина С (Sigma Aldrich) для блокирования пролиферации. Затем обработанные митомицином опухолевые клетки дважды промывали PBS и высевали из расчета $2,5 \times 10^4$ клеток на лунку в культуральную среду, чтобы обеспечить прикрепление, на ночь при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Клетки-мишени, до этого выращивавшиеся в стандартных условиях, отделяли с помощью Accutase (PAA Laboratories) и ресуспендировали в культуральной среде.

В следующие дни после двукратной промывки планшетов PBS к опухолевым клеткам добавляли $1,25 \times 10^4$ Т-клеток на лунку. Последовательные разведения слитых белков (SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87 и SEQ ID NO: 86 и 93), референсного антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 26 и 27) и референсного антитела к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29), использованных по отдельности или в комбинации, или изотипического контроля (SEQ ID NO: 24 и 25), обычно в диапазоне от 0,005 нМ до 10 нМ, добавляли в соответствующие лунки. Планшеты закрывали газопроницаемой пленкой и инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в течение 3 дней.

Спустя 3 дня совместного культивирования оценивали уровень IL-2 в супернатанте, как описано в примере 11.

Иллюстративные данные показаны на фиг. 10. Совместное культивирование пан-Т-клеток с клетками RKO (высокий уровень PD-L1) или HCC827 (умеренный уровень PD-L1) в присутствии слитых белков, где мутеин липокалина слит с С-концом PD-L1-специфического антитела (SEQ ID NO: 90 и 87 и SEQ ID NO: 86 и 91), приводило к явному повышению секреции IL-2 по сравнению с изотипическим контролем hlgG4. Повышение секреции IL-2, вызванное слитыми белками, где мутеин липокалина слит с N-концом PD-L1-специфического антитела (SEQ ID NO: 92 и 87 и SEQ ID NO: 86 и 93), было более слабым, но тем не менее выше, чем с коктейлем из референсного антитела к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29) и референсного антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 26 и 27). Никакого повышения секреции IL-2 не наблюдалось с коктейлем из строительных блоков: CD137-специфического мутеина липокалина (слияние с Fc, SEQ ID NO: 89) и антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 86 и 87). Кроме того, совместное культивирование с Hep-G2 (PD-L1-отрицательные) не вызывало повышения уровней секреции IL-2 ни с какими слитыми белками, в отличие от коктейля из референсного антитела к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29) и референсного антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 26 и 27).

Данные показывают, что функциональная активность слитых белков, измеренная по их способности активировать Т-клетки или повышать секрецию IL-2, зависит от PD-L1. Напротив, активация Т-клеток или секреция IL-2, индуцированная референсным антителом к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29) при использовании в комбинации с референсным антителом к PD-L1 (SEQ ID NO: 26 и 27), не обязательно зависит от PD-L1 и ее трудно предсказать. Кроме того, данные показывают, что биспецифический формат нацеливания на PD-L1 и CD137 превосходит коктейль из двух отдельных молекул, нацеленных на CD137 и PD-L1, в присутствии клеток-мишеней, экспрессирующих PD-L1.

Пример 13. Оценка стабильности слитых белков при хранении.

Для оценки стабильности при хранении иллюстративные слитые белки (SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93, SEQ ID NO: 94 и 87, SEQ ID NO: 88 и SEQ ID NO: 89) инкубировали в течение 1 недели при 37°C в концентрации 1 мг/мл в PBS. Затем определяли мономерные слитые белки с использованием аналитической эксклюзионной хроматографии путем нанесения 20 мкг образца на колонку Superdex 200, 3.2/300 Increase (GE Healthcare) при скорости потока

0,15 мл/мин и PBS в качестве подвижного буфера. Все протестированные слитые пептиды были стабильными после инкубации в течение 1 недели в PBS при 37°C. Иллюстративные результаты показаны на фиг. 11А.

Дальнейшие оценки стабильности при хранении были выполнены для выбранного слитого белка с последовательностями SEQ ID NO: 90 и 87. Слитый белок в концентрации 20 мг/мл инкубировали в течение четырех недель при 40°C в 25 мМ гистидине, 60 мМ NaCl, 200 мМ аргинине, pH 6. Содержание функционального слитого белка измеряли с помощью количественного анализа ELISA, используя анализ одновременного связывания, как описано в примере 5. Иллюстративные результаты показаны на фиг. 11В.

Пример 14. Оценка реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR) с CD4⁺ Т-клетками.

Анализ реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR) использовали для оценки способности иллюстративного слитого белка индуцировать активацию CD4⁺ Т-клеток в присутствии антигенпрезентирующих клеток. Слитый белок (SEQ ID NO: 90 и 87) в различных концентрациях тестировали в присутствии моноцитарных дендритных клеток (moDC) и CD4⁺ Т-клеток от несовместимых здоровых доноров. Спустя 6 дней культивирования в присутствии тестируемых молекул количественно определяли секрецию IL-2 и IFN-гамма в супернатантах.

МНПК очищали из пакета концентрата тромбоцитов, полученного аферезом, используя раствор Lymphoprep, следуя инструкциям производителя (StemCell). Суммарные CD4⁺ Т-лимфоциты очищали от МНПК с использованием набора от Miltenyi и замораживали в растворе 90% FBS 10% ДМСО. CD14⁺ моноциты очищали с использованием набора CD14⁺ микросфер (Miltenyi) и использовали в свежем виде.

MoDC были получены путем культивирования CD14⁺ моноцитов в RPMI1640 с 10% FBS и пенициллин/стрептомицином (LifeTech) в присутствии 50 нг/мл IL-4 и 100 нг/мл ГМ-КСФ (Miltenyi) в течение 6 дней при 2×10⁶ клеток/мл. На 3-й день добавляли 10 мл свежей среды, содержащей цитокины. Фенотип (CD14, CD1a, HLADR, PD-L1) оценивали на 7-й день дифференцировки с помощью FACS.

10000 moDC культивировали в присутствии 50000 CD4⁺ Т-клеток в 96-луночных планшетах с U-образным дном в полной среде RPMI, в присутствии тестируемых молекул в течение 6 дней в RPMI в трех параллельных лунках. По окончании культивирования супернатанты немедленно замораживали и хранили для количественного определения цитокинов.

Уровень IL-2 измеряли в супернатантах с использованием технологии Luminesx, и иллюстративные данные показаны на фиг. 12. На фиг. 12А показано, что слитый белок (SEQ ID NO: 90 и 87) продемонстрировал значительно лучшую индукцию IL-2 при 10 и 0,1 мкг/мл по сравнению с соответствующими строительными блоками (SEQ ID NO: 89 и SEQ ID NO: 86 и 87) по отдельности или референсным антигеном к CD137 или к PD-L1 (SEQ ID NO: 28 и 29 или SEQ ID NO: 26 и 27) в нескольких сериях экспериментов MLR (N=8). На фиг. 12В показано, что слитый белок (SEQ ID NO: 90 и 87) индуцировал дозозависимую секрецию IL-2 по сравнению с антигеном изотипического контроля. Уровни IL-2, индуцированные слитым белком с последовательностями SEQ ID NO: 90 и 87, были выше по сравнению с эквивалентными концентрациями коктейля из референсного антигена к PD-L1 (SEQ ID NO: 26 и 27) и референсного антигена к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29) в диапазоне концентраций от 0,001 до 20 мкг/мл.

Пример 15. Оценка реакции смешанной культуры лимфоцитов с CD8⁺ Т-клетками.

Учитывая сведения об экспрессии и активности CD137 в человеческих CD8⁺ Т-клетках, описанные в литературе, способность иллюстративного слитого белка индуцировать активацию CD8⁺ Т-клеток в присутствии антигенпрезентирующих клеток оценили в анализе MLR. Слитый белок (SEQ ID NO: 90 и 87) тестировали в присутствии moDC и суммарных CD8⁺ Т-клеток от несовместимых здоровых доноров. Спустя 6 дней культивирования в присутствии тестируемых молекул количественно определяли секрецию IL-2 и эффекторных молекул CD8 (перфорина, гранзима В и гранзима А) в супернатантах.

МНПК очищали из пакета концентрата тромбоцитов, полученного аферезом, используя раствор Lymphoprep, следуя инструкциям производителя (StemCell). Суммарные CD8⁺ Т-лимфоциты очищали от МНПК с использованием набора от Miltenyi и использовали свежими. CD14-положительные моноциты очищали с использованием набора микросфер CD14⁺ (Miltenyi) и использовали в свежем виде.

MoDC были получены путем культивирования CD14⁺ моноцитов в RPMI1640 с 10% FBS и пенициллин/стрептомицином (LifeTech) в присутствии 50 нг/мл IL-4 и 100 нг/мл ГМ-КСФ (Miltenyi) в течение 6 дней при 2×10⁶ клеток/мл. На 3-й день добавляли 10 мл свежей среды, содержащей цитокины. Фенотип (CD14, CD1a, HLADR, PD-L1) оценивали на 7-й день дифференцировки с помощью FACS.

10000 moDC культивировали с 50000 CD8⁺ Т-клеток в присутствии тестируемых молекул в 96-луночных планшетах с U-образным дном (в трех параллельных лунках) в полной среде RPMI в течение 6 дней. По окончании культивирования супернатанты немедленно замораживали и хранили для количественного определения секретированных факторов.

В супернатантах количественно определяли IL-2, перфорин, гранзим А и гранзим В с использованием технологии Luminesx. Иллюстративные данные показаны на фиг. 13.

На фиг. 13 показано, что слитый белок (SEQ ID NO: 90 и 87) продемонстрировал повышение секреции IL-2, перфорина, гранзима В и гранзима А по сравнению с эквивалентной концентрацией референсного антигена к PD-L1 (SEQ ID NO: 26 и 27), референсного антигена к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29) или

коктейлем из этих двух антител в концентрации 10 мкг/мл (N=4). Данные также указывают на то, что слитый белок (SEQ ID NO: 90 и 87) обладает активностью в отношении цитотоксических CD8⁺ Т-клеток.

Пример 16. Оценка функциональной активности *in vivo* на мышинной модели ксенотрансплантата с привитыми человеческими МНПК.

Чтобы исследовать активность предложенных слитых белков *in vivo*, будет использована мышинная модель ксенотрансплантата, полученного из клеточной линии. В соответствии с этим линия человеческих раковых клеток будет подкожно имплантирована самкам мышей NOG с иммунодефицитом, доставленным в возрасте 4-6 недель с по меньшей мере 1 неделей карантина. После того, как опухоли достигнут объема примерно 80-100 мм³, мышам будут переносить человеческие МНПК. Тестируемые соединения будут инъектированы не менее трех раз, и рост и активность опухоли будут постоянно измеряться. По достижении конца исследования мыши будут умерщвлены. Внутриопухольевую инфильтрацию CD3-, CD4- и CD8-положительными клетками будут оценивать с помощью иммуногистохимии. В качестве дополнительного показателя будет проведен анализ IFN-гамма методом RNAscore.

Пример 17. Анализ эпитопа слитых белков.

Для оценки эпитопов, которые распознают слитые белки, и того, являются ли они клинически значимыми, был использован конкурентный формат ELISA для определения конкуренции между слитыми белками и референсным антителом к CD137.

Планшеты для микротитрования покрывали референсным антителом к CD137 с последовательностями SEQ ID NO: 28 и 29 в PBS (4 мкг/мл) при 4°C на ночь. Планшеты промывали пять раз после каждой стадии инкубации 100 мкл PBS-0,05%T (PBS с добавкой 0,05% (об./об.) Tween 20). Планшеты блокировали 2% BSA (мас./об.) в PBS-0,1%T (PBS с добавкой 0,1% (об./об.) Tween 20) в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем снова промывали. Слитые белки (SEQ ID NO: 90 и 87 и SEQ ID NO: 86 и 91), мутеин липокалина, специфичный к CD137 (SEQ ID NO: 42), референсное антитело к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29) и контрольное антитело (SEQ ID NO: 86 и 87) в различных концентрациях смешивали с 1 нМ биотинилированного человеческого CD137, слитого с Fc (huCD137-Fc-bio), в качестве индикатора и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Смеси тестируемых молекул и индикатора добавляли в планшеты и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре, после чего проводили пять этапов промывки 100 мкл PBS-0,05%T. Затем в лунки добавляли разведенный 1:5000 ExtrAvidin-HRP (Sigma-Aldrich) в PBS-0,1%T-2%BSA и инкубировали в течение 1 ч. После дополнительной стадии промывки в каждую лунку добавляли флуорогенный субстрат HRP (QuantaBlu, Thermo) и определяли интенсивность флуоресценции с помощью считывающего флуоресценцию устройства для микропланшетов.

Данные о конкуренции для иллюстративного эксперимента показаны на фиг. 14, где на оси x обозначена концентрация тестируемой молекулы, а на оси y - измеренная концентрация индикаторной молекулы. Данные аппроксимировали сигмоидальной кривой 1:1, где значение IC₅₀ и максимальный сигнал были свободными параметрами, а наклон был установлен равным единице. Результаты демонстрируют, что иллюстративные слитые белки (SEQ ID NO: 90 и 87 и SEQ ID NO: 86 и 91) конкурируют с антителом к CD137 с последовательностями SEQ ID NO: 28 и 29 за связывание с CD137, что позволяет предположить, что слитые белки связывают перекрывающиеся с антителом эпитопы.

Таблица 10

Конкуренция слитых белков

SEQ ID NO:	IC ₅₀ [нМ]
90 и 87	1,10
86 и 91	0,99
28 и 29	0,20
42	2,60

Пример 18. Оценка активации Т-клеток с помощью биоанализа блокады PD-1/PD-L1.

Потенциал выбранных слитых белков в отношении блокады опосредованной PD-1/PD-L1 супрессии оценивали с использованием Т-клеток PD-1-NFAT-luc Jurkat (клеточная линия Jurkat, генетически модифицированная для экспрессии PD-1 и гена luc (гена люциферазы светлячка), управляемая элементом ответа NFAT (NFAT-RE)), совместно культивированных с клетками PD-L1 aAPC/CHO-K1 (клетки CHO-K1, экспрессирующие человеческий PD-L1 и генетически модифицированный белок клеточной поверхности, предназначенный для активации родственных TCR антиген-независимым образом). В этом биоанализе, когда Т-клетки PD-1-NFAT-luc Jurkat и клетки PD-L1 aAPC/CHO-K1 совместно культивируются, взаимодействие PD-1/PD-L1 ингибирует передачу сигналов TCR и опосредованную NFAT-RE люминесценцию. Добавление агента, блокирующего PD-1/PD-L1, такого как слитые белки, специфичные к CD137 и PD-L1, как описано в настоящем документе, высвобождает ингибирующий сигнал и приводит к активации TCR и опосредованной NFAT-RE люминесценции.

Клетки PD-L1 aAPC/CHO-K1 выращивали в среде F12 Хэма с добавкой 10% FCS и высевали из расчета $8,00 \times 10^3$ клеток на лунку и оставляли на ночь для прикрепления при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO_2 . На следующий день культуральные среды отбрасывали. В каждую лунку добавляли $1,00 \times 10^4$ Т-клеток PD-1-NFAT-luc Jurkat с последующим добавлением различных концентраций, обычно в диапазоне от 0,005 нМ до 50 нМ, слитого белка (SEQ ID NO: 90 и 87) или антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 86 и 87 или SEQ ID NO: 26 и 27). Планшеты закрывали газопроницаемой пленкой и инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO_2 . Через 6 ч в каждую лунку добавляли 30 мкл реагента Bio-Glo™ и количественно определяли биолюминесцентный сигнал с помощью люцинометра. Анализ с использованием четырехпараметрической логистической кривой был выполнен с помощью GraphPad Prism® для расчета значений EC_{50} , которые обобщены в табл. 11. Анализ проводили в трех повторностях.

Результаты иллюстративного эксперимента представлены на фиг. 15.

Данные демонстрируют, что тестируемый слитый белок ингибирует блокаду PD-1/PD-L1 и активирует Т-клетки дозозависимым образом со значением EC_{50} , сопоставимым со значением EC_{50} для антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 86 и 87 или SEQ ID NO: 26 и 27). Используемые в качестве отрицательных контролей референсное антитело к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29) и/или антитело изотипического контроля (SEQ ID NO: 24 и 25) не приводят к увеличению сигнала люминесценции.

Таблица 11

Оценка активации Т-клеток с помощью биоанализа блокады PD-1/PD-L1

SEQ ID NO:	EC_{50} [нМ]
90 и 87	0,49
86 и 91	0,58
28 и 29	0,46

Пример 19. Оценка активации Т-клеток с использованием человеческих МНПК.

Для оценки способности выбранных слитых белков костимулировать Т-клеточные ответы использовали дополнительный анализ на Т-клетках, в котором слитые белки в различных концентрациях добавляли к стимулированным SEB человеческим МНПК и инкубировали в течение 3 дней при 37°C . В супернатантах измеряли уровни секреции IL-2.

МНПК от здоровых добровольцев-доноров выделяли и хранили, как описано в примере 11. Для анализа МНПК размораживали и помещали в культуральную среду (RPMI 1640, Life Technologies) с добавкой 10% FCS и 1% пенициллин-стрептомицина (Life Technologies) на 24 ч при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO_2 .

Следующая процедура была проведена в трех повторностях для каждого условия эксперимента: $2,5 \times 10^4$ МНПК инкубировали в каждой лунке 384-луночных планшетов с плоским дном для тканевых культур в культуральной среде. Последовательные разведения выбранного слитого белка (SEQ ID NO: 90 и 87), антитела к PD-L1-строительного блока (SEQ ID NO: 86 и 87), референсного антитела к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29), использованного по отдельности или в комбинации с референсным антителом к PD-L1 (SEQ ID NO: 26 и 27), или изотипического контроля (SEQ ID NO: 24 и 25), обычно в диапазоне от 0,0002 до 10 нМ, и 0,1 нг/мл SEB добавляли в соответствующие лунки. Планшеты закрывали газопроницаемой пленкой (4titude) и инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO_2 в течение трех дней. Затем оценивали уровень IL-2 в супернатанте, как описано в примере 11.

Результаты иллюстративного эксперимента представлены на фиг. 16.

Сводные значения EC_{50} тестируемых молекул в отношении индукции секреции IL-2 приведены в табл. 12. Биспецифический слитый белок с последовательностями SEQ ID NO: 90 и 87 индуцирует сильное дозозависимое повышение секреции IL-2 до более высоких уровней по сравнению с антителом к PD-L1-строительным блоком, референсным антителом к CD137 и коктейлем из референсных антител к PD-L1 и к CD137, а также снижает значение эффективности EC_{50} по сравнению с антителами к PD-L1 и к CD137, используемыми по отдельности или в комбинации.

Таблица 12

Оценка активации Т-клеток с использованием человеческих МНПК

Донор	EC_{50} [нМ]			
	SEQ ID NO: 90 и 87	SEQ ID NO: 86 и 87	SEQ ID NO: 26 и 27	SEQ ID NO: 28 и 29 + SEQ ID NO: 86 и 87
№ 1	0,019	0,061	0,250	0,279
№ 2	0,026	0,057	0,134	0,089

Пример 20. Оценка PD-L1-зависимой активации Т-клеток, индуцированной слитыми белками.

Зависимую от мишени PD-L1 костимуляцию Т-клеток слитыми белками дополнительно анализировали с использованием анализа активации Т-клеток. Слитые белки применяли в различных концентрациях к Т-клеткам, стимулированным антителом к CD3, совместно культивированным с клетками Flp-In-CHO, трансфицированными человеческим PD-L1 или ложно трансфицированными. В супернатантах измеряли уровни секреции IL-2.

МНПК от здоровых добровольцев-доноров выделяли из лейкоцитомоноцитарного слоя, как описано в примере 11. Т-лимфоциты дополнительно очищали и хранили, как описано в примере 12.

Для анализа Т-клетки размораживали и помещали в культуральную среду (RPMI 1640, Life Technologies) с добавкой 10% FCS и 1% пенициллин-стрептомицина (Life Technologies) на ночь при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂.

Следующая процедура была проведена в трех повторах для каждого условия эксперимента: планшеты с плоским дном для тканевых культур предварительно покрывали 0,25 мкг/мл антитела к CD3 на 2 ч при 37°C, а затем дважды промывали PBS. Клетки CHO, трансфицированные человеческим PD-L1 или ложно трансфицированные, обрабатывали в течение 30 минут 30 мкг/мл митомицина С (Sigma Aldrich) для блокирования пролиферации. Затем обработанные митомицином клетки дважды промывали PBS и высевали из расчета $1,0 \times 10^7$ клеток на лунку в культуральной среде, чтобы обеспечить прикрепление, в течение ночи при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Клетки CHO, до этого выращивавшиеся в стандартных условиях, отделяли с помощью Accutase (PAA Laboratories) и ресуспендировали в культуральной среде.

В следующие дни к клеткам CHO добавляли $8,33 \times 10^3$ Т-клеток на лунку.

Последовательные разведения иллюстративного слитого белка с последовательностями SEQ ID NO: 90 и 87, антитела к PD-L1-строительного блока (SEQ ID NO: 86 и 87), референсного антитела к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29) и коктейля из референсного антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 26 и 27) и референсного антитела к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29), или изотипического контроля (SEQ ID NO: 24 и 25), обычно в диапазоне от 0,003 нМ до 50 нМ, добавляли в соответствующие лунки. Планшеты закрывали газопроницаемой пленкой и инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в течение 2 дней.

Спустя 2 дня совместного культивирования оценивали уровни IL-2 в супернатанте, как описано в примере 11.

Иллюстративные данные показаны на фиг. 17. Совместное культивирование пан-Т-клеток с клетками CHO, трансфицированными человеческим PD-L1, в присутствии слитого белка (SEQ ID NO: 90 и 87 и SEQ ID NO: 86 и 91) привело к сильной дозозависимой секреции IL-2 по сравнению с изотипическим контролем hIgG4 и намного более сильной, чем у референсных антител, где наблюдалось лишь небольшое повышение секреции IL-2 для референсного антитела к CD137 или коктейля из референсного антитела к CD137 и референсного антитела к PD-L1. При совместном культивировании с ложно трансфицированными клетками CHO (PD-L1-отрицательными) только референсное антитело к CD137 и коктейль из референсного антитела к CD137 и референсного антитела к PD-L1 показали небольшое дозозависимое повышение секреции IL-2. Результаты показывают, что активация Т-клеток слитыми белками зависит от PD-L1, тогда как референсное антитело к CD137 (SEQ ID NO: 28 и 29) продемонстрировало опосредованную CD137 костимуляцию Т-клеток независимо от наличия или отсутствия клеток-мишеней.

Пример 21. Фармакокинетика слитых белков у мышей.

Проводили анализы фармакокинетики иллюстративных слитых белков (SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93, SEQ ID NO: 94 и 87 и SEQ ID NO: 90 и 91) на мышцах. Самцам мышей CD-1 возрастом приблизительно 5 недель (3 мыши на временную точку; Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH) вводили в хвостовую вену слитый белок в дозе 10 мг/кг. Тестируемые препараты вводили в виде болуса объемом 5 мл/кг. Образцы плазмы мышей получали во временных точках 5 мин, 1 час, 4 часа, 8 часов, 24 часа, 48 часов, 4 дня, 8 дней, 14 дней, 21 день и 28 дней. Собирали достаточное количество цельной крови - кровь брали под анестезией изофлураном - для получения не менее 100 мкл плазмы с Li-гепарином на животное и временную точку. Уровни лекарственного средства определяли с помощью сэндвич-ELISA, детектируя целую биспецифическую конструкцию посредством мишеней PD-L1 и CD137. Данные аппроксимировали с использованием двухкомпарментной модели с использованием программного обеспечения Prism GraphPad 5.

На фиг. 18 показаны графики зависимости концентрации в плазме от времени для слитых белков SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 86 и 91, SEQ ID NO: 92 и 87, SEQ ID NO: 86 и 93, SEQ ID NO: 94 и 87 и SEQ ID NO: 90 и 91, нанесенные на график вместе со значениями, полученными для антитела к PD-L1-строительного блока (SEQ ID NO: 86 и 87) в качестве референсного. Фармакокинетика во всех случаях была схожей. Начиная с концентрации в плазме около 200 мкг/мл, уровни в плазме упали до уровня около 50 мкг/мл в течение 48 часов, а затем снижались гораздо медленнее до уровня около 10 мкг/мл в конце эксперимента через 28 дней. К этим данным был применен некомпартментный анализ. Сводные значения конечных периодов полувыведения приведены в табл. 13.

Данные демонстрируют, что слитые белки имеют длительные, антителоподобные конечные перио-

ды полувыведения у мышей. Поскольку анализ, используемый для определения концентраций слитых белков в плазме, требует сохранения активности как в отношении PD-L1, так и CD137, результат также демонстрирует, что биспецифические молекулы остаются неизменными в течение 28 дней.

Таблица 13

Конечные периоды полувыведения у мышей, определенные с использованием некомпартментного анализа

SEQ ID NO:	Конечный период полувыведения [ч]
90 и 87	295
92 и 87	346
86 и 93	332
94 и 87	209
90 и 91	250
86 и 87	390

Пример 22. Фармакокинетика слитых белков у мышей.

Был проведен анализ фармакокинетики иллюстративного слитого белка с последовательностями SEQ ID NO: 90 и 87 у мышей и сопоставлен с двумя ранее описанными CD137- и PD-L1-связывающими слитыми белками (SEQ ID NO: 147 и SEQ ID NO: 148). Самцам мышей CD-1 возрастом приблизительно 5 недель (2 мыши на временную точку; Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH) вводили в хвостовую вену соответствующую молекулу в дозе 2 мг/кг. Образцы плазмы мышей получали во временных точках 5 мин, 24 часа, 168 часов и 336 часов. Собирали достаточное количество цельной крови - кровь брали под анестезией изофлураном - для получения не менее 30-50 мкл плазмы с Li-гепарином на животное и временную точку.

Затем анализировали уровни лекарственного средства в плазме с помощью ELISA. HuCD137-His (человеческий CD137 с С-концевой полигистидиновой меткой) растворяли в PBS (1 мкг/мл) и наносили на микротитровальные планшеты на ночь при 4°C. Планшет пять раз промывали после каждой стадии инкубации 80 мкл PBS с добавкой 0,05% (об./об.) Tween 20. Планшеты блокировали PBS/BSA/Tween (PBS, содержащий 2% BSA (мас./об.) и 0,1% (об./об.) Tween 20) в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем промывали. Образцы плазмы разводили в PBS/BSA/Tween до концентрации плазмы 20%, добавляли в лунки и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем проводили еще одну стадию промывки. Спустя 1 ч инкубации исследуемые связанные агенты детектировали смесью биотинилированного человеческого PD-L1 и стрептавидина SULFO-TAG (MesoScale Discovery) в концентрации 1 мкг/мл каждый, разведенных в PBS, содержащем 2% BSA (мас./об.) и 0,1% (об./об.) Tween 20. После дополнительной стадии промывки в каждую лунку добавляли 35 мкл буфера для считывания и считывали сигнал электрохемиллюминесценции (ECL) из каждой лунки с помощью считывающего устройства MesoScale Discovery. Данные переносили в Excel для анализа и количественной оценки. Была построена градуировочная кривая со стандартными разведениями белка.

На фиг. 19 показаны графики зависимости концентрации в плазме от времени для SEQ ID NO: 90 и 87, SEQ ID NO: 147 и SEQ ID NO: 148. SEQ ID NO: 90 и 87 демонстрирует благоприятный фармакокинетический профиль или антителоподобную фармакокинетику, в отличие от SEQ ID NO: 147 и SEQ ID NO: 148. В контексте настоящего документа можно считать, что благоприятный фармакокинетический профиль или антителоподобная фармакокинетика достигнуты, если % c_{max} был выше 10% спустя 336 часов.

Варианты осуществления, описанные в настоящем документе в целях иллюстрации, могут подходящим образом быть осуществлены на практике при отсутствии какого-либо элемента или элементов, ограничения или ограничений, конкретно не раскрытых в настоящем документе. Таким образом, например, термины "содержащий", "включающий" и т.д. следует толковать расширительно и без ограничения. Кроме того, используемые в настоящем документе термины и выражения использовались как термины для описания, а не ограничения, и при использовании таких терминов и выражений не подразумевается исключение каких-либо эквивалентов показанных и описанных признаков или их частей, но считается, что в объеме заявленного изобретения возможны различные модификации. Таким образом, следует понимать, что, хотя настоящие варианты осуществления были конкретно раскрыты с помощью предпочтительных вариантов осуществления и необязательных признаков, специалисты в данной области техники могут прибегать к его модификации и вариациям, и что такие модификации и вариации рассматриваются как входящие в объем данного изобретения. Все патенты, патентные заявки, учебники и рецензируемые публикации, описанные в настоящем документе, настоящим полностью включены посредством ссылки. Кроме того, если определение или использование термина в источнике, включенном в настоящий документ посредством ссылки, не согласуется или противоречит определению этого термина, приведенному в настоящем документе, применяется определение этого термина, приведенное в настоящем документе, а определение этого термина в источнике не применяется. Каждый из более узких видов и субродовых

групп, подпадающих под общее раскрытие, также составляет часть изобретения. Это включает общее описание изобретения с условием или отрицательным ограничением, исключающим любой объект из рода, независимо от того, упомянут ли конкретно удаленный материал в настоящем документе. Кроме того, если признаки описаны в виде групп Маркуша, специалисты в данной области техники поймут, что изобретение тем самым также описано посредством любого отдельного члена или подгруппы членов группы Маркуша. Дополнительные варианты осуществления станут очевидными из следующей формулы изобретения.

Эквиваленты: Специалисты в данной области техники поймут или смогут установить, используя не более чем обычное экспериментирование, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем документе. Подразумевается, что такие эквиваленты охватываются следующей формулой изобретения. Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были специально и индивидуально указаны как включенные в настоящий документ посредством ссылки.

VI. Непатентные источники

1. GATO-CANAS, M., ZUAZO, M., ARASANZ, H., IBANEZ-VEA, M., LORENZO, L., FERNANDEZ-HINOJAL, G., VERA, R., SMERDOU, C., MARTISOVA, E., AROZARENA, I., WELLBROCK, C., LLOPIZ, D., RUIZ, M., SAROBE, P., BRECKPOT, K., KOCHAN, G. & ESCORS, D. 2017. PDL1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity. *Cell Rep*, 20, 1818-1829.
2. KARWACZ, K., BRICOGNE, C., MACDONALD, D., ARCE, F., BENNETT, C. L., COLLINS, M. & ESCORS, D. 2011. PD-L1 co-stimulation contributes to ligand-induced T cell receptor down-modulation on CD8+ T cells. *EMBO Mol Med*, 3, 581-92.
3. ARASANZ, H., GATO-CANAS, M., ZUAZO, M., IBANEZ-VEA, M., BRECKPOT, K., KOCHAN, G. & ESCORS, D. 2017. PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget*, 8, 51936-51945.
4. PATSOUKIS, N., BARDHAN, K., CHATTERJEE, P., SARI, D., LIU, B., BELL, L. N., KAROLY, E. D., FREEMAN, G. J., PETKOVA, V., SETH, P., LI, L. & BOUSSIOTIS, V. A. 2015. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun*, 6, 6692.
5. XU-MONETTE, Z. Y., ZHANG, M., LI, J. & YOUNG, K. H. 2017. PD-1/PD-L1 Blockade: Have We Found the Key to Unleash the Antitumor Immune Response? *Front Immunol*, 8, 1597.
6. LI, S. Y. & LIU, Y. 2013. Immunotherapy of melanoma with the immune costimulatory monoclonal antibodies targeting CD137. *Clin Pharmacol*, 5, 47-53.
7. SNELL, L. M., LIN, G. H., MCPHERSON, A. J., MORAES, T. J. & WATTS, T. H. 2011. T-cell intrinsic effects of GITR and 4-1BB during viral infection and cancer immunotherapy. *Immunol Rev*, 244, 197-217.
8. WYZGOL, A., MULLER, N., FICK, A., MUNKEL, S., GRIGOLEIT, G. U., PFIZENMAIER, K. & WAJANT, H. 2009. Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand. *J Immunol*, 183, 1851-61.
9. YAO, S., ZHU, Y. & CHEN, L. 2013. Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. *Nat Rev Drug Discov*, 12, 130-46.
10. MELERO, I., BACH, N., HELLSTROM, K. E., ARUFFO, A., MITTLER, R. S. & CHEN, L. 1998. Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand: synergy with the CD28 co-stimulatory pathway. *Eur J Immunol*, 28, 1116-21.
11. YANG, Y., YANG, S., YE, Z., JAFFAR, J., ZHOU, Y., CUTTER, E., LIEBER, A., HELLSTROM, I. & HELLSTROM, K. E. 2007. Tumor cells expressing anti-CD137 scFv induce a tumor-destructive environment. *Cancer Res*, 67, 2339-44.
12. ZHANG, H., KNUTSON, K. L., HELLSTROM, K. E., DISIS, M. L. & HELLSTROM, I. 2006. Antitumor efficacy of CD137 ligation is maximized by the use of a CD137 single-chain Fv-expressing whole-cell tumor vaccine compared with CD137-specific monoclonal antibody infusion. *Mol Cancer Ther*, 5, 149-55.
13. YE, Z., HELLSTROM, I., HAYDEN-LEDBETTER, M., DAHLIN, A., LEDBETTER, J. A. & HELLSTROM, K. E. 2002. Gene therapy for cancer using single-chain Fv fragments specific for 4-1BB. *Nat Med*, 8, 343-8.
14. MARTINET, O., DIVINO, C. M., ZANG, Y., GAN, Y., MANDELI, J., THUNG, S., PAN, P. Y. & CHEN, S. H. 2002. T cell activation with systemic agonistic antibody versus local 4-1BB ligand gene delivery combined with interleukin-12 eradicate liver metastases of breast cancer. *Gene Ther*, 9, 786-92.
15. YE, Q., SONG, D. G., POUSSIN, M., YAMAMOTO, T., BEST, A., LI, C., COUKOS, G. & POWELL, D. J., JR. 2014. CD137 accurately identifies and enriches for naturally occurring tumor-reactive T cells in tumor. *Clin Cancer Res*, 20, 44-55.
16. CHACON, J. A., WU, R. C., SUKHUMALCHANDRA, P., MOLLDREM, J. J., SARNAIK, A., PILON-THOMAS, S., WEBER, J., HWU, P. & RADVANYI, L. 2013. Co-stimulation through 4-1BB/CD137 improves the expansion and function of CD8(+) melanoma tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive T-cell therapy. *PLoS One*, 8, e60031.

17. FISHER, T. S., KAMPERSCHROER, C., OLIPHANT, T., LOVE, V. A., LIRA, P. D., DOYONNAS, R., BERGQVIST, S., BAXI, S. M., ROHNER, A., SHEN, A. C., HUANG, C., SOKOLOWSKI, S. A. & SHARP, L. L. 2012. Targeting of 4-1BB by monoclonal antibody PF-05082566 enhances T-cell function and promotes anti-tumor activity. *Cancer Immunol Immunother*, 61, 1721-33.
18. SKERRA, A. 2000. Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 337-50.
19. FLOWER, D. R., NORTH, A. C. & SANSOM, C. E. 2000. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 9-24.
20. FLOWER, D. R. 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J*, 318 (Pt 1), 1-14.
21. ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-402.
22. ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, 403-10.
23. SMITH, T. F. & WATERMAN, M. S. 1981. Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol*, 147, 195-7.
24. WARD, E. S., GUSSOW, D., GRIFFITHS, A. D., JONES, P. T. & WINTER, G. 1989. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*, 341, 544-6.
25. HOLLIGER, P., PROSPERO, T. & WINTER, G. 1993. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 6444-8.
26. JOHNSON, G. & WU, T. T. 2000. Kabat database and its applications: 30 years after the first variability plot. *Nucleic Acids Res*, 28, 214-8.
27. EHRENMANN, F., KAAS, Q. & LEFRANC, M. P. 2010. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF. *Nucleic Acids Res*, 38, D301-7.
28. BULLIARD, Y., JOLICOEUR, R., ZHANG, J., DRANOFF, G., WILSON, N. S. & BROGDON, J. L. 2014. OX40 engagement depletes intratumoral Tregs via activating Fc gamma Rs, leading to antitumor efficacy. *Immunol Cell Biol*, 92, 475-80.
29. BULLIARD, Y., JOLICOEUR, R., WINDMAN, M., RUE, S. M., ETTENBERG, S., KNEE, D. A., WILSON, N. S., DRANOFF, G. & BROGDON, J. L. 2013. Activating Fc gamma receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies. *J Exp Med*, 210, 1685-93.
30. SILVA, J. P., VETTERLEIN, O., JOSE, J., PETERS, S. & KIRBY, H. 2015. The S228P mutation prevents in vivo and in vitro IgG4 Fab-arm exchange as demonstrated using a combination of novel quantitative immunoassays and physiological matrix preparation. *J Biol Chem*, 290, 5462-9.
31. GLAESNER, W., VICK, A. M., MILLICAN, R., ELLIS, B., TSCHANG, S. H., TIAN, Y., BOKVIST, K., BRENNER, M., KOESTER, A., PORKSEN, N., ETGEN, G. & BUMOL, T. 2010. Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein. *Diabetes Metab Res Rev*, 26, 287-96.
32. DALL'ACQUA, W. F., KIENER, P. A. & WU, H. 2006. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J Biol Chem*, 281, 23514-24.
33. ZALEVSKY, J., CHAMBERLAIN, A. K., HORTON, H. M., KARKI, S., LEUNG, I. W., SPROULE, T. J., LAZAR, G. A., ROOPENIAN, D. C. & DESJARLAIS, J. R. 2010. Enhanced antibody half-life improves in vivo activity. *Nat Biotechnol*, 28, 157-9.
34. SHIELDS, R. L., NAMENUK, A. K., HONG, K., MENG, Y. G., RAE, J., BRIGGS, J., XIE, D., LAI, J., STADLEN, A., LI, B., FOX, J. A. & PRESTA, L. G. 2001. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem*, 276, 6591-604.
35. ALTSHULER, E. P., SEREBRYANAYA, D. V. & KATRUKHA, A. G. 2010. Generation of recombinant antibodies and means for increasing their affinity. *Biochemistry (Mosc)*, 75, 1584-605.
36. HARLOW, E. & LANE, D. 1999. *Using antibodies : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

37. HARLOW, E. & LANE, D. 1988. *Antibodies : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
38. LI, J., SAI, T., BERGER, M., CHAO, Q., DAVIDSON, D., DESHMUKH, G., DROZDOWSKI, B., EBEL, W., HARLEY, S., HENRY, M., JACOB, S., KLINE, B., LAZO, E., ROTELLA, F., ROUTHIER, E., RUDOLPH, K., SAGE, J., SIMON, P., YAO, J., ZHOU, Y., KAVURU, M., BONFIELD, T., THOMASSEN, M. J., SASS, P. M., NICOLAIDES, N. C. & GRASSO, L. 2006. Human antibodies for immunotherapy development generated via a human B cell hybridoma technology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 3557-62.
39. KOZBOR, D. & RODER, J. C. 1983. The production of monoclonal antibodies from human lymphocytes. *Immunol Today*, 4, 72-9.
40. COLE, S. P., CAMPLING, B. G., LOUWMAN, I. H., KOZBOR, D. & RODER, J. C. 1984. A strategy for the production of human monoclonal antibodies reactive with lung tumor cell lines. *Cancer Res*, 44, 2750-3.
41. HOLLIGER, P. & HUDSON, P. J. 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol*, 23, 1126-36.
42. PERVAIZ, S. & BREW, K. 1987. Homology and structure-function correlations between alpha 1-acid glycoprotein and serum retinol-binding protein and its relatives. *FASEB J*, 1, 209-14.
43. SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
44. FLOWER, D. R. 2000. Beyond the superfamily: the lipocalin receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 327-36.
45. BREUSTEDT, D. A., KORNDORFER, I. P., REDL, B. & SKERRA, A. 2005. The 1.8-A crystal structure of human tear lipocalin reveals an extended branched cavity with capacity for multiple ligands. *J Biol Chem*, 280, 484-93.
46. SCHMIDT, T. G., KOEPKE, J., FRANK, R. & SKERRA, A. 1996. Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol*, 255, 753-66.
47. VAJO, Z. & DUCKWORTH, W. C. 2000. Genetically engineered insulin analogs: diabetes in the new millennium. *Pharmacol Rev*, 52, 1-9.
48. FUERTGES, F. & ABUCHOWSKI, A. 1990. The clinical efficacy of poly(ethylene glycol)-modified proteins. *Journal of Controlled Release*, 11, 139-148.
49. DENNIS, M. S., ZHANG, M., MENG, Y. G., KADKHODAYAN, M., KIRCHHOFER, D., COMBS, D. & DAMICO, L. A. 2002. Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. *J Biol Chem*, 277, 35035-43.
50. KONIG, T. & SKERRA, A. 1998. Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. *J Immunol Methods*, 218, 73-83.
51. OSBORN, B. L., OLSEN, H. S., NARDELLI, B., MURRAY, J. H., ZHOU, J. X., GARCIA, A., MOODY, G., ZARITSKAYA, L. S. & SUNG, C. 2002. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, 303, 540-8.
52. LOWMAN, H. B. 1997. Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 26, 401-24.
53. RODI, D. J. & MAKOWSKI, L. 1999. Phage-display technology--finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr Opin Biotechnol*, 10, 87-93.
54. VENTURI, M., SEIFERT, C. & HUNTE, C. 2002. High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm. *J Mol Biol*, 315, 1-8.
55. BRUCKDORFER, T., MARDER, O. & ALBERICIO, F. 2004. From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future. *Curr Pharm Biotechnol*, 5, 29-43.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок, способный связывать как CD137, так и PD-L1, где указанный слитый белок содержит по меньшей мере две субъединицы, где первая субъединица содержит полноразмерный иммуноглобулин, который является специфичным к PD-L1, и где вторая субъединица содержит мутеин липокалина, который является специфичным к CD137,

где указанный слитый белок содержит аминокислотные последовательности, обладающие по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 90 и 87,

где тяжелая цепь иммуноглобулина содержит следующий набор последовательностей CDR: GFSLSNYD (HCDR1, SEQ ID NO: 60), IWTGGAT (HCDR2, SEQ ID NO: 61) и VRDSNYRYDEPFTY (HCDR3; SEQ ID NO: 62), и легкая цепь иммуноглобулина содержит следующий набор последовательностей CDR: QSIGTN (LCDR1, SEQ ID NO: 63), YAS (LCDR2) и QQSNSWPYT (LCDR3; SEQ ID NO: 64),

и где аминокислотная последовательность мутеина липокалина обладает по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 42.

2. Слитый белок по п.1, отличающийся тем, что

(i) указанный слитый белок способен связывать PD-L1 со значением K_D не более чем прибли-

тельно 2 нМ, или значением, сопоставимым или более низким, чем значение K_D иммуноглобулина или его антигенсвязывающего домена, включенного в указанную первую субъединицу, самого по себе;

(ii) указанный слитый белок способен связывать CD137 со значением K_D не более чем приблизительно 7 нМ, или значением, сопоставимым или более низким, чем значение K_D мутеина липокалина, специфичного к CD137, включенного в указанную вторую субъединицу, самого по себе;

(iii) указанный слитый белок способен связывать PD-L1 со значением EC_{50} не более чем приблизительно 0,5 нМ, или значением, сопоставимым или более низким, чем значение EC_{50} иммуноглобулина или его антигенсвязывающего домена, включенного в указанную первую субъединицу, самого по себе;

(iv) указанный слитый белок способен связывать CD137 со значением EC_{50} не более чем приблизительно 0,6 нМ, или значением, сопоставимым или более низким, чем значение EC_{50} мутеина липокалина, специфичного к CD137, включенного в указанную вторую субъединицу, по отдельности;

(v) указанный слитый белок обладает перекрестной реактивностью с PD-L1 яванского макака;

(vi) указанный слитый белок обладает перекрестной реактивностью с CD137 яванского макака;

(vii) указанный слитый белок способен одновременно связывать CD137 и PD-L1 со значениями EC_{50} не более чем приблизительно 10 нМ, когда указанный слитый белок оценивают в анализе ELISA;

(viii) указанный слитый белок способен связывать CD137, экспрессируемый на клетке, со значениями EC_{50} не более чем приблизительно 60 нМ;

(ix) указанный слитый белок способен связывать PD-L1, экспрессируемый на клетке, со значениями EC_{50} не более чем приблизительно 10 нМ, когда указанный слитый белок оценивают в анализе методом проточной цитометрии;

(x) указанный слитый белок способен связывать экспрессирующие PD-L1 опухолевые клетки;

(xi) указанный слитый белок способен связывать CD137 в присутствии лиганда CD137;

(xii) указанный слитый белок способен конкурировать с PD-1 за связывание с PD-L1;

(xiii) указанный слитый белок способен конкурировать с антителом, представленным в SEQ ID NO: 28 и 29, за связывание с CD137;

(xiv) указанный слитый белок имеет перекрывающийся CD137-связывающий эпитоп с антителом, представленным в SEQ ID NO: 28 и 29;

(xv) указанный слитый белок способен стимулировать пролиферацию и/или ответы Т-клеток;

(xvi) указанный слитый белок способен стимулировать пролиферацию CD4+ и/или CD8+ Т-клеток;

(xvii) указанный слитый белок способен индуцировать повышенную секрецию IL-2 и/или IFN-гамма;

(xviii) указанный слитый белок способен индуцировать повышенную секрецию цитотоксических факторов;

(xix) указанный слитый белок способен костимулировать ответы Т-клеток PD-L1-зависимым образом;

(xx) указанный слитый белок способен костимулировать ответы Т-клеток в микроокружении опухоли;

(xxi) указанный слитый белок неспособен костимулировать ответы Т-клеток в отсутствие PD-L1; или

(xxii) указанный слитый белок способен блокировать ингибирующий сигнал PD-1.

3. Слитый белок по п.1 или 2, в котором

аминокислотная последовательность мутеина липокалина содержит в положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого человеческого липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов (hNGAL), представленной в SEQ ID NO: 2, по меньшей мере десять из следующих мутированных аминокислотных остатков: Gln 28→His; Leu 36→Gln; Ala 40→Ile; Ile 41→Arg или Lys; Gln 49→Val, He, His, Ser или Asn; Tyr 52→Met; Asn 65→Asp; Ser 68→Met, Ala или Gly; Leu 70→Ala, Lys, Ser или Thr; Arg 72→Asp; Lys 73→Asp; Asp 77→Met, Arg, Thr или Asn; Trp 79→Ala или Asp; Arg 81→Met, Trp или Ser; Phe 83→Leu; Cys 87→Ser; Leu 94→Phe; Asn 96→Lys; Tyr 100→Phe; Leu 103→His; Tyr 106→Ser; Lys 125→Phe; Ser 127→Phe; Tyr 132→Glu и Lys 134→Tyr.

4. Слитый белок по любому из пп.1-3, в котором

(i) аминокислотная последовательность мутеина липокалина содержит следующий набор мутированных аминокислотных остатков по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL, представленной в SEQ ID NO: 2:

Gln 28→His; Leu 36→Gln; Ala 40→Ile; Ile 41→Arg; Gln 49→Ile; Tyr 52→Met; Asn 65→Asp; Ser 68→Met; Leu 70→Lys; Arg 72→Asp; Lys 73→Asp; Asp 77→Met; Trp 79→Asp; Arg 81→Trp; Cys 87→Ser; Asn 96→Lys; Tyr 100→Phe; Leu 103→His; Tyr 106→Ser; Lys 125→Phe; Ser 127→Phe; Tyr 132→Glu; и Lys 134→Tyr;

(ii) аминокислотная последовательность мутеина липокалина обладает по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 42; или

(iii) аминокислотная последовательность мутеина липокалина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

5. Слитый белок по любому из пп.1-4, в котором

вторая субъединица связана на N-конце посредством линкера с C-концом константной области ка-

ждой тяжелой цепи (СН) первой субъединицы,

где линкер предпочтительно представляет собой линкер с SEQ ID NO: 13.

6. Слитый белок по любому из пп.1-5, в котором иммуноглобулин содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 77 и 82.

7. Слитый белок по любому из пп.1-6, в котором иммуноглобулин содержит тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 86 и 87.

8. Слитый белок по любому из пп.1-6, в котором иммуноглобулин имеет остов IgG4, где указанный остов IgG4 предпочтительно имеет одну или более из следующих мутаций: S228P, N297A, F234A, L235A, M428L, N434S, M252Y, S254T и T256E.

9. Слитый белок по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что

(i) указанный слитый белок содержит аминокислотные последовательности, обладающие по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или более высокой идентичностью последовательности с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 90 и 87; или

(ii) указанный слитый белок содержит аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 90 и 87.

10. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок по любому из пп.1-9, где предпочтительно

(i) указанная молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с регуляторной последовательностью для обеспечения возможности экспрессии указанной молекулы нуклеиновой кислоты; или

(ii) указанная молекула нуклеиновой кислоты содержится в векторе или в фагмидном векторе.

11. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.10.

12. Способ получения слитого белка по любому из пп.1-9, согласно которому слитый белок получают, начиная с нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок.

13. Способ по п.12, при котором слитый белок продуцируют в бактериальном или эукариотическом организме-хозяине и выделяют из этого организма-хозяина или его культуры.

14. Применение слитого белка по любому из пп.1-9 или композиции, содержащей такой слитый белок, для

(i) одновременной активации нисходящих сигнальных путей CD137 и связывания PD-L1-положительных опухолевых клеток;

(ii) одновременной костимуляции Т-клеток и связывания PD-L1-положительных опухолевых клеток, включающий применение слитого белка или композиции, содержащей такой слитый белок, к ткани, содержащей опухоль;

(iii) одновременной индукции активности лимфоцитов и связывания PD-L1-положительных опухолевых клеток, включающий применение слитого белка или композиции, содержащей такой слитый белок, к ткани, содержащей опухоль;

(iv) индукции кластеризации и активации CD137 на Т-клетках и направления указанных Т-клеток на PD-L1-положительные опухолевые клетки, включающий применение слитого белка или композиции, содержащей такой слитый белок, к ткани, содержащей опухоль;

(v) индукции локализованного ответа лимфоцитов вблизи PD-L1-положительных опухолевых клеток, включающий применение слитого белка или композиции, содержащей такой слитый белок, к ткани, содержащей опухоль;

(vi) индукции повышенной секреции IL-2 и/или цитотоксических факторов Т-клетками вблизи PD-L1-положительных опухолевых клеток, включающий применение слитого белка или композиции, содержащей такой слитый белок, к ткани, содержащей опухоль, где указанные цитотоксические факторы предпочтительно выбраны из группы, состоящей из перфорина, гранзима В и гранзима А;

(vii) индукции повышенной секреции цитотоксических факторов Т-клетками вблизи PD-L1-положительных опухолевых клеток, включающий применение слитого белка или композиции, содержащей такой слитый белок, к ткани, содержащей опухоль; или

(viii) предупреждения, облегчения или лечения PD-L1-положительного рака.

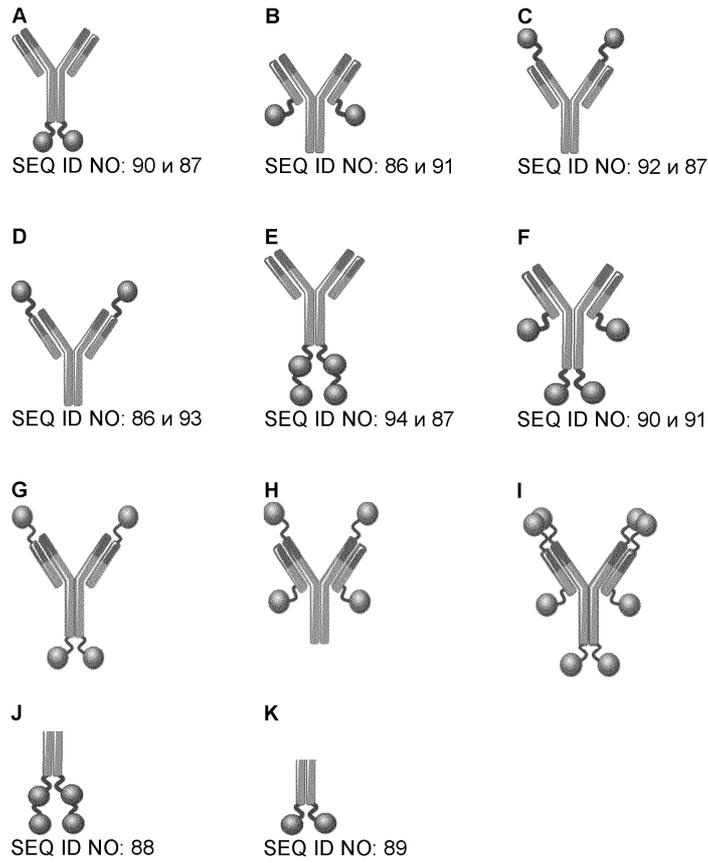
15. Фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок по любому из пп.1-9.

16. Применение слитого белка по любому из пп.1-9 для терапии.

17. Применение по п.16 для лечения рака.

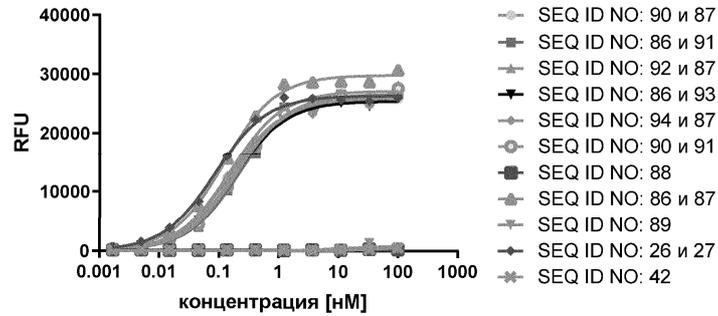
18. Применение слитого белка по любому из пп.1-9 для производства лекарственного средства.

19. Применение по п.18, где указанное лекарственное средство предназначено для лечения рака.

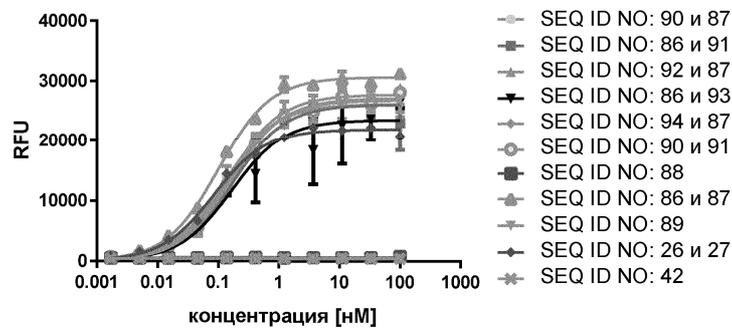


Фиг. 1

А. связывание с человеческим PD-L1

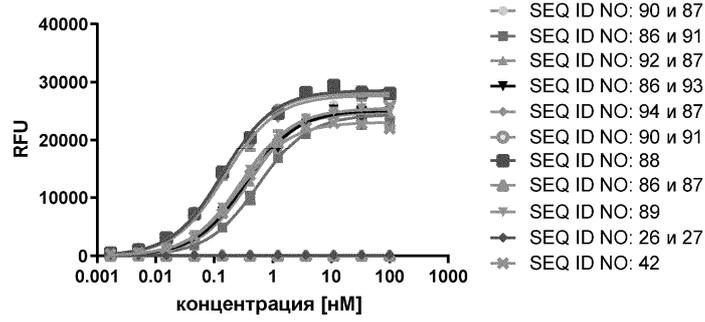


В. связывание с PD-L1 яванского макака

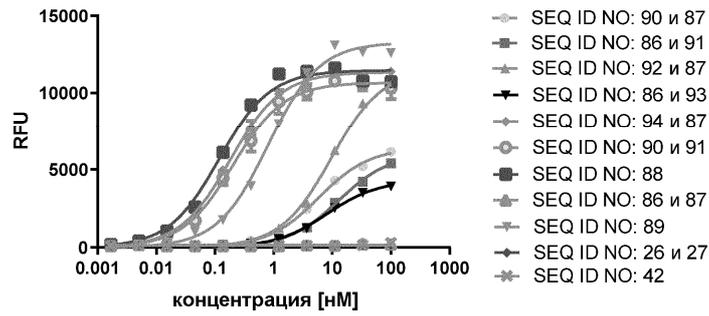


Фиг. 2

C. связывание с человеческим CD137

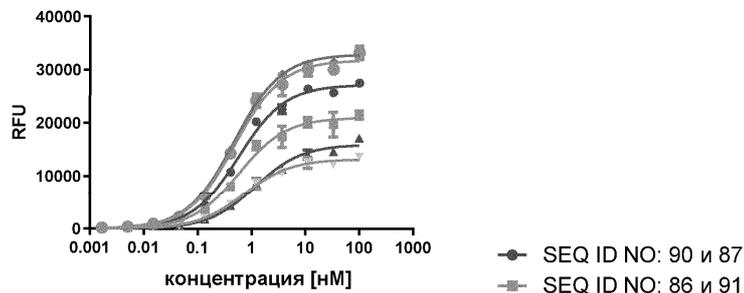


D. связывание с CD137 яванского макака

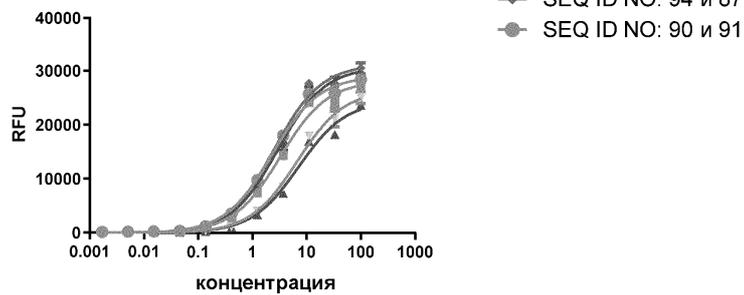


Фиг. 2 (продолжение)

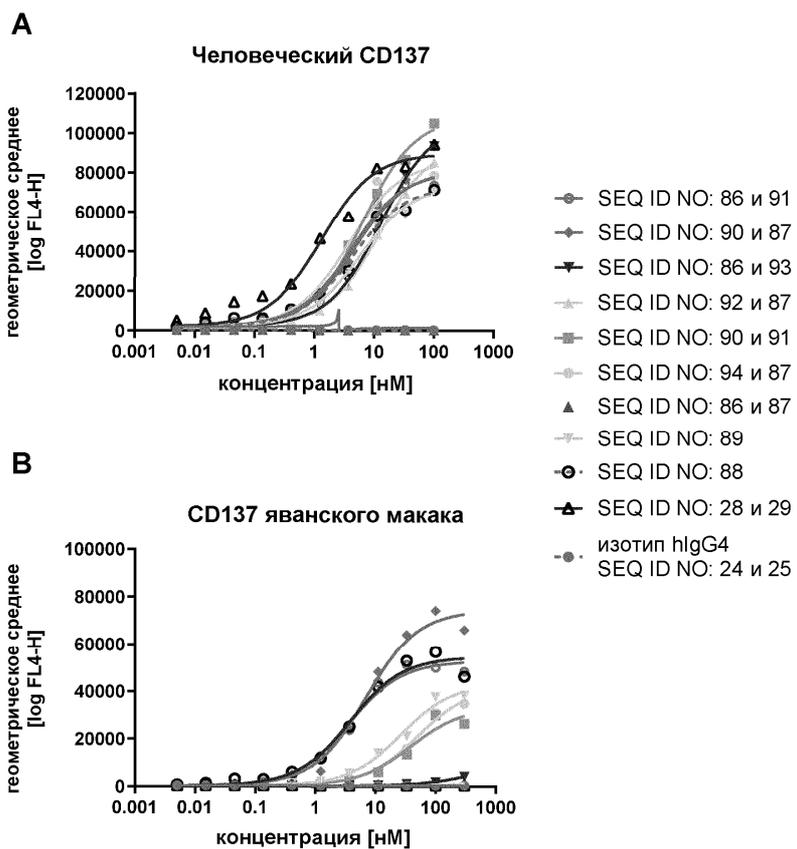
A. Захват PD-L1_детекция CD137



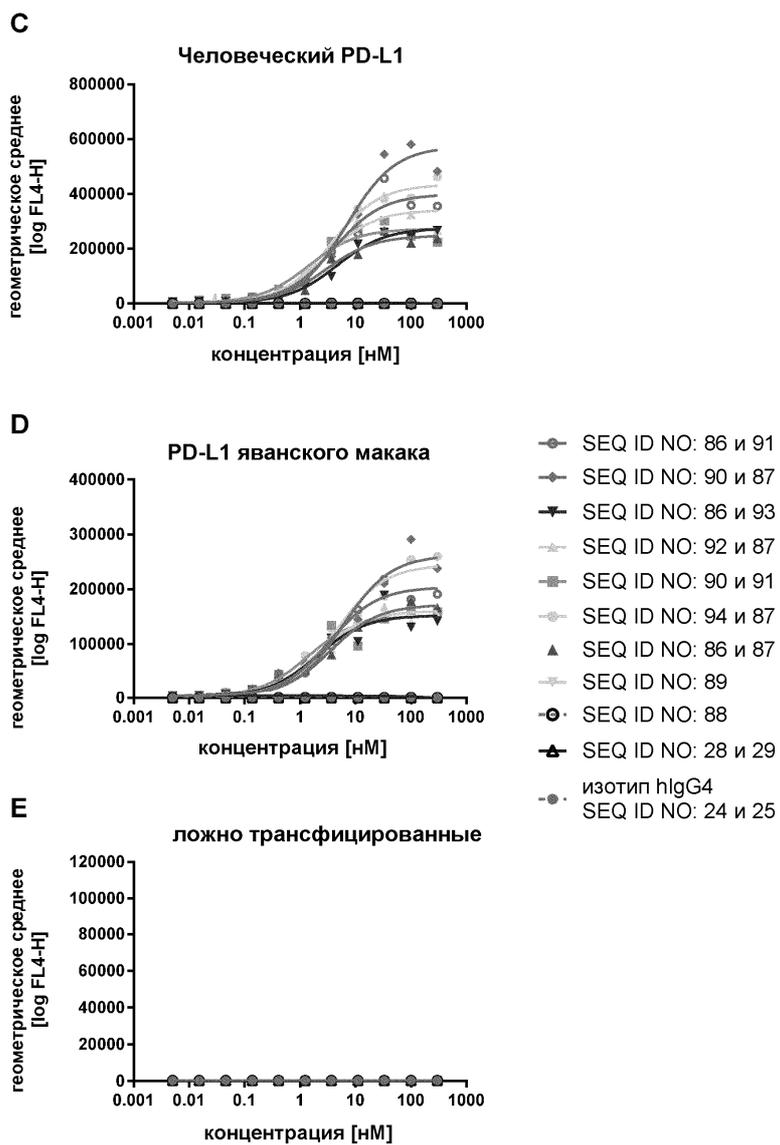
B. Захват CD137_детекция PD-L1



Фиг. 3

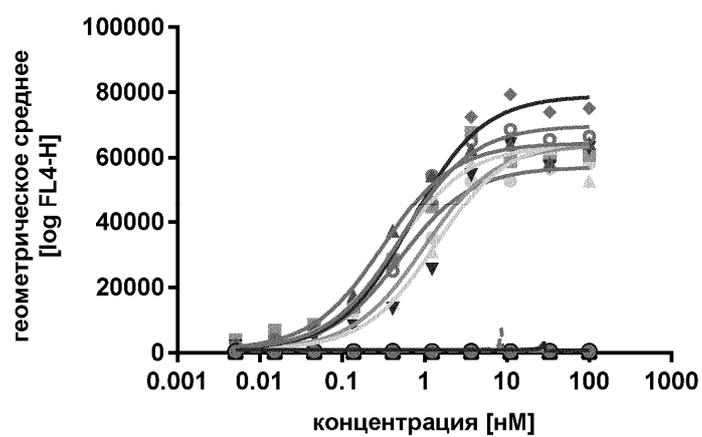


Фиг. 4



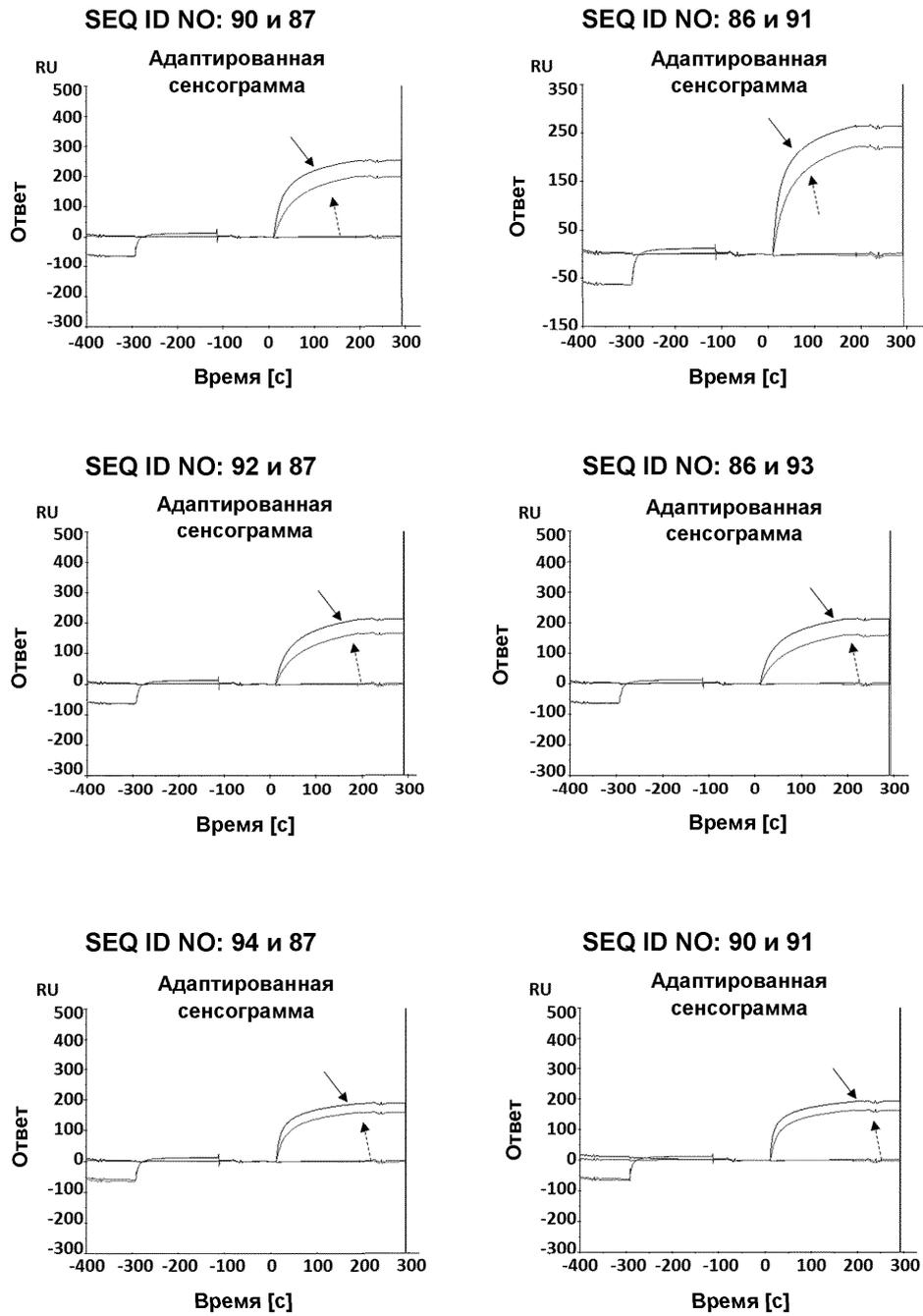
Фиг. 4 (продолжение)

RKO

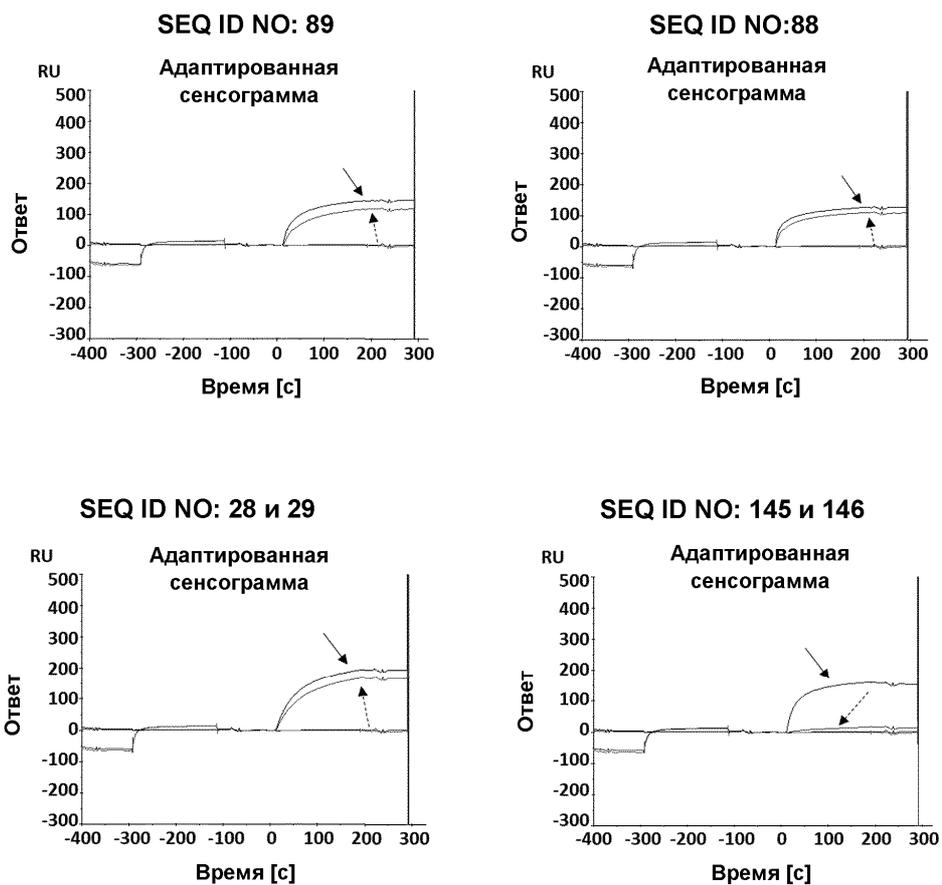


- SEQ ID NO: 86 и 91
- ◇ SEQ ID NO: 90 и 87
- ▼ SEQ ID NO: 86 и 93
- ▲ SEQ ID NO: 92 и 87
- SEQ ID NO: 90 и 91
- SEQ ID NO: 94 и 87
- ▲ SEQ ID NO: 86 и 87
- SEQ ID NO: 89
- SEQ ID NO: 88
- ▲ SEQ ID NO: 28 и 29
- изотип hlgG4
SEQ ID NO: 24 и 25

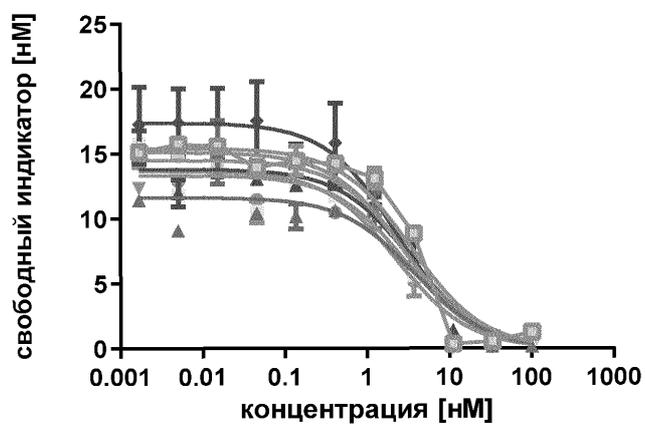
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 6 (продолжение)

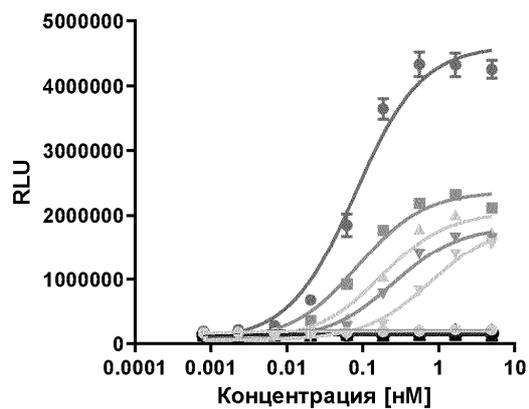


- SEQ ID NO: 90 и 87
- SEQ ID NO: 86 и 91
- ▲ SEQ ID NO: 92 и 87
- ▼ SEQ ID NO: 86 и 93
- ◆ SEQ ID NO: 94 и 87
- ◊ SEQ ID NO: 90 и 91
- ▲ SEQ ID NO: 26 и 27
- SEQ ID NO: 86 и 87

Фиг. 7

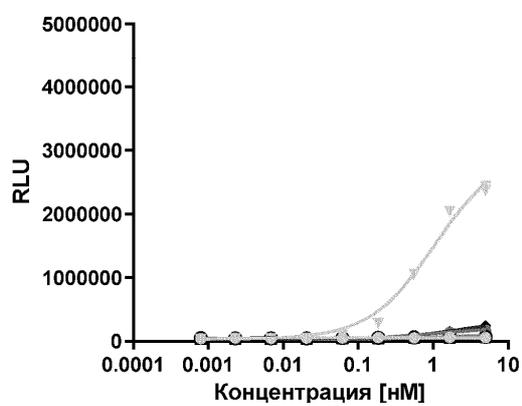
A

GloResponse с клетками RKO



B

GloResponse без клеток RKO

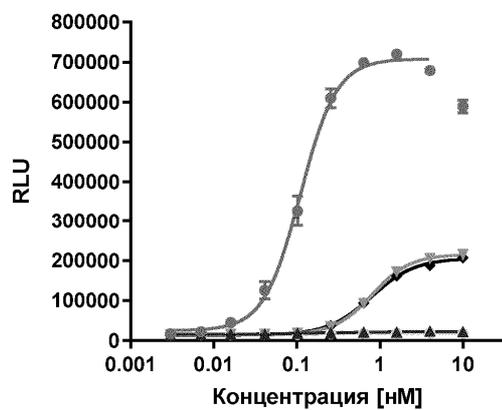


- △— SEQ ID NO: 92 и 87
- ▽— SEQ ID NO: 86 и 93
- SEQ ID NO: 86 и 91
- SEQ ID NO: 90 и 87
- ▲— SEQ ID NO: 86 и 87
- SEQ ID NO: 89
- ▲— SEQ ID NO: 86 и 87 + SEQ ID NO: 89
- △— SEQ ID NO: 28 и 29
- ◆— SEQ ID NO: 26 и 27
- изотип hlgG4 SEQ ID NO: 24 и 25

Фиг. 8

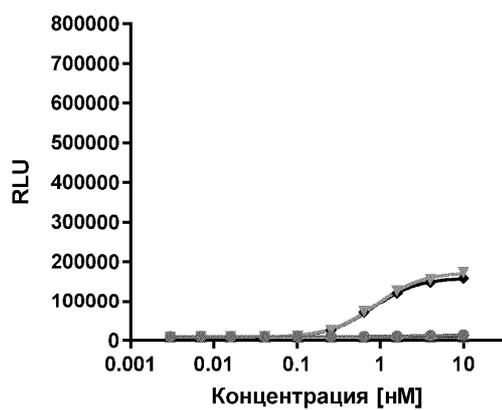
C

GloResponse с клетками RKO



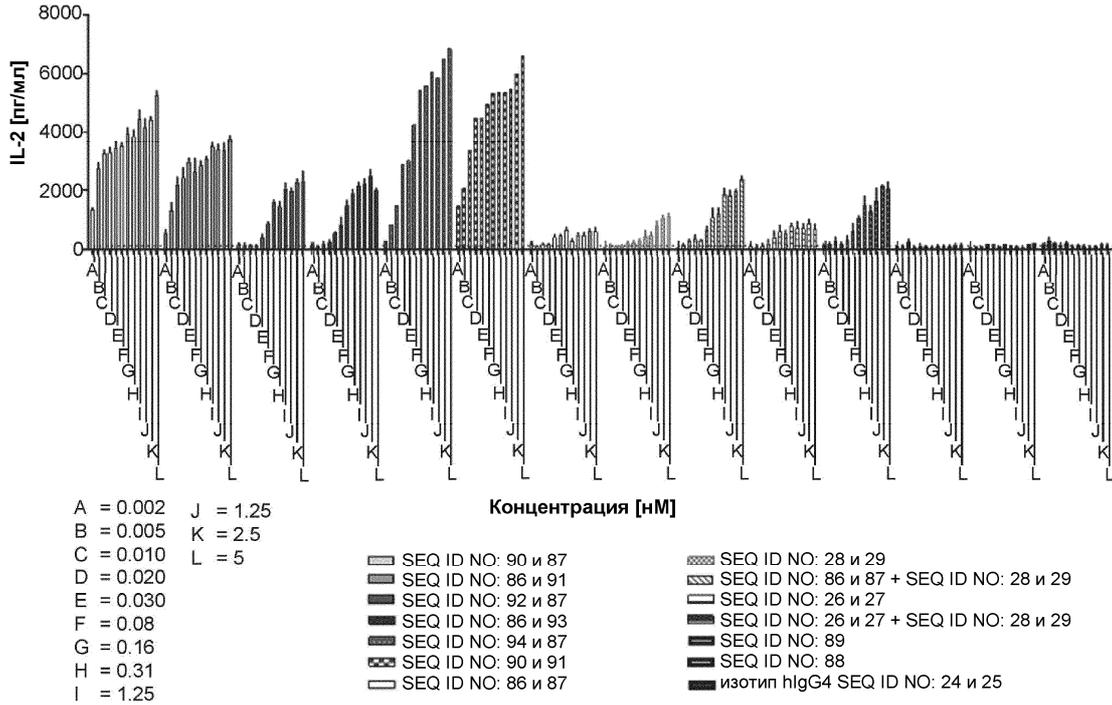
D

Без клеток RKO

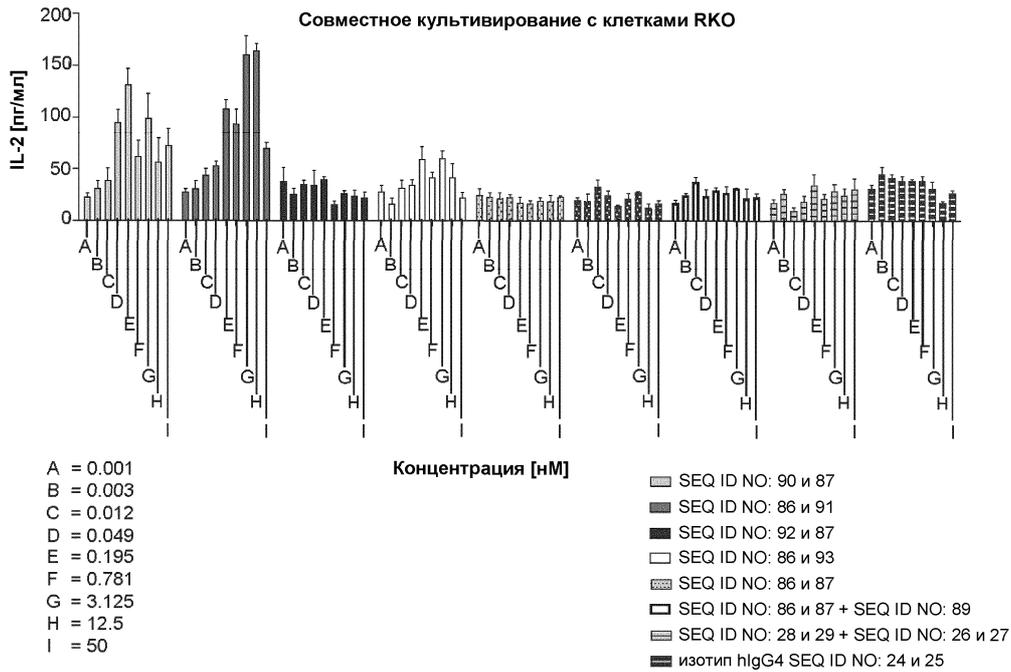


- SEQ ID NO: 90 и 87
- ▲ SEQ ID NO: 86 и 87
- SEQ ID NO: 28 и 29
- ◆ SEQ ID NO: 26 и 27 + SEQ ID NO: 28 и 29
- изотип hlgG4 SEQ ID NO: 24 и 25

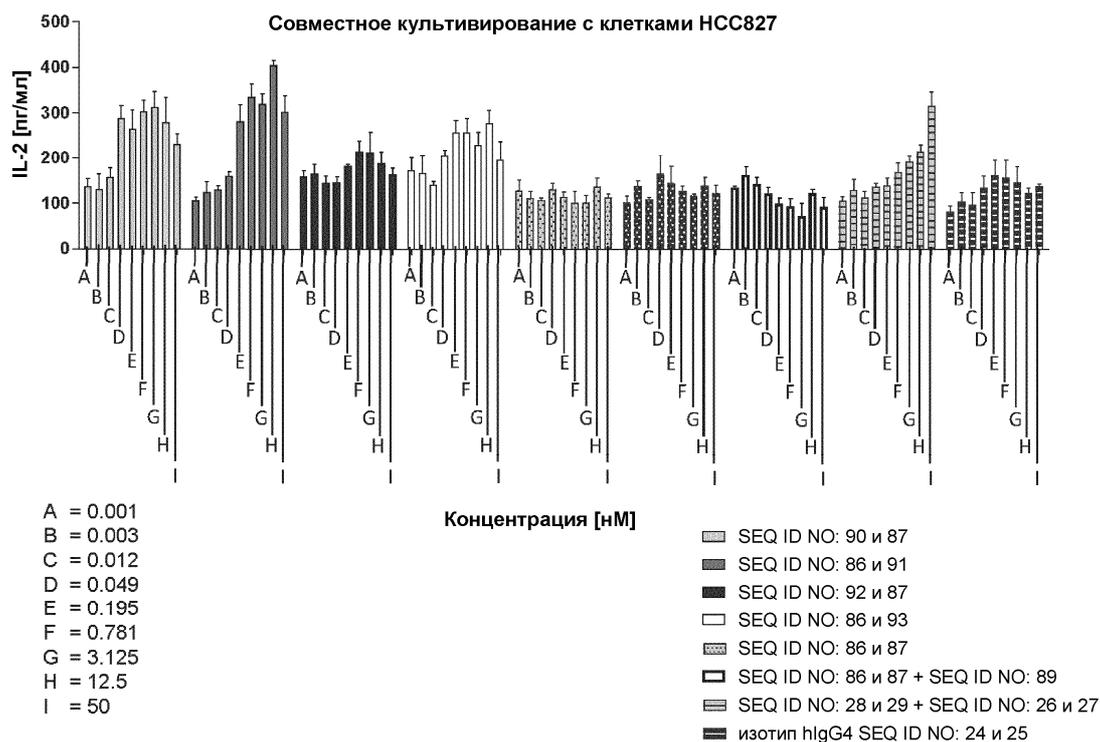
Фиг. 8 (продолжение)



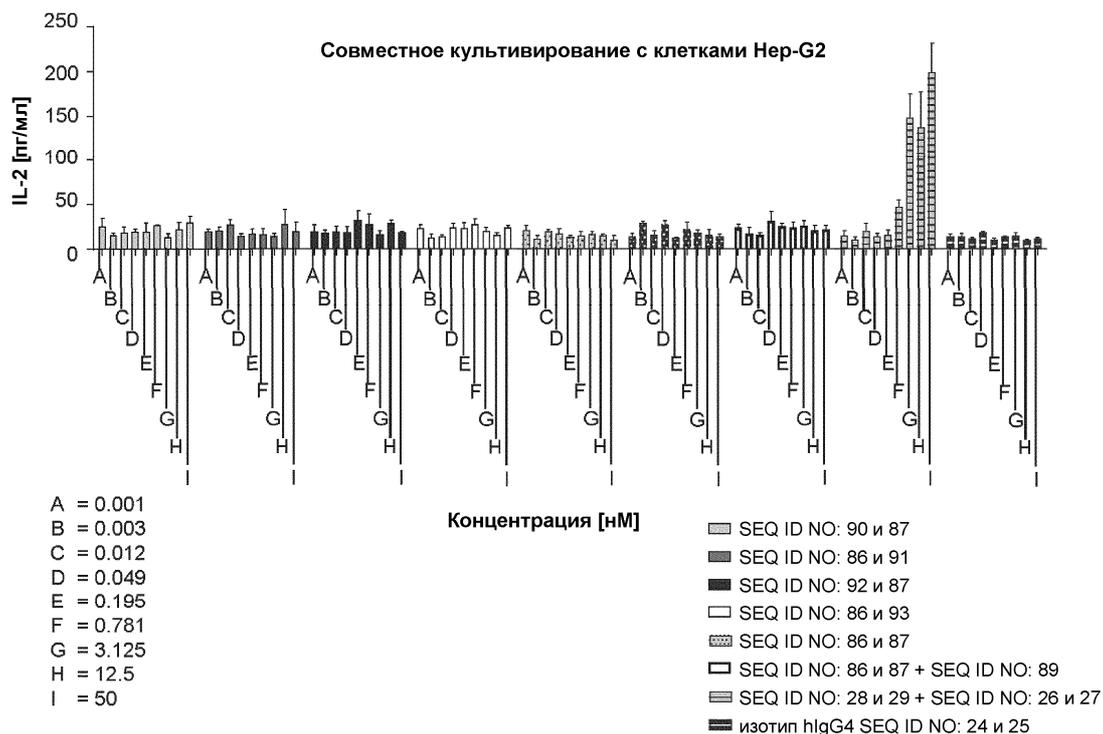
Фиг. 9



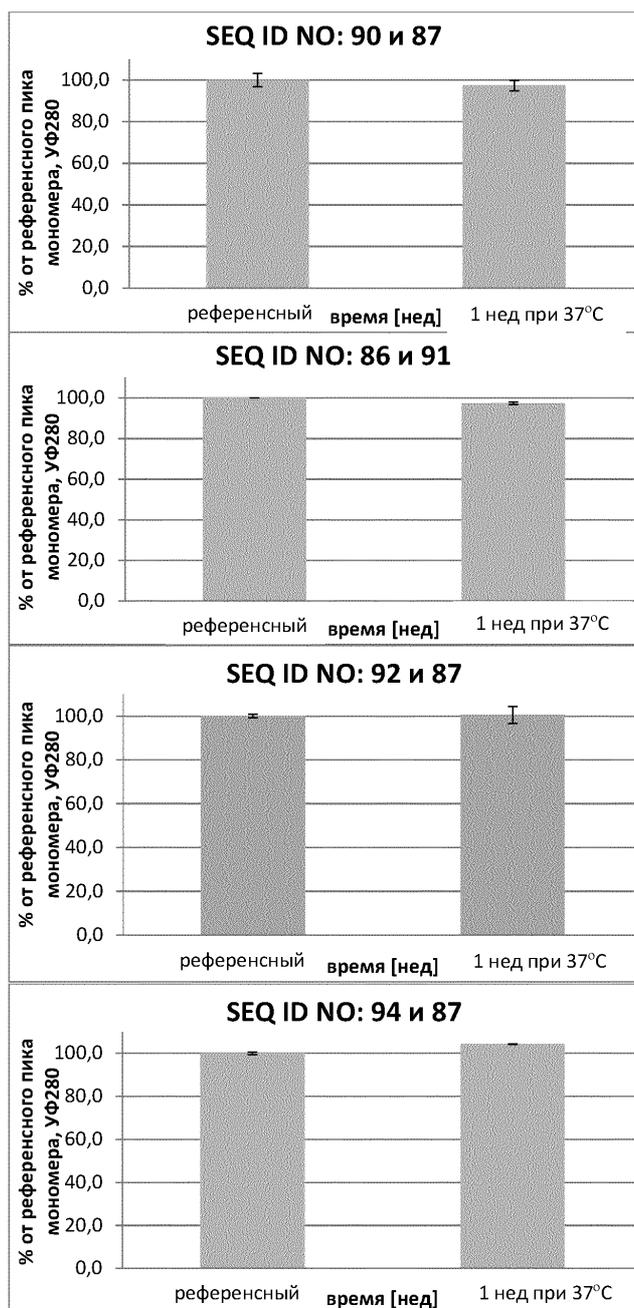
Фиг. 10



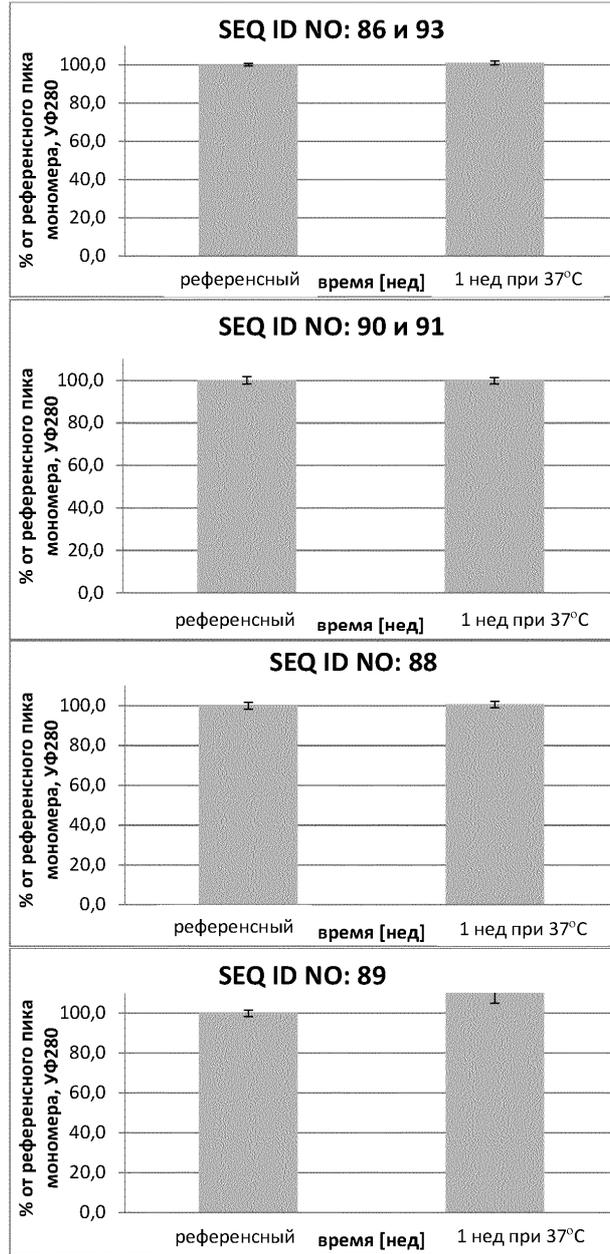
Фиг. 10 (продолжение)



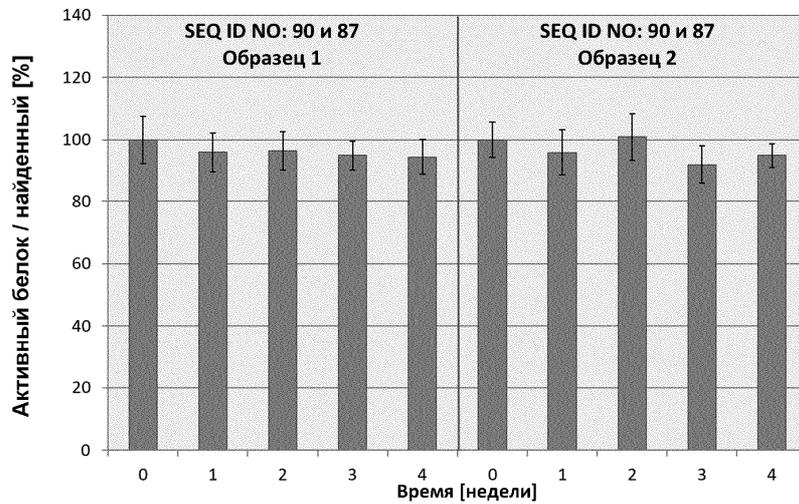
Фиг. 10 (продолжение)



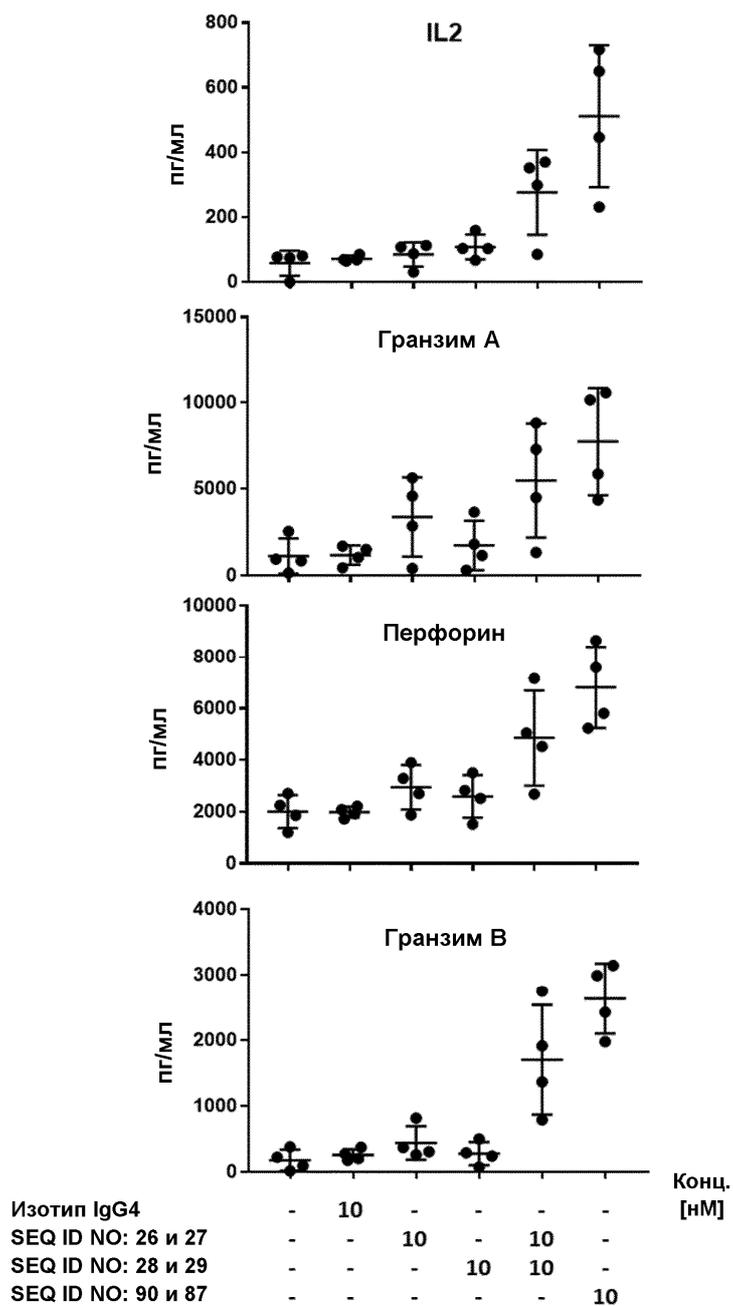
Фиг. 11А



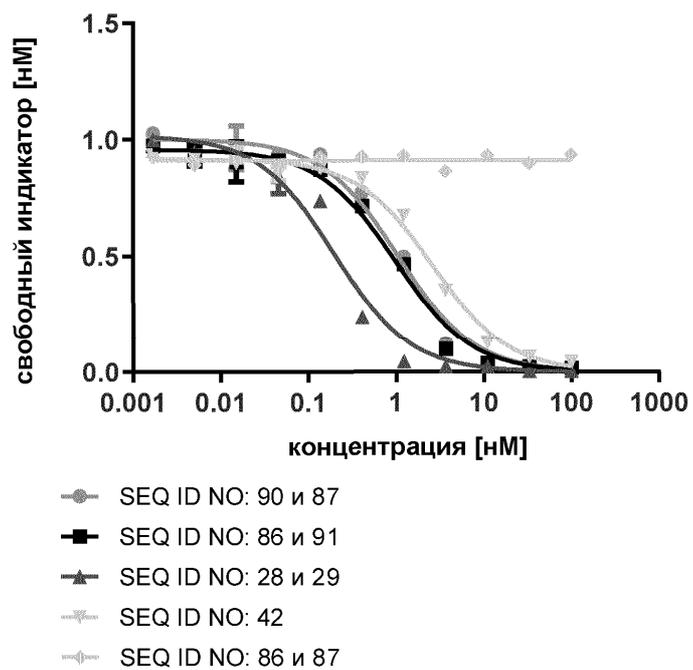
Фиг. 11А (продолжение)



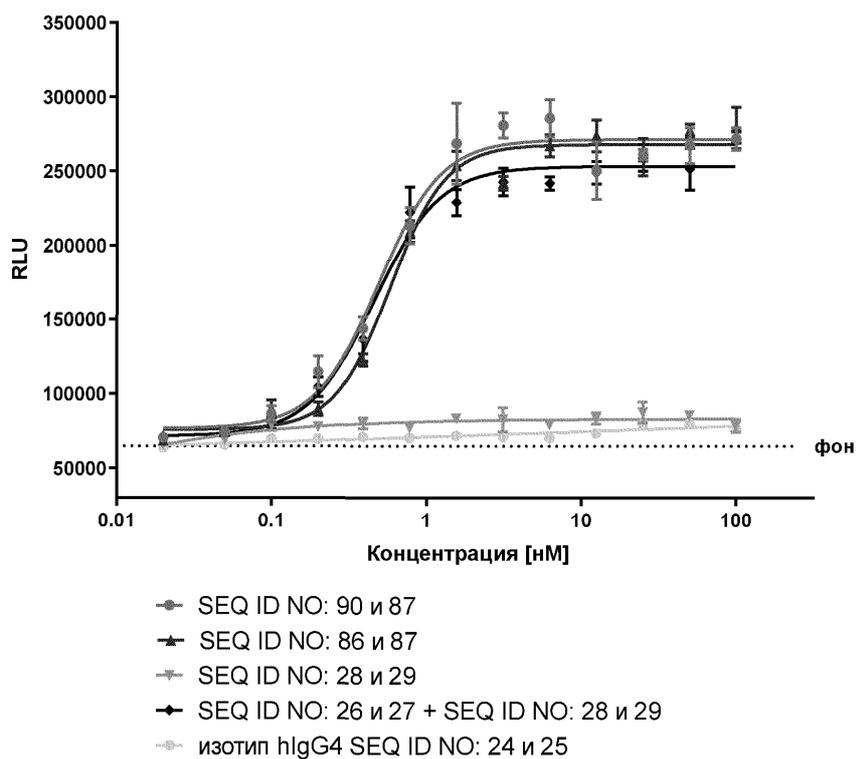
Фиг. 11В



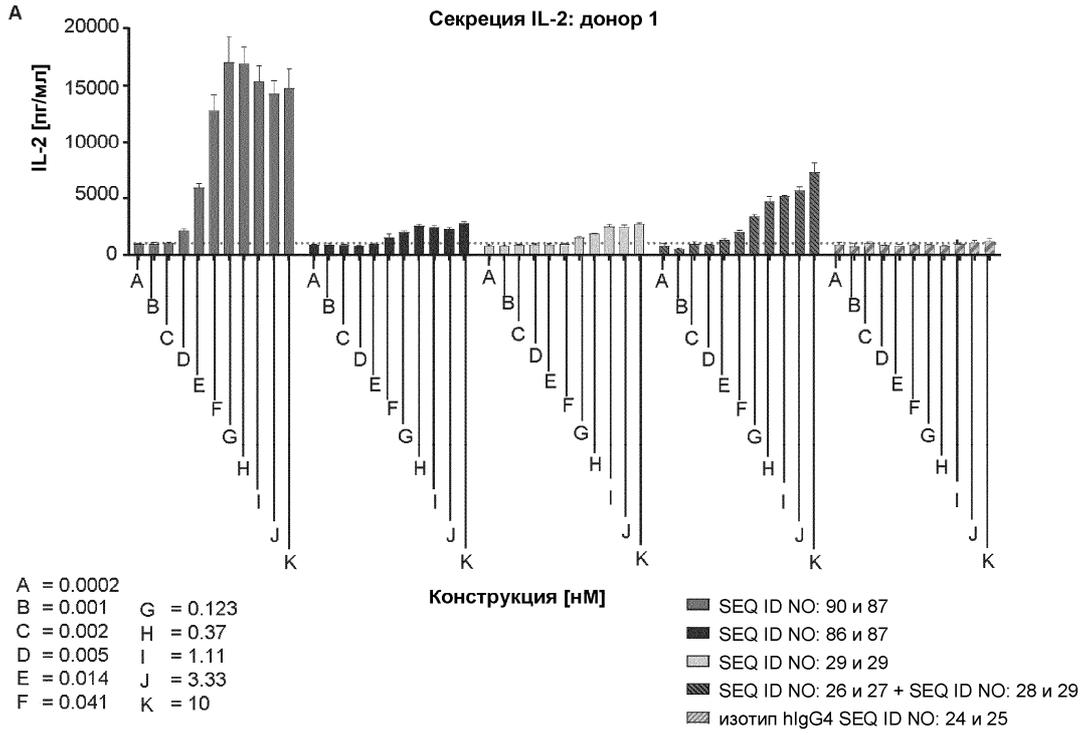
Фиг. 13



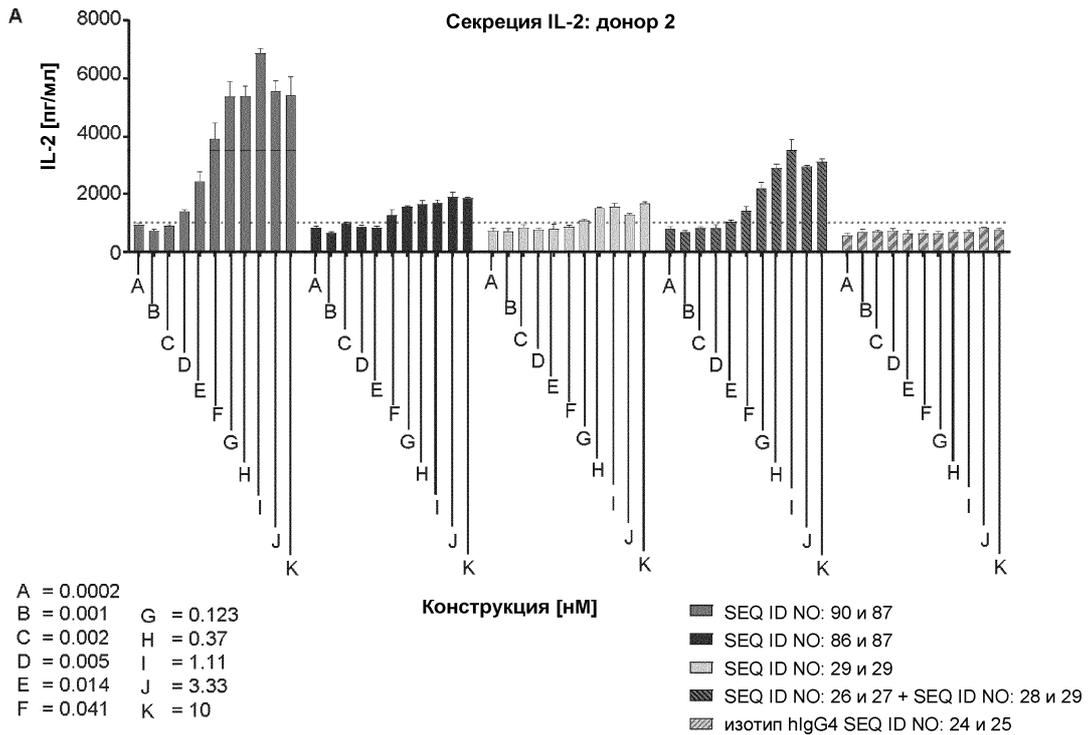
Фиг. 14



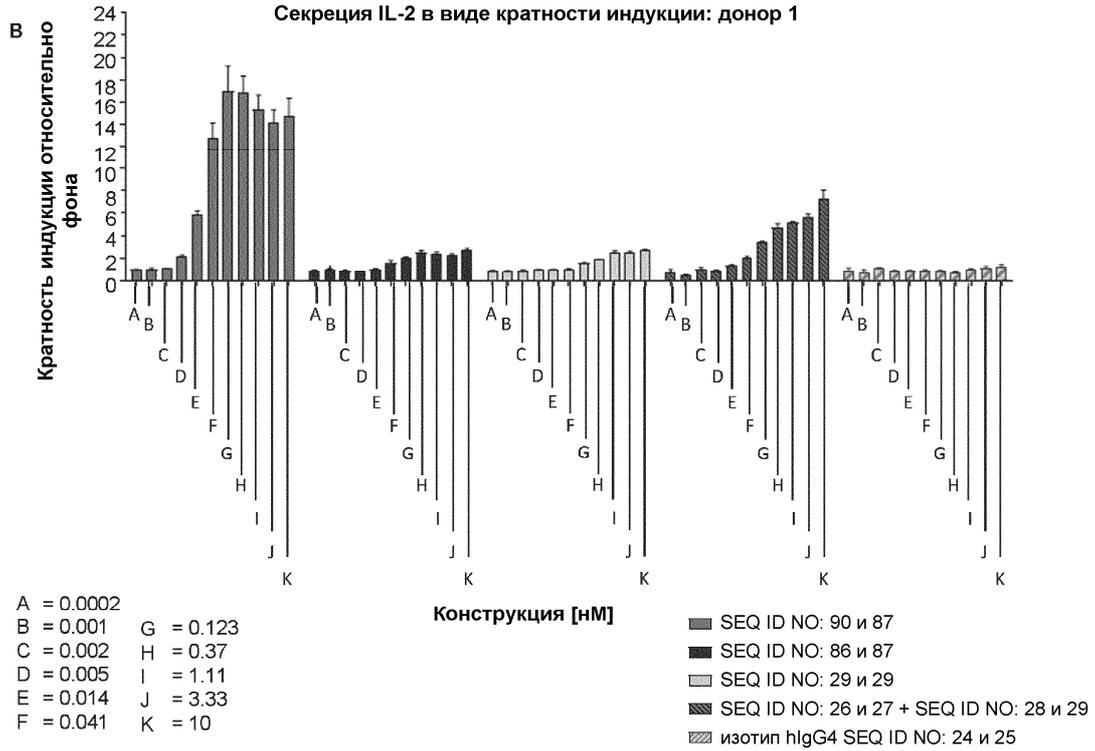
Фиг. 15



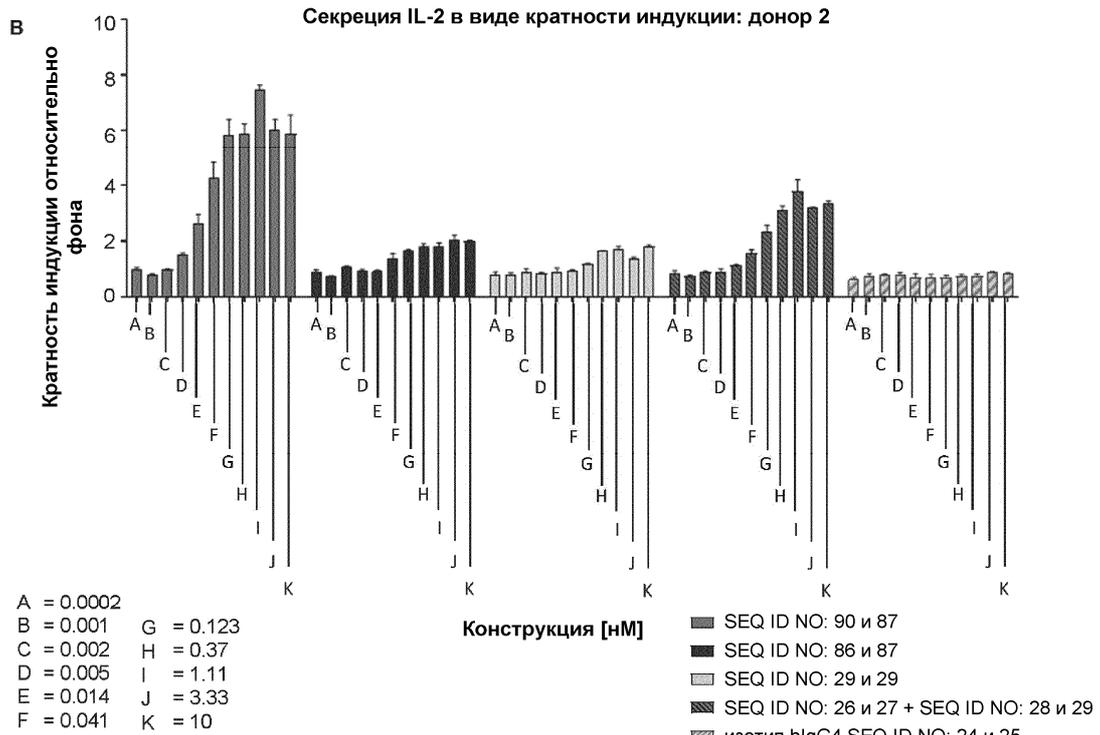
Фиг. 16



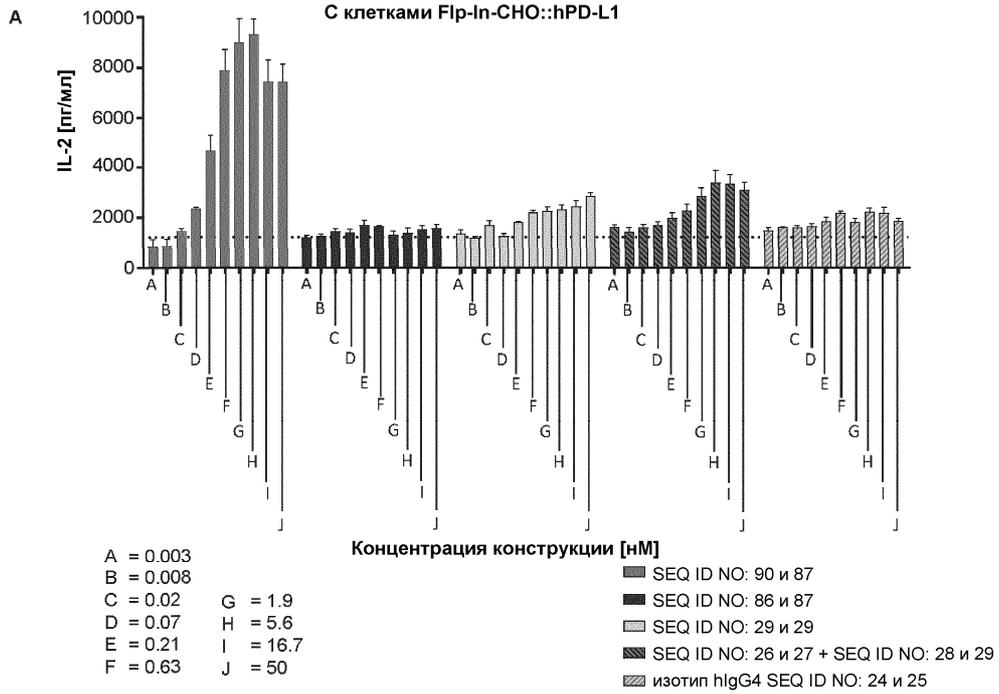
Фиг. 16 (продолжение)



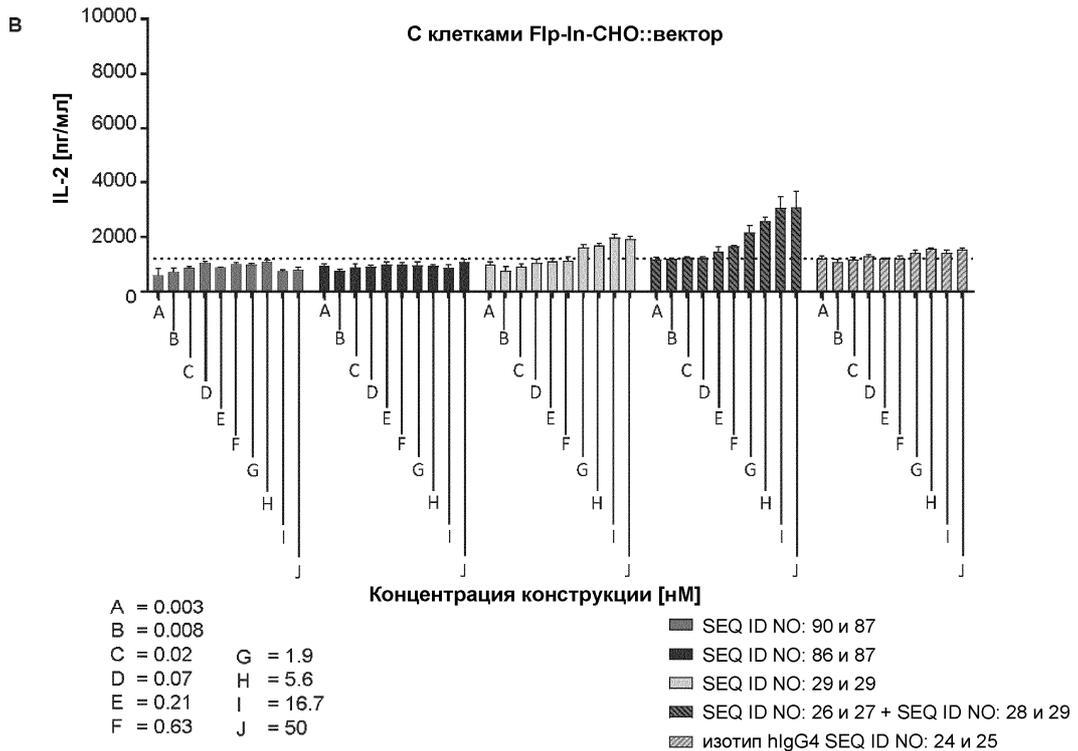
Фиг. 16 (продолжение)



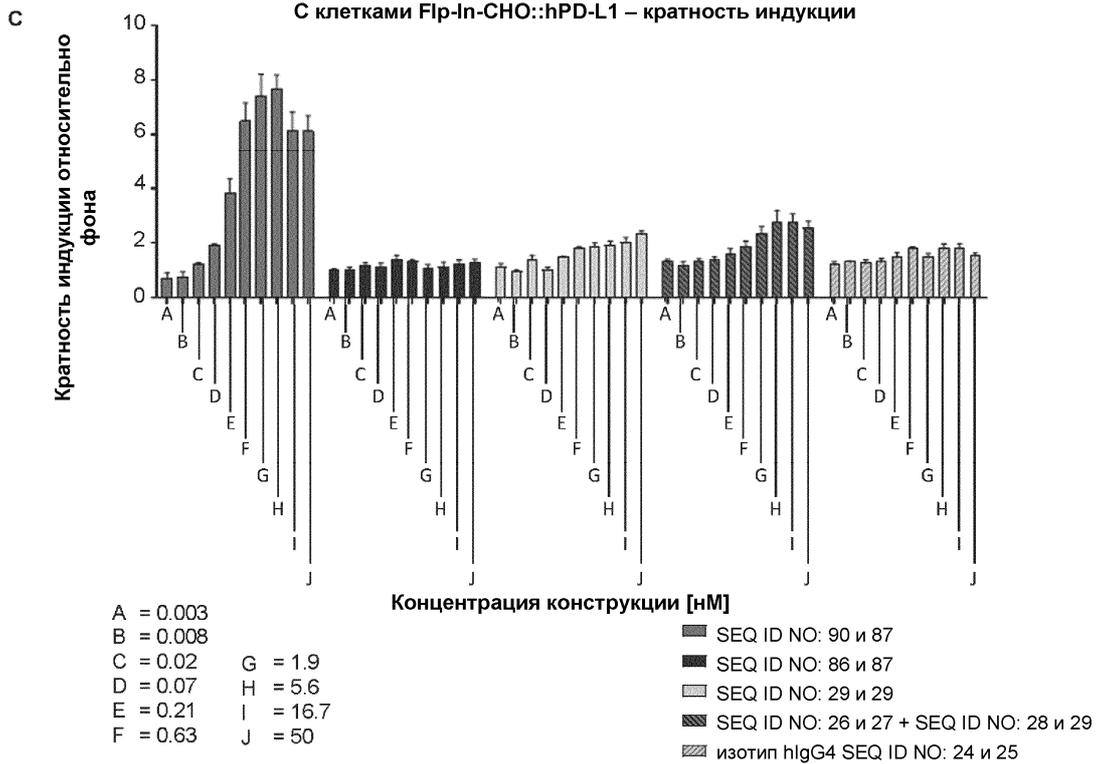
Фиг. 16 (продолжение)



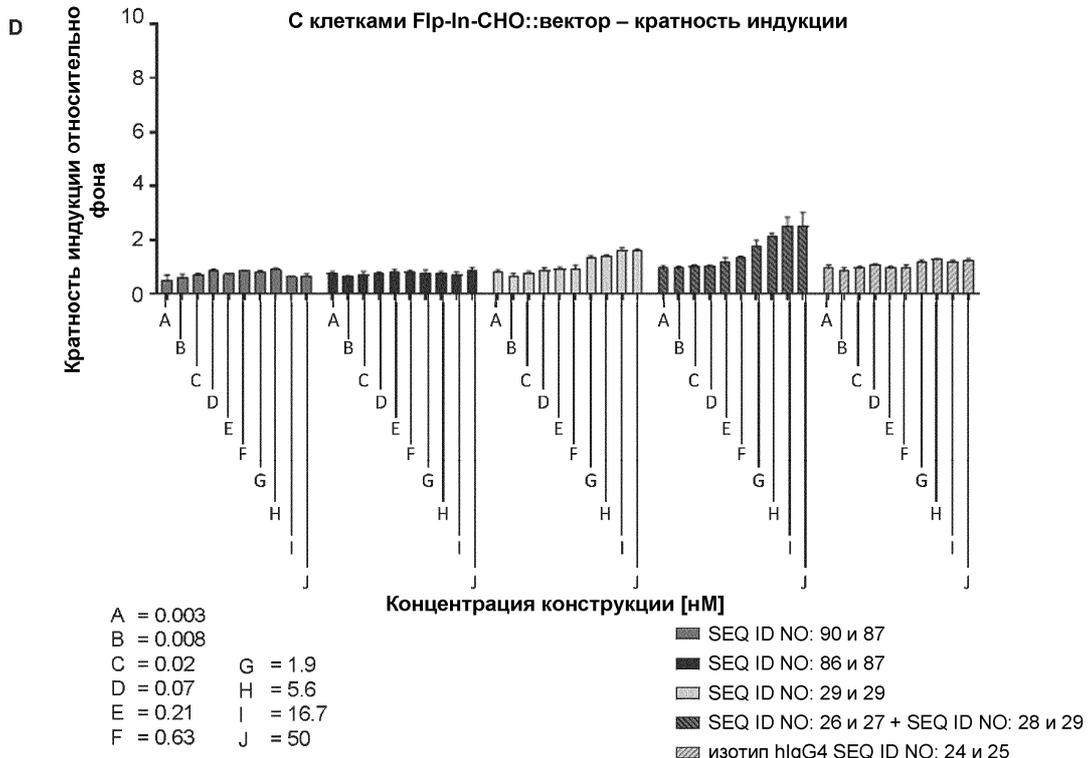
Фиг. 17



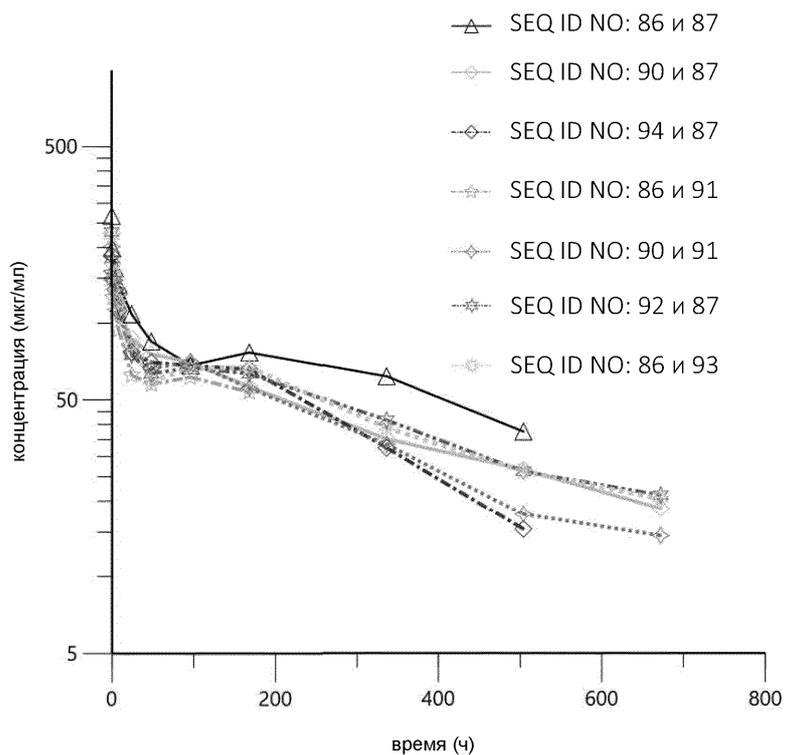
Фиг. 17 (продолжение)



Фиг. 17 (продолжение)

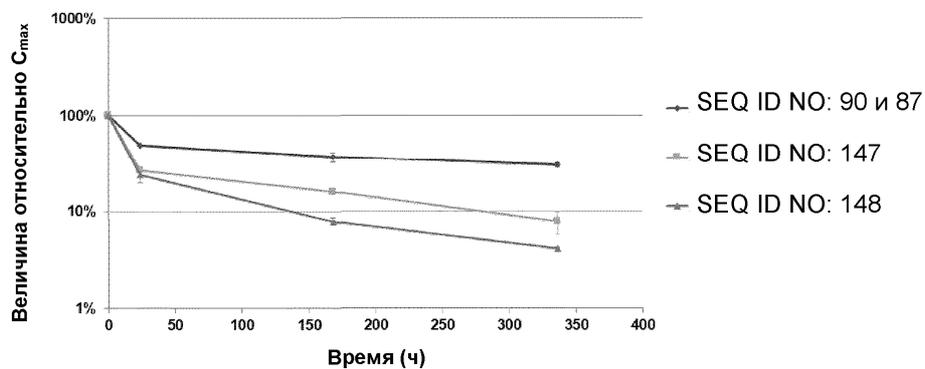


Фиг. 17 (продолжение)



Фиг. 18

Нормированная к C_{max}



Фиг. 19