

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046914**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.05.08

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(21) Номер заявки
202090257

(22) Дата подачи заявки
2018.07.11

(54) **АНТИТЕЛА-АГОНИСТЫ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ CD137 ЧЕЛОВЕКА, И
ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/531,259; 62/531,190; 62/568,231;
62/577,257; 62/577,259**

(32) **2017.07.11; 2017.07.11; 2017.10.04;
2017.10.26; 2017.10.26**

(33) **US**

(43) **2020.10.09**

(86) **PCT/US2018/041612**

(87) **WO 2019/014328 2019.01.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**КОМПАСС ТЕРАПЬЮТИКС
ЭЛЭЛСИ (US)**

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

**WO-A1-2012032433
WO-A1-2005035584**

(72) Изобретатель:
**Бобрович Пётр, Уидбум Пол, Шмидт
Майкл Марч, Ладжон Джейсон М.,
Тай Роберт В. III, Леунг Чеук Лун,
Эскиносак Угур (US)**

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

(57) Изобретение относится, в частности, к соединениям (например, антителам или их антигенсвязывающим фрагментам), которые связываются с эпитопом CD137 и выступают в качестве агонистов CD137, и к применению данных соединений в способах лечения или уменьшения тяжести одного или более симптомов рака.

B1

046914

046914

B1

Родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США с порядковым № 62/531259, поданной 11 июля 2017 г.; предварительной заявке на патент США с порядковым № 62/531190, поданной 11 июля 2017 г.; предварительной заявке на патент США с порядковым № 62/568231, поданной 4 октября 2017 г.; предварительной заявке на патент США с порядковым № 62/577257, поданной 26 октября 2017 г.; и предварительной заявке на патент США с порядковым № 62/577259, поданной 26 октября 2017 г. Полное содержание вышеупомянутых заявок включено в данный документ посредством данной ссылки.

Уровень техники

За последние годы появилось все больше доказательств, свидетельствующих о том, что иммунная система функционирует в качестве важнейшего барьера в отношении образования и прогрессирования опухолей. Принцип, согласно которому природные Т-клетки с противоопухолевой функцией или активностью продолжают существовать у пациентов с раком, сделал разработку иммунотерапевтических подходов в онкологии рациональной и обоснованной. Иммунные клетки, такие как Т-клетки, макрофаги и естественные клетки-киллеры, могут проявлять противоопухолевую активность и эффективно контролировать возникновение и рост злокачественных опухолей. Опухолеспецифические или опухолеассоциированные антигены могут стимулировать иммунные клетки к распознаванию и устранению злокачественных новообразований (Chen & Mellman, (2013) *Immunity* 39(1):1-10). Несмотря на существование опухолеспецифических иммунных ответов, злокачественные опухоли часто ускользают от иммунной атаки или избегают ее посредством различных иммуномодулирующих механизмов, что приводит к неспособности контролировать возникновение и прогрессирование опухоли (Motz & Coukos, (2013) *Immunity* 39(1):61-730). И действительно, новым отличительным признаком рака является задействование этих иммуномодулирующих механизмов и нарушение противоопухолевых иммунных ответов, что приводит к ускользанию опухоли и спасению от иммунологического надзора и уничтожения (Hanahan and Weinberg (2011) *Cell* 144(5):646-674).

Новые подходы в иммунотерапии рака включают противодействие этим механизмам ускользания и спасения от иммунного ответа и стимуляцию эндогенной иммунной системы к отторжению опухолей. CD137 (альтернативно известный как "представитель 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли" (TNFRSF9), 4-1BB и "индуцированный активацией лимфоцитов" (ILA)) представляет собой трансмембранный костимулирующий рецепторный белок, принадлежащий к суперсемейству факторов некроза опухоли. CD137 представляет собой костимулирующий рецептор Т-клеток, индуцируемым при активации TCR (Nam et al., (2005) *Curr Cancer Drug Targets* 5:357-363; Watts et al., (2005) *Annu Rev Immunol* 23:23-68). В дополнение к его экспрессии на активированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках, CD137 также экспрессируется на CD4⁺CD25⁺ регуляторных Т-клетках, активированных естественных киллерах (NK) и NK-Т-клетках, моноцитах, нейтрофилах и дендритных клетках.

В физиологических условиях CD137 связывается лигандом CD137 (CD137L), мембранной молекулой-агонистом, присутствующей на антигенпрезентирующих клетках, в том числе на В-клетках, моноцитах, макрофагах и дендритных клетках (Watts et al., (2005) *Annu Rev Immunol* 23:23-68). При взаимодействии со своим лигандом CD137 приводит к увеличению TCR-индуцированной пролиферации Т-клеток, продуцированию цитокинов, функциональному созреванию и удлинению выживаемости CD8⁺ Т-клеток. Потенциал костимуляции CD137 с использованием различных агонистов (например, антител-агонистов, рекомбинантного белка CD137L и CD137-специфических аптамеров) в обеспечении способности иммунной системы атаковать опухоли был задокументирован на многочисленных моделях (Dharmadhikari et al., (2016) *Oncoimmunology* 5(4):e1113367 и ссылки в ней). Недавний отчет о клинической оценке антитела-агониста к CD137 (урелумаб, BMS-663513; Bristol-Myers Squibb) задокументировал наблюдение связанных с лечением нежелательных явлений у субъектов-людей, включая признаки тяжелой гепатотоксичности (повышение активности трансаминаз), коррелирующей с дозой антитела (Segal et al., (2016) *Clin Cancer Res* 23(8): 1929-1936). Напротив, другое антитело-агонист к CD137 (утомилумаб, PF-05082566; Pfizer), протестированное в комбинации с антителом к PD-1 (пембролизумаб), хотя и не приводящее к какой-либо дозозимитирующей токсичности, показало сравнимые результаты с терапией только антителом к PD-1 (Tolcher, A. et al., (2017) *Clin Cancer Res* 23(18): 5349-5357). Эти результаты подчеркивают, что для пациентов с различными заболеваниями и состояниями, в том числе с раком, которые поддаются лечению агонистом CD137, по-прежнему существует неудовлетворенная потребность в новых антителах-агонистах, которые связываются с CD137 человека и проявляют характеристики, достаточные для разработки безопасного и эффективного терапевтического средства.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на открытии новых антител-агонистов к CD137, проявляющих защитный противоопухолевый иммунитет у животных. Примечательно то, что антитела, описанные в данном документе, эффективны против различных типов опухолей и в широком диапазоне доз. Кроме того, в демонстрационных примерах проиллюстрировано, что антитела, описанные в данном документе, являются терапевтически эффективными против очень крупных опухолей. Например, лечение мышей с опухолями при помощи антител-агонистов к CD137, описанных в дан-

ном документе, привело к полной регрессии опухолей размером до 1800 мм³. На фиг. 15 показано, что лечение таких мышей также индуцировало защитный иммунитет. И при этом наблюдаемой эффективности сопутствовали положительные иммунофенотипические изменения в микроокружении опухоли, такие как повышенная инфильтрация иммунными клетками с одновременным снижением популяций регуляторных Т-клеток и истощенных Т-клеток (см., например, фиг. 22А-22D).

Как описано выше, агонизм CD137 ассоциировался с определенными нежелательными явлениями, включая случаи летального исхода у людей, связанные с гепатотоксичностью (см., например, Segal et al. (2017) Clin Cancer Res 23(8): 1929-1935). Подобные токсические эффекты, возникающие в результате лечения антителами-агонистами к CD137 (такими как антитело 3Н3), также наблюдались на животных моделях (см., например, Bartkowiak et al. (2018) Clin Cancer Res 24(5):1138-1151). Тем не менее, антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, оказывают минимальное воздействие на печень, что определяется, например, по уровням ферментов печени в плазме крови (например, аланинаминотрансферазы (ALT)) и инфильтрации иммунными клетками. Например, не было выявлено увеличение внутрипеченочной или внутриселезеночной инфильтрации иммунными клетками у мышей, обрабатываемых этими антителами. Таким образом, антитела, описанные в данном документе, не только высокоэффективны, но и также являются щадящими в плане определенных токсических эффектов, ассоциированных с агонизмом CD137.

Хотя настоящее изобретение не связано какой-либо конкретной теорией или механизмом действия, считается, что превосходные терапевтические и щадящие в плане токсичности свойства антител, описанных в данном документе, частично обусловлены одним из их аффинности и нового эпитопа, с которым они связываются, или как первым, так и вторым. То есть антитела, описанные в данном документе, имеют общий новый эпитоп, отличный от эпитопа других антител-агонистов к CD137. И, как показано в демонстрационных примерах, связывание этого эпитопа антителами, описанными в данном документе, дает дифференцированную активность *in vitro*, такую как влияние на пролиферацию регуляторных Т-клеток, продуцирование цитокинов CD8⁺ Т-клетками и макрофагами и внутриклеточную передачу сигналов, по сравнению с антителами-агонистами, которые связываются с другими эпитопами CD137. Кроме того, было продемонстрировано, что диапазон аффинности ("активная точка") антител является особенно оптимальным для противоопухолевой активности. Например, было показано, что антитела с промежуточной аффинностью более эффективны против крупных опухолей по сравнению с антителами с более высокой или более низкой аффинностью.

Ввиду вышеизложенного в некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей от приблизительно 40 нМ до приблизительно 100 нМ. В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 110 нМ). В некоторых аспектах аффинность антитела к CD137 с CD137 человека в по меньшей мере два раза (например, в по меньшей мере три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или 10 раз) превышает аффинность mAb10 с CD137 мыши. В некоторых аспектах аффинность антитела к CD137 составляет не более 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 250, 200, 175, 150, 125, 110 или 100 нМ. В некоторых аспектах аффинность антитела к CD137 с CD137 человека в по меньшей мере два раза (например, в по меньшей мере три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или 10 раз) превышает аффинность mAb10 с CD137 мыши, но составляет не более 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 250, 200, 175, 150, 125, 110 или 100 нМ.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или антигенсвязывающая часть связываются с эпитопом на CD137 человека, содержащим одну или более (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или все 25) аминокислот 111-132 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или антигенсвязывающая часть связываются с эпитопом в пределах аминокислот 111-132 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или антигенсвязывающая часть связываются со всеми аминокислотами 111-132 или их частью из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах эпитоп содержит K114 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах эпитоп содержит остатки E111, T113 и K114 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах эпитоп содержит остатки E111, T113, K114, N126 и I132 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах эпитоп содержит остатки E111, T113, K114 и P135 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах эпитоп содержит остатки E111, T113, K114, N126, I132 и P135 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающая часть связываются с CD137 человека с аффинностью, составляющей от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ (например, от прибли-

зительно 30 нМ до приблизительно 110 нМ).

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 40-100 нМ (например, от приблизительно 40 нМ до приблизительно 100 нМ), и связываются с эпитопом на CD137 человека, содержащим K114 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), и связываются с эпитопом на CD137 человека, содержащим K114 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах эпитоп содержит остатки E111, T113 и K114 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах эпитоп содержит остатки E111, T113, K114, N126 и I132 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах эпитоп содержит остатки E111, T113, K114 и P135 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах эпитоп содержит остатки E111, T113, K114, N126, I132 и P135 из SEQ ID NO: 3.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ) и связываются с эпитопом на CD137 человека, содержащим последовательность из одного или более аминокислотных остатков, соответствующих положениям аминокислот 111-135 в SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах эпитоп содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислотных остатков, соответствующих положениям аминокислот 111-135 в SEQ ID NO: 3.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ) и связываются с эпитопом на CD137 человека, расположенным в пределах аминокислотных остатков 111-135 в SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах эпитоп содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот. В некоторых аспектах эпитоп содержит менее 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислот.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ) и связываются с эпитопом на CD137 человека, содержащим ELTK (соответствуют аминокислотным остаткам 111-114 в SEQ ID NO: 3). В некоторых аспектах эпитоп дополнительно содержит один или более из остатков N126, I132 и P135 из SEQ ID NO: 3.

В любом из вышеупомянутых аспектов эпитоп является нелинейным эпитопом. В любом из вышеупомянутых аспектов мутация остатка K114 из SEQ ID NO: 3 устраняет связывание антитела или его антигенсвязывающей части с CD137 человека.

В любом из вышеупомянутых аспектов антитело или антигенсвязывающая часть, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ, 30-95 нМ, 45-95 нМ, 50-90 нМ, 55-85 нМ, 60-80 нМ, 65-75 нМ, 55-75 нМ, 40-70 нМ, 50-80 нМ или 60-90 нМ. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающая часть связываются с участком, отличным от лигандсвязывающего участка, внеклеточного домена CD137 человека. В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающая часть не подавляют взаимодействие между CD137 и CD137L. В некоторых аспектах участком, отличным от лигандсвязывающего участка, охватывает богатый цистеином домен (CRD) III и CRD IV. В любом из вышеупомянутых аспектов антитело или антигенсвязывающая часть не ингибируют образование тримера из мономеров CD137:CD137L.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или антигенсвязывающая часть:

- (i) связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ);
- (ii) связываются с участком, отличным от лигандсвязывающего участка, внеклеточного домена CD137 человека, и
- (iii) связываются с эпитопом на CD137 человека, содержащим K114 из SEQ ID NO: 3.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или антигенсвязывающая часть:

- (i) связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (на-

пример, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ);

- (ii) не подавляют взаимодействие между CD137 человека и лигандом CD137 человека, и
- (iii) связываются с эпитопом на CD137 человека, содержащим K114 из SEQ ID NO: 3.

В некоторых аспектах настоящего изобретения включены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или антигенсвязывающая часть: (i) связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), и (ii) не подавляет образование тримера из мономеров CD137:CD137L (то есть комплекса тример:тример CD137:CD137L). В некоторых аспектах настоящего изобретения включены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или антигенсвязывающая часть: (i) связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), и (ii) связывается с участком, отличным от лигандсвязывающего участка, внеклеточного домена CD137 человека. В некоторых аспектах настоящего изобретения включены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или антигенсвязывающая часть: (i) связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), и (ii) не подавляет взаимодействие между CD137 и лигандом CD137 человека.

В любом из вышеупомянутых аспектов антитело или антигенсвязывающая часть содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DXXXXLXXXXYXYX (SEQ ID NO: 126), где X представляет собой любую аминокислоту. В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающая часть содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DXPFXLDDYXYXYX (SEQ ID NO: 127), где X представляет собой любую аминокислоту. В любом из вышеупомянутых аспектов мутация с заменой на аланин остатков D95, L100, Y100E, Y100G, Y100H или их комбинаций в CDR3 тяжелой цепи приводит к потере связывания с CD137 человека. В любом из вышеупомянутых аспектов мутация с заменой на аланин остатков P97, F98, D100A, Y100D, Y100F или их комбинаций приводит к снижению связывания с CD137 человека. В любом из вышеупомянутых аспектов антитело или антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, где CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 68.

В других аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где

(i) антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), и

(ii) антитело или антигенсвязывающая часть содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DXXXXLXXXXYXYX (SEQ ID NO: 126), где X представляет собой любую аминокислоту. В некоторых аспектах X представляет собой любую аминокислоту за исключением аланина.

В другом аспекте настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где

(i) антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), и

(ii) антитело или антигенсвязывающая часть содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность $DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$ (SEQ ID NO: 128), где X_1 представляет собой любую аминокислоту, где X_2 представляет собой неполярную аминокислоту, где X_3 представляет собой неполярную аминокислоту, где X_4 представляет собой любую аминокислоту, где X_5 представляет собой полярную аминокислоту, где X_6 представляет собой любую аминокислоту, где X_7 представляет собой любую аминокислоту, где X_8 представляет собой полярную аминокислоту, где X_9 представляет собой полярную аминокислоту, и где X_{10} представляет собой любую аминокислоту. В некоторых аспектах X_2 представляет собой пролин, X_3 представляет собой фенилаланин или триптофан, X_5 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту, X_8 представляет собой тирозин, и X_9 представляет собой тирозин.

В других аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где

(i) антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), и

(ii) антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связываются с эпитопом на CD137 человека, содержащим один или более из остатков E111, T113, K114, N126, I132 и P135 из SEQ ID NO: 3.

В других аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где

(i) антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ);

(ii) антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связываются с эпитопом на CD137 человека, содержащим один или более из остатков E111, T113, K114, N126, I132 и P135 из SEQ ID NO: 3;

(iii) антитело или антигенсвязывающая часть содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DXXXXLXXXXYXYX (SEQ ID NO: 126), где X представляет собой любую аминокислоту; или

(iv) их комбинации. В некоторых аспектах X представляет собой любую аминокислоту за исключением аланина.

В других аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где

(i) антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ);

(ii) антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связываются с эпитопом на CD137 человека, содержащим один или более из остатков E111, T113, K114, N126, I132 и P135 из SEQ ID NO: 3;

(iii) антитело или антигенсвязывающая часть содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DX₁X₂X₃X₄LX₅X₆X₇X₈YX₉YXYX₁₀ (SEQ ID NO: 128), где X₁ представляет собой любую аминокислоту, где X₂ представляет собой неполярную аминокислоту, где X₃ представляет собой неполярную аминокислоту, где X₄ представляет собой любую аминокислоту, где X₅ представляет собой полярную аминокислоту, где X₆ представляет собой любую аминокислоту, где X₇ представляет собой любую аминокислоту, где X₈ представляет собой полярную аминокислоту, где X₉ представляет собой полярную аминокислоту, и где X₁₀ представляет собой любую аминокислоту; или

(iv) их комбинации. В некоторых аспектах X₂ представляет собой пролин, X₃ представляет собой фенилаланин или триптофан, X₅ представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту, X₈ представляет собой тирозин, и X₉ представляет собой тирозин.

В других аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где

(i) антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ);

(ii) антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связываются с эпитопом на CD137 человека, содержащим один или более из остатков E111, T113, K114, N126, I132 и P135 из SEQ ID NO: 3; и

(iii) антитело или антигенсвязывающая часть содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DXXXXLXXXXYXYX (SEQ ID NO: 126), где X представляет собой любую аминокислоту. В некоторых аспектах X представляет собой любую аминокислоту за исключением аланина.

В других аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где

(i) антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ);

(ii) антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связываются с эпитопом на CD137 человека, содержащим один или более из остатков E111, T113, K114, N126, I132 и P135 из SEQ ID NO: 3; и

(iii) антитело или антигенсвязывающая часть содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DX₁X₂X₃X₄LX₅X₆X₇X₈YX₉YXYX₁₀ (SEQ ID NO: 128), где X₁ представляет собой любую аминокислоту, где X₂ представляет собой неполярную аминокислоту, где X₃ представляет собой неполярную аминокислоту, где X₄ представляет собой любую аминокислоту, где X₅ представляет собой полярную аминокислоту, где X₆ представляет собой любую аминокислоту, где X₇ представляет собой любую аминокислоту, где X₈ представляет собой полярную аминокислоту, где X₉ представляет собой полярную аминокислоту, и где X₁₀ представляет собой любую аминокислоту. В некоторых аспектах X₂ представляет собой пролин, X₃ представляет собой фенилаланин или триптофан, X₅ представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту, X₈ представляет собой тирозин, и X₉ представляет собой тирозин.

В любом из вышеупомянутых аспектов эпитоп содержит K114. В любом из вышеупомянутых аспектов эпитоп содержит E111, T113 и K114. В любом из вышеупомянутых аспектов эпитоп содержит E111, T113, K114, N126 и I132. В любом из вышеупомянутых аспектов эпитоп содержит остатки E111, T113, K114, N126, I132 и P135 из SEQ ID NO: 3.

В других аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело

или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где

(i) антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), и

(ii) антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связываются с эпитопом, содержащим последовательность из одного или более аминокислотных остатков, соответствующих положениям аминокислот 111-135 из SEQ ID NO: 3.

В других аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где

(i) антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ);

(ii) антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связываются с эпитопом, содержащим последовательность из одного или более аминокислотных остатков, соответствующих положениям аминокислот 111-135 из SEQ ID NO: 3;

(iii) антитело или антигенсвязывающая часть содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DXXXXLXXXXYXYX (SEQ ID NO: 126), где X представляет собой любую аминокислоту; или

(iv) их комбинации. В некоторых аспектах X представляет собой любую аминокислоту за исключением аланина.

В других аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где

(i) антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ);

(ii) антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связываются с эпитопом, содержащим последовательность из одного или более аминокислотных остатков, соответствующих положениям аминокислот 111-135 из SEQ ID NO: 3;

(iii) антитело или антигенсвязывающая часть содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DX₁X₂X₃X₄LX₅X₆X₇X₈YX₉YYX₁₀ (SEQ ID NO: 128), где X₁ представляет собой любую аминокислоту, где X₂ представляет собой неполярную аминокислоту, где X₃ представляет собой неполярную аминокислоту, где X₄ представляет собой любую аминокислоту, где X₅ представляет собой полярную аминокислоту, где X₆ представляет собой любую аминокислоту, где X₇ представляет собой любую аминокислоту, где X₈ представляет собой полярную аминокислоту, где X₉ представляет собой полярную аминокислоту, и где X₁₀ представляет собой любую аминокислоту; или

(iv) их комбинации. В некоторых аспектах X₂ представляет собой пролин, X₃ представляет собой фенилаланин или триптофан, X₅ представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту, X₈ представляет собой тирозин, и X₉ представляет собой тирозин.

В других аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где

(i) антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ);

(ii) антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связываются с эпитопом, содержащим последовательность из одного или более аминокислотных остатков, соответствующих положениям аминокислот 111-135 из SEQ ID NO: 3; и

(iii) антитело или антигенсвязывающая часть содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DXXXXLXXXXYXYX (SEQ ID NO: 126), где X представляет собой любую аминокислоту. В некоторых аспектах X представляет собой любую аминокислоту за исключением аланина.

В других аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где

(i) антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ);

(ii) антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связываются с эпитопом, содержащим последовательность из одного или более аминокислотных остатков, соответствующих положениям аминокислот 111-135 из SEQ ID NO: 3; и

(iii) антитело или антигенсвязывающая часть содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DX₁X₂X₃X₄LX₅X₆X₇X₈YX₉YYX₁₀ (SEQ ID NO: 128), где X₁ представляет собой любую аминокислоту, где X₂ представляет собой неполярную аминокислоту, где X₃ представляет собой неполярную аминокислоту, где X₄ представляет собой любую аминокислоту, где X₅ представляет

собой полярную аминокислоту, где X_6 представляет собой любую аминокислоту, где X_7 представляет собой любую аминокислоту, где X_8 представляет собой полярную аминокислоту, где X_9 представляет собой полярную аминокислоту, и где X_{10} представляет собой любую аминокислоту. В некоторых аспектах X_2 представляет собой пролин, X_3 представляет собой фенилаланин или триптофан, X_5 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту, X_8 представляет собой тирозин, и X_9 представляет собой тирозин.

В любом из вышеупомянутых аспектов эпитоп содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислотных остатков, соответствующих положениям аминокислот 111-135 в SEQ ID NO: 3.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где

(i) антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ); и

(ii) антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связываются с эпитопом, содержащим ELTK (соответствуют аминокислотным остаткам 111-114 в SEQ ID NO: 3).

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где

(i) антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ);

(ii) антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связываются с эпитопом, содержащим ELTK (соответствуют аминокислотным остаткам 111-114 в SEQ ID NO: 3);

(iii) антитело или антигенсвязывающая часть содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DXXXXLXXXXYXYXX (SEQ ID NO: 126), где X представляет собой любую аминокислоту; или

(iv) их комбинации. В некоторых аспектах X представляет собой любую аминокислоту за исключением аланина.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где

(i) антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ);

(ii) антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связываются с эпитопом, содержащим ELTK (соответствуют аминокислотным остаткам 111-114 в SEQ ID NO: 3);

(iii) антитело или антигенсвязывающая часть содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DX₁X₂X₃X₄LX₅X₆X₇X₈YX₉YXX₁₀ (SEQ ID NO: 128), где X₁ представляет собой любую аминокислоту, где X₂ представляет собой неполярную аминокислоту, где X₃ представляет собой неполярную аминокислоту, где X₄ представляет собой любую аминокислоту, где X₅ представляет собой полярную аминокислоту, где X₆ представляет собой любую аминокислоту, где X₇ представляет собой любую аминокислоту, где X₈ представляет собой полярную аминокислоту, где X₉ представляет собой полярную аминокислоту, и где X₁₀ представляет собой любую аминокислоту; или

(iv) их комбинации. В некоторых аспектах X₂ представляет собой пролин, X₃ представляет собой фенилаланин или триптофан, X₅ представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту, X₈ представляет собой тирозин, и X₉ представляет собой тирозин.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где

(i) антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ);

(ii) антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связываются с эпитопом, содержащим ELTK (соответствуют аминокислотным остаткам 111-114 в SEQ ID NO: 3); и

(iii) антитело или антигенсвязывающая часть содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DXXXXLXXXXYXYXX (SEQ ID NO: 126), где X представляет собой любую аминокислоту. В некоторых аспектах X представляет собой любую аминокислоту за исключением аланина.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где

(i) антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ);

(ii) антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связываются с эпитопом, содержащим

щим ELTK (соответствуют аминокислотным остаткам 111-114 в SEQ ID NO: 3); и

(iii) антитело или антигенсвязывающая часть содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность $DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$ (SEQ ID NO: 128), где X_1 представляет собой любую аминокислоту, где X_2 представляет собой неполярную аминокислоту, где X_3 представляет собой неполярную аминокислоту, где X_4 представляет собой любую аминокислоту, где X_5 представляет собой полярную аминокислоту, где X_6 представляет собой любую аминокислоту, где X_7 представляет собой любую аминокислоту, где X_8 представляет собой полярную аминокислоту, где X_9 представляет собой полярную аминокислоту, и где X_{10} представляет собой любую аминокислоту. В некоторых аспектах X_2 представляет собой пролин, X_3 представляет собой фенилаланин или триптофан, X_5 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту, X_8 представляет собой тирозин, и X_9 представляет собой тирозин.

В любом из вышеупомянутых аспектов эпитоп содержит остатки ELTK из SEQ ID NO: 3 (соответствуют аминокислотным остаткам 111-114 в SEQ ID NO: 3). В некоторых аспектах эпитоп содержит ELTK из SEQ ID NO: 3 (соответствуют аминокислотным остаткам 111-114 в SEQ ID NO: 3) и остатки N126, I132 и P135 из SEQ ID NO: 3.

В любом из вышеупомянутых аспектов эпитоп является нелинейным эпитопом. В некоторых аспектах мутация остатка K114 из CD137 человека (SEQ ID NO: 3) устраняет связывание антитела или его антигенсвязывающей части с CD137 человека.

В любом из вышеупомянутых аспектов антитело или антигенсвязывающая часть содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность $DXPFXLDXYYYYYX$ (SEQ ID NO: 128), где X представляет собой любую аминокислоту. В некоторых аспектах мутация остатков D95, L100, Y100E, Y100G, Y100H или их комбинаций в CDR3 тяжелой цепи антитела или антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, приводит к потере связывания с CD137 человека. В некоторых аспектах мутация с заменой на аланин остатков P97, F98, D100A, Y100D, Y100F или их комбинаций в CDR3 тяжелой цепи антитела или антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, приводит к снижению связывания с CD137 человека. В других аспектах мутация остатков P97, F98, D100A, Y100D, Y100F или их комбинаций в CDR3 тяжелой цепи антитела или антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, с заменой на любой остаток за исключением аланина приводит к повышению связывания с CD137 человека.

В любом из вышеупомянутых аспектов антитело или его антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с (K_D), составляющей приблизительно 45-95 нМ, 50-90 нМ, 55-85 нМ, 60-80 нМ, 65-75 нМ, 55-75 нМ, 40-70 нМ, 50-80 нМ или 60-90 нМ. В любом из вышеупомянутых аспектов антитело или его антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с (K_D), составляющей от приблизительно 45 нМ до приблизительно 95 нМ, от приблизительно 50 до приблизительно 90 нМ, от приблизительно 55 до приблизительно 85 нМ, от приблизительно 60 до приблизительно 80 нМ, от приблизительно 65 до приблизительно 75 нМ, от приблизительно 55 до приблизительно 75 нМ, от приблизительно 40 до приблизительно 70 нМ, от приблизительно 50 до приблизительно 80 нМ или от приблизительно 60 до приблизительно 90 нМ.

В любом из вышеупомянутых аспектов антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, где CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 68.

В любом из вышеупомянутых аспектов антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, выбранные из группы, состоящей из:

(a) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно; и

(b) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 51, 108 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно.

В любом из вышеупомянутых аспектов антитело или его антигенсвязывающая часть содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, где вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 101; и где вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6.

В любом из вышеупомянутых аспектов антитело или его антигенсвязывающая часть содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

(a) SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно и

(b) SEQ ID NO: 101 и 6 соответственно.

В любом из вышеупомянутых аспектов антитело или его антигенсвязывающая часть содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, где вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 101; и где вариабельный участок лег-

кой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

В любом из вышеупомянутых аспектов антитело или его антигенсвязывающая часть содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые на по меньшей мере 90% идентичны аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно и
- (b) SEQ ID NO: 101 и 6 соответственно.

В любом из вышеупомянутых аспектов антитело или антигенсвязывающая часть по любому из пп.1-27, где антитело или антигенсвязывающая часть содержат тяжелую и легкую цепи, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 129 и 133 соответственно и
- (b) SEQ ID NO: 131 и 133 соответственно.

В любом из вышеупомянутых аспектов выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в данном документе, являются агонистами по отношению к активности CD137 человека.

В любом из вышеупомянутых аспектов выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в данном документе, конкурируют с mAb1 или антигенсвязывающим фрагментом mAb1 за связывание с эпитопом CD137 человека.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывает CD137, или его антигенсвязывающая часть, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, выбранные из группы, состоящей из:

(a) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

(b) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 70, 79 и 90 соответственно;

(c) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 71, 80 и 91 соответственно;

(d) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 72, 81 и 92 соответственно;

(e) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 73, 82 и 91 соответственно;

(f) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 74, 83 и 93 соответственно;

(g) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 75, 84 и 91 соответственно;

(h) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 74, 85 и 94 соответственно;

(i) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 76, 86 и 95 соответственно;

(j) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 77, 87 и 93 соответственно;

(k) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 88 и 90 соответственно;

(l) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 49, 57 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

(m) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 49, 58 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

(n) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 49, 59 и

68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

(o) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 49, 60 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

(p) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 50, 61 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

(q) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 50, 58 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

(r) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 51, 62 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

(s) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 52, 63 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

(t) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 50, 64 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

(u) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 50, 65 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

(v) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 51, 108 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

(w) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 107, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно; и

(x) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 109, 110 и 92 соответственно.

В других аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, где вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 101 и 103; и где вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 и 105.

В других аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или антигенсвязывающая часть содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, кодируемые нуклеотидными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 5 и 7 соответственно и
- (b) SEQ ID NO: 102 и 7 соответственно.

В других аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, кодируемые нуклеотидными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 5 и 7 соответственно;
- (b) SEQ ID NO: 5 и 29 соответственно;
- (c) SEQ ID NO: 5 и 31 соответственно;
- (d) SEQ ID NO: 5 и 33 соответственно;
- (e) SEQ ID NO: 5 и 35 соответственно;
- (f) SEQ ID NO: 5 и 37 соответственно;
- (g) SEQ ID NO: 5 и 39 соответственно;
- (h) SEQ ID NO: 5 и 41 соответственно;
- (i) SEQ ID NO: 5 и 43 соответственно;
- (j) SEQ ID NO: 5 и 45 соответственно;
- (k) SEQ ID NO: 5 и 47 соответственно;
- (l) SEQ ID NO: 9 и 7 соответственно;
- (m) SEQ ID NO: 11 и 7 соответственно;

- (n) SEQ ID NO: 13 и 7 соответственно;
- (o) SEQ ID NO: 15 и 7 соответственно;
- (p) SEQ ID NO: 17 и 7 соответственно;
- (q) SEQ ID NO: 19 и 7 соответственно;
- (r) SEQ ID NO: 21 и 7 соответственно;
- (s) SEQ ID NO: 23 и 7 соответственно;
- (t) SEQ ID NO: 25 и 7 соответственно;
- (u) SEQ ID NO: 27 и 7 соответственно;
- (v) SEQ ID NO: 102 и 7 соответственно;
- (w) SEQ ID NO: 104 и 7 соответственно и
- (x) SEQ ID NO: 5 и 106 соответственно.

В еще одних аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, где CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 68.

В другом аспекте настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, где CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность DXXXXLXXXXYXXYX (SEQ ID NO: 126), где X представляет собой любую аминокислоту. В некоторых аспектах X представляет собой любую аминокислоту за исключением аланина.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, где CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность DXPFXLDDXXYYYYYX (SEQ ID NO: 127), где X представляет собой любую аминокислоту. В некоторых аспектах X представляет собой любую аминокислоту за исключением аланина.

В еще одних аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, где CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность DXXXXLXXXXYXXYX (SEQ ID NO: 126), где X представляет собой любую аминокислоту, и где мутация остатков D95, L100, Y100E, Y100G, Y100H или их комбинаций приводит к потере связывания с CD137 человека.

В других аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, где CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность DXPFXLDDXXYYYYYX (SEQ ID NO: 127), где X представляет собой любую аминокислоту, и где мутация остатков P97, F98, D100A, Y100D, Y100F или их комбинаций приводит к уменьшению связывания с CD137 человека.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, где CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность DXPFXLDDXXYYYYYX (SEQ ID NO: 127), где X представляет собой любую аминокислоту, и где мутация остатков P97, F98, D100A, Y100D, Y100F или их комбинации с заменой на любой остаток за исключением аланина приводит к повышению связывания с CD137 человека.

В еще одних аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, где CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность DX₁X₂X₃X₄LX₅X₆X₇X₈YX₉YYX₁₀ (SEQ ID NO: 128), где X₁ представляет собой любую аминокислоту, где X₂ представляет собой неполярную аминокислоту, где X₃ представляет собой неполярную аминокислоту, где X₄ представляет собой любую аминокислоту, где X₅ представляет собой полярную аминокислоту, где X₆ представляет собой любую аминокислоту, где X₇ представляет собой любую аминокислоту, где X₈ представляет собой полярную аминокислоту, где X₉ представляет собой полярную аминокислоту, и где X₁₀ представляет собой любую аминокислоту. В некоторых аспектах X₂ представляет собой пролин, X₃ представляет собой фенилаланин или триптофан, X₅ представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту, X₈ представляет собой тирозин, и X₉ представляет собой тирозин.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат переменные участки тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно;
- (b) SEQ ID NO: 4 и 28 соответственно;
- (c) SEQ ID NO: 4 и 30 соответственно;
- (d) SEQ ID NO: 4 и 32 соответственно;
- (e) SEQ ID NO: 4 и 34 соответственно;
- (f) SEQ ID NO: 4 и 36 соответственно;
- (g) SEQ ID NO: 4 и 38 соответственно;
- (h) SEQ ID NO: 4 и 40 соответственно;
- (i) SEQ ID NO: 4 и 42 соответственно;
- (j) SEQ ID NO: 4 и 44 соответственно;
- (k) SEQ ID NO: 4 и 46 соответственно;
- (l) SEQ ID NO: 8 и 6 соответственно;
- (m) SEQ ID NO: 10 и 6 соответственно;
- (n) SEQ ID NO: 12 и 6 соответственно;
- (o) SEQ ID NO: 14 и 6 соответственно;
- (p) SEQ ID NO: 16 и 6 соответственно;
- (q) SEQ ID NO: 18 и 6 соответственно;
- (r) SEQ ID NO: 20 и 6 соответственно;
- (s) SEQ ID NO: 22 и 6 соответственно;
- (t) SEQ ID NO: 24 и 6 соответственно;
- (u) SEQ ID NO: 26 и 6 соответственно;
- (v) SEQ ID NO: 101 и 6 соответственно;
- (w) SEQ ID NO: 103 и 6 соответственно и
- (x) SEQ ID NO: 4 и 105 соответственно.

В других аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат переменные участки тяжелой и легкой цепей, где переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 101 и 103; и где переменный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 и 105.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат переменные участки тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые на по меньшей мере 90% идентичны аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно;
- (b) SEQ ID NO: 4 и 28 соответственно;
- (c) SEQ ID NO: 4 и 30 соответственно;
- (d) SEQ ID NO: 4 и 32 соответственно;
- (e) SEQ ID NO: 4 и 34 соответственно;
- (f) SEQ ID NO: 4 и 36 соответственно;
- (g) SEQ ID NO: 4 и 38 соответственно;
- (h) SEQ ID NO: 4 и 40 соответственно;
- (i) SEQ ID NO: 4 и 42 соответственно;
- (j) SEQ ID NO: 4 и 44 соответственно;
- (k) SEQ ID NO: 4 и 46 соответственно;
- (l) SEQ ID NO: 8 и 6 соответственно;
- (m) SEQ ID NO: 10 и 6 соответственно;
- (n) SEQ ID NO: 12 и 6 соответственно;
- (o) SEQ ID NO: 14 и 6 соответственно;
- (p) SEQ ID NO: 16 и 6 соответственно;
- (q) SEQ ID NO: 18 и 6 соответственно;
- (r) SEQ ID NO: 20 и 6 соответственно;
- (s) SEQ ID NO: 22 и 6 соответственно;
- (t) SEQ ID NO: 24 и 6 соответственно;
- (u) SEQ ID NO: 26 и 6 соответственно;
- (v) SEQ ID NO: 101 и 6 соответственно;
- (w) SEQ ID NO: 103 и 6 соответственно и
- (x) SEQ ID NO: 4 и 105 соответственно.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антите-

ло или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат последовательности тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 129 и 133 соответственно и
- (b) SEQ ID NO: 131 и 133 соответственно.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат последовательности тяжелой и легкой цепей, характеризующиеся аминокислотными последовательностями, изложенными под SEQ ID NO: 129 и 133 соответственно.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связывают CD137 человека, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат последовательности тяжелой и легкой цепей, характеризующиеся аминокислотными последовательностями, изложенными под SEQ ID NO: 131 и 133 соответственно.

В любом из вышеупомянутых аспектов антитело или антигенсвязывающая часть специфически связывают CD137 человека и проявляют функцию его агониста.

В любом из вышеупомянутых аспектов выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть проявляют по меньшей мере одно или более из следующих свойств, выбранных из группы, состоящей из следующего:

- индуцируют или повышают димеризацию тримеров CD137;
- индуцируют или повышают мультимеризацию тримеров CD137;
- индуцируют или повышают активацию Т-клеток;
- индуцируют или повышают цитотоксический Т-клеточный ответ;
- индуцируют или повышают пролиферацию Т-клеток;
- индуцируют или повышают продуцирование цитокинов и любой комбинации свойств, приведенных в (a)-(f).

В любом из вышеупомянутых аспектов выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть проявляют по меньшей мере одно или более из следующих свойств по сравнению с эталонным антителом, которое связывает CD137 человека, выбранных из группы, состоящей из следующего:

- (a) не индуцируют или не повышают внутрипеченочную активацию Т-клеток;
- (b) не индуцируют или не повышают внутрипеченочную пролиферацию Т-клеток;
- (c) не индуцируют или не повышают внутриселезеночную активацию Т-клеток;
- (d) не индуцируют или не повышают внутриселезеночную пролиферацию Т-клеток;
- (e) не индуцируют или не повышают активацию макрофагов;
- (f) не индуцируют или не повышают дифференцировку макрофагов;
- (g) не индуцируют повышение уровня или не повышают активность аланинаминотрансферазы (ALT) и
- (h) любой комбинации свойств, приведенных в (a)-(g). В некоторых аспектах эталонным антителом является урелумаб.

В любом из вышеупомянутых аспектов выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть индуцируют или повышают опосредованную CD137 человека активацию Т-клеток в микроокружении опухоли, но не вызывают существенного индуцирования или повышения опосредованной CD137 человека активации Т-клеток в селезенке и/или печени.

В любом из вышеупомянутых аспектов выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть индуцируют или повышают активацию Т-клеток в микроокружении опухоли, но не вызывают существенного индуцирования или повышения активации Т-клеток в селезенке и/или печени.

В любом из вышеупомянутых аспектов выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть индуцируют или повышают опосредованный CD137 человека цитотоксический Т-клеточный ответ в микроокружении опухоли, но не вызывают существенного индуцирования или повышения опосредованного CD137 человека цитотоксического Т-клеточного ответа в селезенке и/или печени.

В любом из вышеупомянутых аспектов выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть индуцируют или повышают цитотоксический Т-клеточный ответ в микроокружении опухоли, но не вызывают существенного индуцирования или повышения цитотоксического Т-клеточного ответа в селезенке и/или печени.

В любом из вышеупомянутых аспектов выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть индуцируют или повышают опосредованную CD137 человека пролиферацию Т-клеток в микроокружении опухоли, но не вызывает существенного индуцирования или повышения опосредованной CD137 человека пролиферации Т-клеток в селезенке и/или печени.

В любом из вышеупомянутых аспектов выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть индуцируют или повышают опосредованную CD137 человека пролиферацию Т-клеток в селезенке и/или печени.

у mAb8 (т.е. антитела, содержащего последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, изложенные под SEQ ID NO: 101 и 6 соответственно). В некоторых аспектах выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть характеризуются значением K_D , которое по меньшей мере эквивалентно такому значению у mAb10 (т.е. антитела, содержащего последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей, изложенные под SEQ ID NO: 26 и 6 соответственно).

В любом из вышеупомянутых аспектов выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть вступают в перекрестную реакцию с CD137 яванского макака и/или CD137 мыши.

В любом из вышеупомянутых аспектов выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть выбраны из группы, состоящей из антитела на основе IgG1, IgG2 и IgG3, и IgG4, и IgM, и IgA1, и IgA2, и IgD, и IgE. В некоторых аспектах выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть представляют собой IgG1-антитело или IgG4-антитело.

В любом из вышеупомянутых аспектов выделенное моноклональное антитело содержит константный участок тяжелой цепи IgG1 дикого типа или IgG4 дикого типа. В некоторых аспектах выделенное моноклональное антитело содержит мутантный константный участок тяжелой цепи IgG1. В некоторых аспектах выделенное моноклональное антитело содержит мутантный константный участок тяжелой цепи IgG4. В некоторых аспектах мутантный константный участок тяжелой цепи IgG4 предусматривает замену по Ser228. В некоторых аспектах мутантный константный участок тяжелой цепи IgG4 предусматривает замену S228P.

В любом из вышеупомянутых аспектов выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть связываются с эпитопом CD137, где аминокислотные остатки, содержащие эпитоп, связываемый антителом, расположены в пределах 4 ангстрем относительно аминокислотных остатков, содержащих паратоп антитела mAb1, описанного в данном документе.

В любом из вышеупомянутых аспектов выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть связываются с эпитопом CD137, где мутация эпитопа, связываемого антителом, подавляет, уменьшает или блокирует связывание как с данным антителом, так и с антителом mAb1.

В любом из вышеупомянутых аспектов выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть являются полностью человеческими или гуманизированными (т.е. представляют собой полностью человеческое или гуманизированное антитело или его антигенсвязывающую часть).

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающую часть, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В других аспектах настоящего изобретения представлена нуклеиновая кислота, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь, тяжелую цепь или как легкую, так и тяжелую цепи выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе. В некоторых аспектах нуклеиновая кислота содержит SEQ ID NO: 5 и 7. В некоторых аспектах нуклеиновая кислота содержит SEQ ID NO: 102 и 7. В некоторых аспектах настоящего изобретения представлен вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе. В других аспектах настоящего изобретения представлена клетка, трансформированная вектором экспрессии, описанным в данном документе.

В другом аспекте настоящего изобретения представлен способ обеспечения продуцирования выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, которые специфически связывают CD137 человека, при этом способ предусматривает поддержание клетки, описанной в данном документе, в условиях, обеспечивающих возможность экспрессии моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части. В некоторых аспектах способ обеспечения продуцирования моноклонального антитела, которое специфически связывает CD137 человека, или его антигенсвязывающей части, дополнительно предусматривает получение моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части.

В еще одном аспекте настоящего изобретения представлен способ индуцирования или повышения димеризации тримеров CD137 человека у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

В другом аспекте настоящего изобретения представлен способ индуцирования или повышения мультимеризации тримеров CD137 человека у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

В других аспектах настоящего изобретения представлен способ индуцирования или повышения активации Т-клеток, опосредованной CD137 человека, у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых аспектах активация Т-клеток осуществляется в микроокружении опухоли. В других аспектах активация Т-клеток в селезенке и/или печени у субъекта, по сути, не осуществляется.

В другом аспекте настоящего изобретения представлен способ индуцирования или повышения цитотоксического Т-клеточного ответа, опосредованного CD137 человека, у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых аспектах цитотоксический Т-клеточный ответ осуществляется в микроокружении опухоли. В других аспектах цитотоксический Т-клеточный ответ в селезенке и/или печени у субъекта, по сути, не осуществляется.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлен способ индуцирования или повышения продуцирования цитокинов, опосредованного CD137 человека, у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются IL-2, TNF α , IL-13, IFN γ или их комбинации. В некоторых аспектах продуцируемым цитокином является IL-2. В некоторых аспектах продуцируемым цитокином является TNF α . В некоторых аспектах продуцируемым цитокином является IL-13. В некоторых аспектах продуцируемым цитокином является IFN γ . В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются IL-2 и TNF α . В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются IL-2 и IL-13. В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются IL-2 и IFN γ . В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются TNF α и IL-13. В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются TNF α и IFN γ . В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются IL-13 и IFN γ . В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются IL-2, TNF α и IL-13. В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются IL-2, TNF α и IFN γ . В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются IFN γ , TNF α и IL-13. В других аспектах продуцирование цитокинов осуществляется в микроокружении опухоли. В других аспектах продуцирование цитокинов в селезенке и/или печени у субъекта, по сути, не осуществляется.

В другом аспекте настоящего изобретения представлен способ индуцирования или повышения пролиферации Т-клеток, опосредованной CD137 человека, у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых аспектах пролиферация Т-клеток осуществляется в микроокружении опухоли. В других аспектах пролиферация Т-клеток в селезенке и/или печени у субъекта, по сути, не осуществляется.

В другом аспекте настоящего изобретения представлен способ снижения или подавления роста опухоли, предусматривающей введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

В еще одном аспекте настоящего изобретения представлен способ лечения нарушения, опосредованного CD137 человека, у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлен способ лечения рака у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых аспектах рак выбран из группы, состоящей из меланомы, глиомы, рака почки, рака молочной железы, гемобластоза и рака головы и шеи. В некоторых аспектах гемобластоз представляет собой В-клеточную лимфому.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлен способ индуцирования противоопухолевого иммунного ответа памяти, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

В любом из вышеупомянутых аспектов инфильтрация иммунными клетками микроокружения опухоли повышается после введения антитела или антигенсвязывающей части. В некоторых аспектах иммунные клетки экспрессируют CD45.

В любом из вышеупомянутых аспектов количество регуляторных Т-клеток (Treg) уменьшается в микроокружении опухоли после введения антитела или антигенсвязывающей части. В некоторых аспектах клетки Treg экспрессируют CD4, FOXP-3 и CD24.

В любом из вышеупомянутых аспектов количество клеток макрофагов уменьшается в микроокружении опухоли после введения моноклонального антитела или антигенсвязывающей части. В некоторых аспектах макрофаги экспрессируют CD45 и CD11b.

В любом из вышеупомянутых аспектов истощение Т-клеток уменьшается после введения антитела или антигенсвязывающей части. В некоторых аспектах уменьшение истощения Т-клеток предусматривает снижение экспрессии TIGIT, PD-1, LAG-3 или их комбинации. В некоторых аспектах уменьшение

истощения Т-клеток предусматривает снижение экспрессии TIGIT и PD-1.

В любом из вышеупомянутых аспектов истощение CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, естественных клеток-киллеров или их комбинаций уменьшает эффективность антитела или его антигенсвязывающей части.

В другом аспекте настоящего изобретения представлен способ выявления присутствия или отсутствия CD137 человека в биологическом образце, предусматривающий:

приведение в контакт биологического образца с антителом или антигенсвязывающей частью, описанными в данном документе, где антитело или антигенсвязывающая часть являются мечеными подающим веществом; и

(b) выявление антитела или антигенсвязывающей части, связанных с CD137 человека, за счет чего осуществляется выявление присутствия или отсутствия CD137 человека в биологическом образце.

В другом аспекте настоящего изобретения представлен набор, содержащий контейнер, содержащий антитело или антигенсвязывающую часть, описанные в данном документе, и необязательный фармацевтически приемлемый носитель, или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, и вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению антитела или фармацевтической композиции с целью лечения или замедления прогрессирования рака или уменьшения или подавления роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения представлен набор, содержащий контейнер, содержащий антитело или антигенсвязывающую часть, описанные в данном документе, и необязательный фармацевтически приемлемый носитель, или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, и вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению антитела или фармацевтической композиции по отдельности или в комбинации с другим средством с целью лечения или замедления прогрессирования рака или уменьшения или подавления роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения представлено применение выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, с целью индуцирования или повышения активации Т-клеток, опосредованной CD137 человека, у субъекта. В других аспектах настоящего изобретения представлено применение выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, с целью индуцирования или повышения мультимеризации тримеров CD137 человека у субъекта. В другом аспекте настоящего изобретения представлено применение выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, с целью индуцирования или повышения цитотоксического Т-клеточного ответа, опосредованного CD137 человека, у субъекта. В других аспектах настоящего изобретения представлено применение выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, с целью индуцирования или повышения продуцирования цитокинов, опосредованного CD137 человека, у субъекта. В другом аспекте настоящего изобретения представлено применение выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, с целью индуцирования или повышения пролиферации Т-клеток, опосредованной CD137 человека, у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения представлено применение выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, с целью уменьшения или подавления роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта. В других аспектах настоящего изобретения представлено применение выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, с целью лечения нарушения, опосредованного CD137 человека, у нуждающегося в этом субъекта. В другом аспекте настоящего изобретения представлено применение выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, с целью лечения рака у нуждающегося в этом субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения представлено применение выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, с целью изготовления лекарственного препарата, предназначенного для лечения или замедления прогрессирования рака или уменьшения или подавления роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта. В других аспектах настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в данном документе, предназначенные для изготовления лекарственного препарата с целью лечения или замедления прогрессирования рака или уменьшения или подавления роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта. В другом аспекте настоящего изобретения представлены выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в данном документе, с целью применения в качестве лекарственного препарата.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлены графики, изображающие распределение показателей аффинности связывания клонов исходного антитела mAb1 к CD137 с созревшей аффинностью.

На фиг. 2 представлена схема, показывающая результаты сканирования аланином CDRH3 mAb1, которые получены путем измерения аффинности связывания (K_D) с CD137 человека или мыши.

На фиг. 3А показана аминокислотная последовательность CD137 человека, где остатки, содержа-

щие эпитоп, связываемый mAb1, mAb4 или mAb5, указаны жирным шрифтом.

Фиг. 3B представляет собой график, изображающий данные кинетики связывания mAb1 с внеклеточным доменом CD137 мыши и крысы, определенные при помощи поверхностного плазмонного резонанса.

На фиг. 3C представлены изображения рентгеновской кристаллографии CD137 человека, связанного с CD137L (показано серым цветом), а остатки E111, T113, K114 и P135 показаны в виде сфер.

На фиг. 3D представлены изображения рентгеновской кристаллографии CD137 человека, связанного с CD137L (показан серым цветом) в тримерной конструкции, а остатки E111, T113, K114 и P135 показаны в виде сфер.

На фиг. 4A представлена диаграмма рассеяния с данными проточной цитометрии, изображающая повышение экспрессии TIGIT (вверху) или PD-1 (внизу) на CD44+ Т-клетках в ответ на антигена к CD137.

На фиг. 4B представлены графики, изображающие результаты количественного определения CD8+ CD44+ Т-клеток, экспрессирующих TIGIT (вверху) или PD-1 (внизу), в селезенке мышей после обработки антигенами к CD137.

На фиг. 4C представлены графики, изображающие результаты количественного определения CD8+ Т-клеток в селезенке мышей после обработки антигенами к CD137, выраженные процентным содержанием клеток CD45+ (слева) или количеством клеток на селезенку (справа).

На фиг. 5A представлены графики, показывающие объемы отдельных опухолей CT26 у мышей после обработки антигенами к CD137 в указанных дозах.

Фиг. 5B представляет собой график, показывающий средние объемы опухолей, представленные на фиг. 5A.

Фиг. 5C представляет собой график Каплана-Мейера, показывающий общую выживаемость мышей с опухолями после обработки антигенами к CD137.

Фиг. 5D представляет собой график, показывающий объем опухоли у мышей, которым повторно вводили опухолевые клетки CT26.

На фиг. 6A представлены графики, показывающие объемы отдельных опухолей CT26 у мышей после обработки исходными и с созревшей аффинностью антигенами к CD137.

Фиг. 6B представляет собой график, показывающий средние объемы опухолей, представленные на фиг. 6A.

На фиг. 7 представлены графики, изображающие процентное содержание CD8+ или CD4+ Т-клеток в Т-клетках селезенки (вверху) и инфильтрирующих опухоль лейкоцитах (внизу) после обработки антигенами к CD137 в указанных дозах.

На фиг. 8 представлены графики, показывающие объемы отдельных опухолей, когда мышей обрабатывали mAb1, антигенами, истощающими лимфоциты, или без них. CD4+ Т-клетки истощали с помощью GK1.5 (средний график), CD8+ Т-клетки истощали с помощью YTS169.4 (второй график справа), а НК-клетки истощали с помощью антигена к асиало-GM1 (последний график справа).

На фиг. 9 представлены графики, показывающие объемы отдельных опухолей у мышей с опухолями CT26 (рак толстой кишки), опухолями EMT-6 (рак молочной железы), опухолями A20 (В-клеточная лимфома) или опухолями MC38 (рак толстой кишки), которых обработали mAb8 или антигеном изотипического контроля.

На фиг. 10A-10C показана противоопухолевая эффективность *in vivo* антиген к CD137, вводимых в дозе 150 мкг/мышь. Объемы отдельных опухолей показаны на 10A, средние объемы опухолей показаны на 10B, а процент выживаемости показан на 10C.

На фиг. 11A-11C показана противоопухолевая эффективность *in vivo* антиген к CD137, вводимых в дозе 20 мкг/мышь. Объемы отдельных опухолей показаны на 11A, средние объемы опухолей показаны на 11B, а процент выживаемости показан на 11C.

На фиг. 12 представлены графики, показывающие объемы отдельных опухолей у мышей с опухолями CT26, получавших разные дозы mAb1 (т.е. 12,5, 25, 50, 100 или 200 мкг) или изотипического контроля.

На фиг. 13A и 13B показан вклад связывания Fc в противоопухолевую эффективность mAb1. На фиг. 13A показано mAb1 в виде изотипа IgG4 или агликозилированного изотипа IgG4. Средние объемы опухолей показаны вверху, а объемы отдельных опухолей показаны внизу. На фиг. 13B показано mAb1 в виде изотипа IgG4 или агликозилированного изотипа IgG1. Средние объемы опухолей показаны вверху, а объемы отдельных опухолей показаны внизу.

На фиг. 14A-14D показана противоопухолевая эффективность *in vivo* антиген к CD137 у мышей с крупными сформировавшимися опухолями (т.е. 500 мм³) до получения лечения. Объемы отдельных опухолей показаны на 14A и 14D, средние объемы опухолей показаны на 14B, а процент выживаемости показан на 14C.

На фиг. 15 представлен график выживаемости Каплана-Мейера, показывающий защитный противоопухолевый иммунитет у мышей, предварительно обработанных mAb1, mAb8 или изотипическим контролем, из фиг. 14A-14C, и считавшихся излеченными, которым повторно вводили клетки CT26 в проти-

воположный бок.

На фиг. 16А представлены диаграммы рассеяния для данных проточной цитометрии, показывающие распространение внутрипеченочных Т-клеток CD45⁺ после обработки антителами к CD137 в указанных дозах.

На фиг. 16В представлены графики, изображающие количественную оценку внутрипеченочных CD8⁺ Т-клеток (слева) и CD4⁺ Т-клеток (справа) после обработки антителами к CD137 в указанных дозах.

На фиг. 17А представлены графики, изображающие процентное содержание CD3⁺, CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток в популяции Т-клеток селезенки после обработки мышей антителами к CD137 с созревшей аффинностью.

На фиг. 17В представлены графики, изображающие процентное содержание CD3⁺, CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток в популяции Т-клеток печени после обработки мышей антителами к CD137 с созревшей аффинностью.

На фиг. 18А представлены графики, изображающие процентное содержание CD8⁺CD44⁺ Т-клеток селезенки, экспрессирующих TIGIT, PD-1 или LAG3, после обработки мышей антителами к CD137 с созревшей аффинностью.

На фиг. 18В представлены графики, изображающие процентное содержание CD8⁺CD44⁺ Т-клеток печени, экспрессирующих TIGIT, PD-1 или LAG3, после обработки мышей антителами к CD137 с созревшей аффинностью.

На фиг. 19А представлены графики, изображающие процентное содержание CD4⁺CD44⁺ Т-клеток селезенки, экспрессирующих TIGIT, PD-1 или LAG3, после обработки мышей антителами к CD137 с созревшей аффинностью.

На фиг. 19В представлены графики, изображающие процентное содержание CD4⁺CD44⁺ Т-клеток печени, экспрессирующих TIGIT, PD-1 или LAG3, после обработки мышей антителами к CD137 с созревшей аффинностью.

На фиг. 20А - 20С представлены графики с показателями токсичности *in vivo*, полученные в результате многократного введения антител mAb1, mAb8 или 3Н3 к CD137 в разных дозах. Фиг. 20А представляет собой график, показывающий процентное содержание CD8⁺ Т-клеток в печени после введения антител к CD137. Фиг. 20В представляет собой график, показывающий активность аланинаминотрансферазы (ALT) в плазме крови мышей, которым вводили антитела к CD137. Фиг. 20С представляет собой график, показывающий уровни TNF α в плазме крови мышей, которым вводили антитела к CD137.

На фиг. 21 представлены типичные изображения срезов печени, окрашенных гематоксилином и эозином (H&E), полученных от мышей, которых обрабатывали mAb1, mAb8, 3Н3 или изотипическим контролем, как описано на фиг. 20А-20С. Стрелками указана инфильтрация иммунных клеток.

На фиг. 22А-22Д представлены типичные графики FACS, показывающие перепрограммирование иммунных клеток в микроокружении опухоли. Мышам с опухолями CT26 вводили многократные дозы mAb8 или изотипического контроля (дни 0, 3, 6 и 9). На фиг. 22А показана общая инфильтрация иммунными клетками, исходя из экспрессии CD45. На фиг. 22В показано уменьшение количества клеток Treg, что измерено по экспрессии FOXP-3 и CD25. На фиг. 22С показано уменьшение источника Т-клеток, что измерено по экспрессии PD-1 и TIGIT. На фиг. 22Д показано уменьшение количества опухолеассоциированных макрофагов, что измерено по экспрессии F4/80 и CD11b.

На фиг. 23 показан анализ иммунофенотипирования селезенки, полученных от мышей с опухолями CT26, которых обрабатывали либо антителами mAb1 и 3Н3 к CD137, либо изотипическим контролем.

Фиг. 24 представляет собой график, показывающий концентрацию IL-2 (пг/мл), продуцируемого мышинными Т-клетками в анализе стимуляции OVA, при стимуляции указанными антителами к CD137. Наряду с атезолизумабом (антителом к PD-L1) в качестве препарата сравнения использовали мышинное антитело к PD-1 (RMP1-14).

Фиг. 25А и 25В представляют собой графики, показывающие процентное содержание мышинных CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих CD25 (25А) или TIGIT (25В), при стимуляции указанными антителами к CD137 в анализе стимуляции OVA. Наряду с атезолизумабом (антителом к PD-L1) в качестве препаратов сравнения использовали мышинное антитело к PD-1 (RMP1-14) и мышинное антитело к CD137 (3Н3).

На фиг. 26 представлены гистограммы, изображающие количественную оценку цитокинов (IL-2, TNF α , IL-13 и IFN γ), продуцируемых CD3⁺ Т-клетками после инкубации с антителами к CD137, иммобилизованными на планшете. Уровни цитокинов показаны в виде кратности повышения по сравнению с исходной активацией антителом к CD3.

На фиг. 27А-27С представлены графики, изображающие дозозависимый ответ в виде продуцирования IFN γ в реакции смешанной культуры лимфоцитов после обработки антителами к CD137. Антитело к PD1 (китруда; Merck) использовали в качестве контроля.

Фиг. 28 представляет собой график, показывающий продуцирование IFN γ человеческими Т-клетками, совместно культивированными с клетками CHO, сконструированными для экспрессии CD32 (клетки CHO-CD32), в присутствии антител к mAb1, mAb8, mAb4 или mAb5 к CD137 или изотипическо-

го контроля.

Фиг. 29 представляет собой график, показывающий пролиферацию клеток Treg при совместном культивировании с клетками CHO, сконструированными для экспрессии CD32 (клетки CHO-CD32), в присутствии или в отсутствие антител mAb1, mAb8, mAb4 или mAb5 к CD137, изотипического контроля.

На фиг. 30 представлены графики, показывающие передачу сигналов NF κ B и SRF в клетках CCL-119, трансдуцированных генами-репортерами люциферазы для NF κ B или SRF, в присутствии mAb1, mAb8, mAb4 или mAb5 в разных концентрациях.

На фиг. 31 представлены графики, показывающие индуцирование IL-6, TNF α или IL-27 полученными из костного мозга мышинными макрофагами, стимулированными агонистом TLR9 CpG в присутствии антител mAb1, 3H3 или LOB12.3 к CD137 или изотипического контроля.

На фиг. 32 представлен график, показывающий индуцирование TNF α полученными из моноцитов человека макрофагами, стимулированными LPS в присутствии антител mAb1, mAb4 или mAb5 к CD137 или изотипического контроля.

На фиг. 33 представлен график, показывающий влияние антител к CD137 на дифференцировку макрофагов, определенную по экспрессии CD64 моноцитами THP1, культивируемыми с PMA в присутствии антител mAb1, mAb4 или mAb5 к CD137 или изотипического контроля.

На фиг. 34A - 34C представлены графики, показывающие процентное содержание hCD45+, hCD8⁺ или hCD4⁺ у иммунокомпетентных мышей, которые получали РВМС человека и антитела mAb1, mAb4 или mAb5 к CD137 или изотипический контроль.

Подробное описание изобретения

Было показано, что противораковая терапия антителами-агонистами к CD137 индуцирует иммуноопосредованное отторжение опухоли у мышей, и аналогичные средства такого типа в настоящее время тестируют у больных раком. В предыдущих отчетах указано, что введение антител к CD137 может вызывать значительные накопления поликлональных инфильтратов Т-лимфоцитов в печени (Dubrot et al., (2010) *Cancer Immunology, Immunotherapy* 59(8): 1223-1233), свидетельствуя о воспалении печени и потенциальной медикаментозной гепатотоксичности. В недавнем отчете по клинической оценке антитела-агониста к CD137 (урелумаб, BMS-663513; Bristol-Myers Squibb) документально подтверждены наблюдаемые, связанные с проводимым лечением нежелательные явления у людей, включая признаки тяжелой гепатотоксичности (трансаминит), коррелирующей с дозой антитела (Segal et al., (2016) *Clin Cancer Res* 23(8):1929-1936).

В настоящем изобретении представлены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, которые специфически связываются с эпитопом CD137 человека и выступают в качестве агонистов CD137 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть конкурируют с mAb1 за связывание с эпитопом CD137 человека. В некоторых аспектах антитела-агонисты к CD137 по настоящему изобретению индуцируют продуцирование цитокинов и распространение CD8⁺ Т-клеток в микроокружении опухоли и защитный противоопухолевый иммунитет *in vivo* с сопутствующим снижением возможности возникновения событий, связанных с токсичностью, по сравнению с мышинным антителом 3H3 к CD137 (Melero et al. (1997) *Nature Medicine* 3(6):682-685; Uno et al. (2006) *Nature Medicine* 12(6):693-696) и по меньшей мере двумя антителами к CD137 человека, находящимися на стадии клинической разработки (BMS-663513/урелумаб, Bristol-Meyers Squibb, и PF-05082566/утомилумаб, Pfizer).

Определения

Термины, используемые в формуле изобретения и описании, определены ниже, если не указано иное.

Следует отметить, что используемые в описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не предписывает иное. Кроме того, если иное не требуется по контексту, термины в единственном числе включают множественное число, а термины во множественном числе включают единственное число.

Используемое в данном документе выражение "приблизительно" будет понятно специалистам в данной области техники и будет варьироваться до некоторой степени в зависимости от контекста, в котором его используют. Если приведены варианты применения этого выражения, которые не понятны специалистам в данной области техники с учетом контекста, в котором его используют, то "приблизительно" будет означать до плюс или минус 10% от конкретного значения.

Используемый в данном документе термин "агонист" относится к любой молекуле, которая частично или полностью стимулирует, индуцирует, повышает и/или активирует биологическую активность нативного полипептида, раскрытого в данном документе (например, CD137). Подходящие молекулы-агонисты, в частности, включают антитела-агонисты или фрагменты антител, фрагменты или варианты аминокислотной последовательности нативных полипептидов, пептиды, антисмысловые олигонуклеотиды, малые органические молекулы и т.д. В некоторых вариантах осуществления отмечают зависимость от дозы активации в присутствии агониста. В некоторых вариантах осуществления измеренный сигнал

(например, биологическая активность) на по меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 15%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 100% выше сигнала, измеренного с отрицательным контролем в сопоставимых условиях. Также в данном документе раскрыты способы идентификации агонистов, подходящих для применения в способах по настоящему изобретению. Например, эти способы включают без ограничения анализа связывания, такие как твердофазный иммуоферментный анализ (ELISA), системы Forte Bio© и радиоиммунологический анализ (RIA). В этих анализах определяют способность агониста связывать представляющий интерес полипептид (например, рецептор или лиганд, например, CD137), что, таким образом, указывает на способность агониста стимулировать, повышать или увеличивать активность полипептида. Эффективность агониста также можно определить с помощью функциональных анализов, таких как способность агониста активировать или стимулировать функцию полипептида. Например, функциональный анализ может включать приведение в контакт полипептида с кандидатной молекулой-агонистом и измерение поддающегося выявлению изменения одной или более биологических активностей, обычно ассоциируемых с данным полипептидом. Активность агониста обычно определяют по его значению EC_{50} (концентрации, необходимой для активации 50% агонистического ответа). Чем ниже значение EC_{50} , тем выше активность агониста и тем ниже концентрация, необходимая для активации максимального биологического ответа.

Используемый в данном документе термин "сканирование аланином" относится к методике, используемой для определения вклада конкретного остатка дикого типа в стабильность или функцию (функции) (например, аффинность связывания) данного белка или полипептида. Методика включает замену остатка дикого типа в полипептиде на остаток аланина с последующей оценкой стабильности или функции (функций) (например, аффинности связывания) замещенного аланином производного или мутантного полипептида и сравнение с полипептидом дикого типа. В данной области техники известны методики замены аланина остатком дикого типа в полипептиде.

Выражение "улучшение" относится к любому терапевтически полезному результату при лечении болезненного состояния, например рака, включая его профилактику, уменьшение тяжести или прогрессирования, ремиссию или излечение.

Используемый в данном документе термин "аминокислота" относится к природным и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, функция которых аналогична природным аминокислотам. Природными аминокислотами являются те аминокислоты, которые кодируются генетическим кодом, а также аминокислоты, которые позднее подвергаются модификации, например, гидроксипролин, γ -карбоксихлутамат и О-фосфосерин. Выражение "аналоги аминокислот" относится к соединениям, которые имеют ту же основную химическую структуру, что и природная аминокислота, т.е. углерод, который связан с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и R-группой, например, гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные каркасы, но сохраняют ту же основную химическую структуру, что и природная аминокислота. Термин "миметики аминокислот" относится к химическим соединениям со структурой, которая отличается от общей химической структуры аминокислоты, но функция которых аналогична природной аминокислоте.

Аминокислоты могут упоминаться в данном документе либо под их общеизвестными трехбуквенными символами, либо под однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Нуклеотиды также могут упоминаться под их общепринятыми однобуквенными кодами. Используемый в данном документе термин "полярная аминокислота" относится к аминокислоте, содержащей боковую цепь, которая предпочтительно находится в водном окружении. В некоторых вариантах осуществления полярная аминокислота выбрана из группы, состоящей из: аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, глутамина, гистидина, лизина, серина, треонина и тирозина. Полярные аминокислоты могут быть положительно, отрицательно или нейтрально заряженными. Используемый в данном документе термин "неполярная аминокислота" относится к аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аланина, цистеина, глицина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, пролина, триптофана и валина.

Используемый в данном документе термин "аминокислотная замена" относится к замещению по меньшей мере одного существующего аминокислотного остатка в предварительно определенной аминокислотной последовательности (аминокислотной последовательности исходного полипептида) вторым, отличающимся "замещающим" аминокислотным остатком. "Аминокислотная вставка" относится к включению по меньшей мере одной дополнительной аминокислоты в заранее заданную аминокислотную

последовательность. Хотя вставка обычно состоит из вставки одного или двух аминокислотных остатков, также могут быть осуществлены более крупные "пептидные вставки", например, вставка от приблизительно трех до приблизительно пяти или даже до приблизительно десяти, пятнадцати или двадцати аминокислотных остатков. Вставленный остаток (остатки) могут быть природными или не встречающимися в природе, что раскрыто выше. "Аминокислотная делеция" относится к удалению по меньшей мере одного аминокислотного остатка из предварительно определенной аминокислотной последовательности.

Используемый в данном документе термин "количество" или "уровень" относится к поддающемуся выявлению количеству, уровню или содержанию вещества (например, белка). При ссылке на полипептид, как, например, описанный в данном документе, термины "уровень экспрессии" или "экспрессируемый уровень" в целом используются взаимозаменяемо и обычно относятся к поддающемуся выявлению количеству полипептида в биологическом образце (например, на поверхности клетки).

Используемый в данном документе термин "антитело-агонист к CD137" (используется взаимозаменяемо с термином "антитело к CD137") относится к антителу, которое специфически связывается с CD137 и частично или полностью стимулирует, индуцирует, повышает и/или активирует биологическую активность CD137, ответ и/или нижележащий сигнальный путь (пути), опосредуемый передачей сигналов CD137, или другую функцию, опосредованную CD137. В некоторых вариантах осуществления антитело-агонист к CD137 связывается с CD137 и обеспечивает возможность связывания CD137L. В некоторых вариантах осуществления антитело-агонист к CD137 связывается с CD137 и индуцирует мультимеризацию CD137. В некоторых вариантах осуществления антитело-агонист к CD137 связывается с CD137 и индуцирует димеризацию тримеров CD137. В некоторых вариантах осуществления антитело-агонист к CD137 связывается с CD137 и индуцирует мультимеризацию тримеров CD137. Примеры антитело-агонистов к CD137 представлены в данном документе. Способы выявления образования комплекса тример:тример известны специалистам в данной области техники. Например, было показано, что с помощью электронной микроскопии выявляют такие комплексы, см., например, Won, E. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 285 (12): 9202-9210 (2010).

Используемый в данном документе термин "mAb1 к CD137" (используемый взаимозаменяемо с "mAb1") относится к иллюстративному антителу-агонисту к CD137, которое содержит аминокислотную последовательность переменного участка тяжелой цепи (V_H):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYY
MDVWGKGTITVTVSS (SEQ ID NO: 4),

аминокислотную последовательность переменного участка легкой цепи (V_L):

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQGHLFPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:

6).

Используемый в данном документе термин "mAb8 к CD137" (используемый взаимозаменяемо с "mAb8") относится к иллюстративному антителу-агонисту к CD137, которое содержит аминокислотную последовательность переменного участка тяжелой цепи (V_H):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GDTTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYY
MDVWGKGTITVTVSS (SEQ ID NO: 101);

аминокислотную последовательность переменного участка легкой цепи (V_L):

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQGHLFPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:

6).

Используемый в данном документе термин "mAb10 к CD137" (используемый взаимозаменяемо с "mAb10") относится к иллюстративному антителу-агонисту к CD137, которое содержит аминокислотную последовательность переменного участка тяжелой цепи (V_H):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYGYAMSWVRQAPGKGLEWVAAISG
SGDSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYY
YMDVWGKGTITVTVSS (SEQ ID NO: 26);

аминокислотную последовательность переменного участка легкой цепи (V_L):

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQGHLFPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:

6).

Используемый в данном документе термин "антитело" относится к полному антителу, содержащему два полипептида легкой цепи и два полипептида тяжелой цепи. Полные антитела включают разные изоформы антител, в том числе антитела IgM, IgG, IgA, IgD и IgE. Термин "антитело" включает поликлональное антитело, моноклональное антитело, химеризированное или химерное антитело, гуманизиро-

ванное антитело, приматизированное антитело, деиммунизированное антитело и полностью человеческое антитело. Антитело может быть изготовлено или получено в любом из множества видов, например, млекопитающих, таких как люди, приматы, отличные от человека (например, орангутан, бабуины или шимпанзе), лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, козы, собаки, кошки, кролики, морские свинки, песчанки, хомяки, крысы и мыши. Антитело может быть очищенным или рекомбинантным антителом.

Используемые в данном документе термины "фрагмент антитела", "антигенсвязывающий фрагмент", "антигенсвязывающая часть" или подобные термины относятся к фрагменту антитела, который сохраняет способность связываться с антигеном-мишенью (например, CD137) и подавлять активность антигена-мишени. Такие фрагменты включают, например, одноцепочечное антитело, одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv), Fd-фрагмент, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент или F(ab')₂-фрагмент. Фрагмент scFv представляет собой одну полипептидную цепь, которая включает переменные участки тяжелой и легкой цепей антитела, из которого получен scFv. Кроме того, интраантитела, миниантитела, триатела и дитела также включены в определение антитела и являются совместимыми для применения в способах, описанных в данном документе. См., например, Todorovska et al., (2001) *J. Immunol. Methods* 248(1):47-66; Hudson and Kortt, (1999) *J. Immunol. Methods* 231(1):177-189; Poljak, (1994) *Structure* 2(12):1121-1123; Rondon and Marasco, (1997) *Annu. Rev. Microbiol.* 51:257-283, раскрытие каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Используемый в данном документе термин "фрагмент антитела" также включает, например, однодоменные антитела, такие как верблюжьи однодоменные антитела. См., например, Muyldermans et al., (2001) *Trends Biochem. Sci.* 26:230-235; Nuttall et al., (2000) *Curr. Pharm. Biotech.* 1:253-263; Reichmann et al., (1999) *J. Immunol. Meth.* 231:25-38; публикации заявок согласно РСТ №№ WO 94/04678 и WO 94/25591 и патент США № 6005079, которые все включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлены однодоменные антитела, содержащие два V_H-домена с модификациями, за счет чего образуются однодоменные антитела.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент включает переменный участок полипептида тяжелой цепи и переменный участок полипептида легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, содержит CDR полипептида легкой цепи и тяжелой цепи антитела.

Термин "антигенпрезентирующая клетка" или "АРС" представляет собой клетку, которая представляет чужеродный антиген в комплексе с МНС на своей поверхности. Т-клетки распознают этот комплекс с помощью Т-клеточного рецептора (TCR). Примеры АРС включают без ограничения дендритные клетки (DC), мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), моноциты (такие как THP-1), В-лимфобластоидные клетки (такие как C1R.A2, 1518 B-LCL) и моноцитарные дендритные клетки (DC). Некоторые АРС интернализуют антигены либо путем фагоцитоза, либо путем рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Термин "презентация антигена" относится к процессу, с помощью которого АРС захватывают антигены и обеспечивают возможность их распознавания Т-клетками, например, в качестве компонента конъюгата с МНС-I и/или МНС-II.

Используемый в данном документе термин "апоптоз" относится к процессу запрограммированной гибели клеток, который имеет место у многоклеточных организмов (например, у людей). Жестко регулируемые биохимические и молекулярные события, которые приводят к апоптозу, могут привести к наблюдаемым и характерным морфологическим изменениям в клетке, включая блеббинг мембран, сокращение объема клетки, конденсацию и фрагментацию хромосомной ДНК и распад мРНК. Обычным способом идентификации клеток, в том числе Т-клеток, подвергающихся апоптозу, является воздействие на клетки белком, конъюгированным с флуорофором (аннексин V). Аннексин V обычно используется для выявления апоптотических клеток по их способности связываться с фосфатидилсерином на наружном слое плазматической мембраны, что является ранним индикатором того, что клетка подвергается процессу апоптоза.

Используемый в данном документе термин "связывается с иммобилизованным CD137" относится к способности человеческого антитела по настоящему изобретению связываться с CD137, например, экспрессируемым на поверхности клетки или прикрепленным к твердой подложке.

Используемый в данном документе термин "биспецифическое" или "бифункциональное антитело" относится к искусственному гибриднему антителу, имеющему две разные пары тяжелой/легкой цепей и два разных участка связывания. Биспецифические антитела можно получить с помощью разнообразных способов, включающих слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai & Lachmann, (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321; Kostelny et al., (1992) *J. Immunol.* 148:1547-1553.

Традиционно рекомбинантное продуцирование биспецифических антител основано на совместной экспрессии двух пар тяжелой цепи/легкой цепи иммуноглобулина, где две пары тяжелая цепь/легкая цепь имеют разную специфичность (Milstein and Cuello, (1983) *Nature* 305:537-539). Переменные домены антител с требуемой специфичностью связывания (сайты объединения антитело-антиген) могут быть

слиты с последовательностями константного домена иммуноглобулина. Слияние вариабельного участка тяжелой цепи предпочтительно происходит с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, включающим по меньшей мере часть шарнирного участка, CH2 и CH3. Подробнее известные в настоящее время иллюстративные способы получения биспецифических антител см., например, в Suresh et al., (1986) *Methods Enzymol.* 121:210; публикации согласно РСТ № WO 96/27011; Brennan et al., (1985) *Science* 229:81; Shalaby et al., *J. Exp. Med.* (1992) 175:217-225; Kostelny et al., (1992) *J. Immunol.* 148(5):1547-1553; Hollinger et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Gruber et al., (1994) *J. Immunol.* 152:5368 и Tutt et al., (1991) *J. Immunol.* 147:60. Биспецифические антитела также включают сшитые или гетероконъюгированные антитела. Гетероконъюгированные антитела могут быть получены с использованием любых подходящих способов сшивания. Подходящие сшивающие средства хорошо известны в данной области техники и раскрыты в патенте США № 4676980 вместе с рядом методик сшивания.

Также были описаны различные методики получения и выделения биспецифических фрагментов антител непосредственно из культуры рекомбинантных клеток. Например, биспецифические антитела были получены с использованием лейциновых "застежек". См., например, Kostelny et al. (1992) *J. Immunol.* 148(5):1547-1553. Пептиды с лейциновой "застежкой" из белков Fos и Jun можно связать с Fab'-частями двух разных антител посредством слияния генов. Гомодимеры антител можно восстановить в области шарнирного участка с образованием мономеров, а затем подвергнуть повторному окислению с образованием гетеродимеров антител. Этот способ также можно использовать для получения гомодимеров антител. Технология "диатела", описанная Hollinger et al. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6444-6448, предоставила альтернативный механизм получения биспецифических фрагментов антител. Эти фрагменты содержат вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (V_L) посредством линкера, который является слишком коротким, чтобы обеспечить возможность спаривания между двумя доменами в одной цепи. Соответственно, домены V_H и V_L одного фрагмента вынуждены спариваться с комплементарными доменами V_L и V_H другого фрагмента, за счет чего образуются два антигенсвязывающих участка. Также сообщалось о другой стратегии получения биспецифических фрагментов антител с использованием одноцепочечных димеров Fv (scFv). См., например, Gruber et al. (1994) *J. Immunol.* 152:5368. Альтернативно антитела могут быть "линейными антителами", как описано, например, в Zapata et al. (1995) *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062. Вкратце, эти антитела содержат пару тандемных сегментов Fd (V_H - C_{H1} - V_H - C_{H1}), которые образуют пару антигенсвязывающих участков. Линейные антитела могут быть биспецифическими или моноспецифическими.

Антитела с более чем двумя валентностями (например, триспецифические антитела) рассматриваются и описаны, например, в Tutt et al. (1991) *J. Immunol.* 147:60.

Настоящее изобретение также охватывает варианты форм полиспецифических антител, таких как молекулы иммуноглобулина с двойным вариабельным доменом (DVD-Ig), описанные в Wu et al. (2007) *Nat Biotechnol.* 25(11): 1290-1297. Молекулы DVD-Ig сконструированы таким образом, что два разных вариабельных домена легкой цепи (V_L) из двух разных исходных антител связаны последовательно напрямую или посредством короткого линкера с помощью метода рекомбинантной ДНК, после которых следует константный домен легкой цепи. Точно так же тяжелая цепь содержит два разных вариабельных домена тяжелой цепи (V_H), связанных последовательно, после которых следуют константный домен C_{H1} и Fc-участок. Способы получения молекул DVD-Ig из двух исходных антител дополнительно описаны, например, в публикациях согласно РСТ №№ WO 08/024188 и WO 07/024715. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело представляет собой иммуноглобулин конструкции Fab-in-Tandem, в котором вариабельный участок легкой цепи со второй специфичностью слит с вариабельным участком тяжелой цепи полного антитела. Такие антитела описаны, например, в публикации заявки на международный патент № WO 2015/103072.

Используемый в данном документе термин "раковый антиген" относится к (i) опухолеспецифическим антигенам, (ii) опухолеассоциированным антигенам, (iii) клеткам, которые экспрессируют опухолеспецифические антигены, (iv) клеткам, которые экспрессируют опухолеассоциированные антигены, (v) эмбриональным антигенам на опухолях, (vi) аутологичным опухолевым клеткам, (vii) опухолеспецифическим мембранным антигенам, (viii) опухолеассоциированным мембранным антигенам, (ix) рецепторам фактора роста, (x) лигандам фактора роста и (xi) любому другому типу антигена, или антигенпрезентирующей клетки, или материала, ассоциированного с раком.

Термин "карцинома" известен в данной области техники и относится к злокачественным опухолям эпителиальной или эндокринной ткани, включая карциномы респираторного тракта, карциномы желудочно-кишечного тракта, карциномы урогенитальной системы, карциномы яичка, карциномы молочной железы, карциномы предстательной железы, карциномы эндокринной системы и меланомы. Антитела к CD137, описанные в данном документе, можно использовать для лечения пациентов, у которых присутствует любой тип рака, включая почечную карциному или меланому, есть подозрения на их наличие или существует высокий риск развития. Иллюстративные карциномы включают карциномы, образующиеся из ткани шейки матки, легкого, предстательной железы, молочной железы, головы и шеи, толстой кишки и яичника. Термин также включает карциносаркомы, которые включают злокачественные опухоли, состоящие из карциноматозных и саркоматозных тканей. "Аденокарцинома" относится к карциноме, про-

исходящей из железистой ткани, или в которой опухолевые клетки образуют распознаваемые железистые структуры.

Используемый в данном документе термин "конкурировать", при его использовании в контексте антигенсвязывающих белков (например, иммуноглобулинов, антител или их антигенсвязывающих фрагментов), которые конкурируют за связывание с одним и тем же эпитопом, относится к взаимодействию между антигенсвязывающими белками, определяемому с помощью анализа (например, анализа конкурентного связывания; анализа перекрестной блокировки), где тестируемый антигенсвязывающий белок (например, тестируемое антитело) ингибирует (например, уменьшает или блокирует) специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка (например, эталонного антитела, такого как mAb1) с общим антигеном (например, CD137 или его фрагментом). В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, перекрестно конкурируют с mAb1 (т.е. антителом, содержащим последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей под SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно), mAb8 (т.е. антителом, содержащим последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей под SEQ ID NO: 101 и 6 соответственно) или mAb10 (т.е. антителом, содержащим последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей под SEQ ID NO: 26 и 6 соответственно).

Полипептид или аминокислотная последовательность, "полученная из" указанного полипептида или белка, имеет то же происхождение, что и данный полипептид. Предпочтительно полипептид или аминокислотная последовательность, которая получена из конкретной последовательности, имеет аминокислотную последовательность, которая по сути идентична данной последовательности или ее части, где часть состоит из по меньшей мере 10-20 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 20-30 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 30-50 аминокислот, или иным образом может быть идентифицирована специалистом в данной области техники как имеющая происхождение из данной последовательности. Полипептиды, полученные из другого пептида, могут иметь одну или более мутаций относительно исходного полипептида, например, один или более аминокислотных остатков, которые были замещены другим аминокислотным остатком, или одну или более вставок или делеций аминокислотных остатков.

Полипептид может содержать аминокислотную последовательность, которая не встречается в природе. Такие варианты обязательно характеризуются идентичностью менее 100% или сходством последовательности с исходной молекулой. В определенных вариантах осуществления данный вариант будет иметь аминокислотную последовательность, характеризующуюся от приблизительно 75% до менее 100% идентичностью или сходством аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью исходного полипептида, более предпочтительно от приблизительно 80% до менее 100%, более предпочтительно от приблизительно 85% до менее 100%, более предпочтительно от приблизительно 90% до менее 100% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) и более предпочтительно от приблизительно 95% до менее 100%, например, по длине вариантной молекулы.

В определенных вариантах осуществления имеется различие в одной аминокислоте между последовательностью исходного полипептида и полученной из нее последовательностью. Идентичность или сходство в отношении этой последовательности определяется в данном документе как процентная доля аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны (т.е. один и тот же остаток) исходным аминокислотным остаткам после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если это необходимо, с целью достижения максимальной процентной идентичности последовательностей. В определенных вариантах осуществления полипептид состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из последовательности, представленной в табл. 3 или табл. 4, по сути состоит из нее или содержит ее. В определенных вариантах осуществления полипептид включает аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из последовательности, представленной в табл. 3 или табл. 4. В определенных вариантах осуществления полипептид включает непрерывную аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична непрерывной аминокислотной последовательности, выбранной из последовательности, представленной в табл. 3 или табл. 4. В определенных вариантах осуществления полипептид включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400 или 500 (или любое целое число в пределах этих чисел) смежных аминокислот из аминокислотной последовательности, выбранной из последовательности, представленной в табл. 3 или табл. 4.

В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению кодируются нуклеотидной последовательностью. Нуклеотидные последовательности по настоящему изобретению могут использоваться для ряда вариантов применения, включая клонирование, генную терапию, экспрессию и очистку белка, введение мутации, ДНК-вакцинацию нуждающегося в этом хозяина, получение антител, например для пассивной иммунизации, ПЦР, получение праймеров и зондов и им подобное. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательности, представленной в табл. 3

или табл. 4, состоит из нее или по сути состоит из нее. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность включает нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из последовательности, представленной в табл. 3 или табл. 4. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность включает непрерывную нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична непрерывной нуклеотидной последовательности, выбранной из последовательности, представленной в табл. 3 или табл. 4. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность включает нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400 или 500 (или любое целое число в пределах этих чисел) смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности, выбранной из последовательности, представленной в табл. 3 или табл. 4.

Специалисту в данной области техники также будет понятно, что антитела, подходящие для применения в способах, раскрытых в данном документе, могут быть изменены таким образом, что они отличаются по последовательности от встречающихся в природе или нативных последовательностей, из которых они были получены, при сохранении требуемой активности нативных последовательностей. Например, могут быть проведены нуклеотидные или аминокислотные замены, результатом которых являются консервативные замены или изменения в "несущественных" аминокислотных остатках. Мутации можно вводить посредством стандартных методик, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез.

Антитела, подходящие для применения в способах, раскрытых в данном документе, могут содержать консервативные аминокислотные замены в одном или более аминокислотных остатках, например, в существенных или несущественных аминокислотных остатках. "Консервативные аминокислотные замены" представляют собой замены, при которых аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, были определены в данной области техники, в том числе аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, несущественный аминокислотный остаток в связывающем полипептиде предпочтительно заменяют другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. В определенных вариантах осуществления нить из аминокислот можно подвергнуть замещению структурно сходной нитью, которая отличается порядком расположения и/или составом представителей семейства боковых цепей. Альтернативно в определенных вариантах осуществления мутации можно вводить случайным образом по всей или в части кодирующей последовательности, например, с помощью насыщающего мутагенеза, и при этом полученные в результате мутанты можно включать в связывающие полипептиды по настоящему изобретению и подвергать их скринингу в отношении способности связываться с требуемой мишенью.

Используемый в данном документе термин "перекрестная презентация" антигена относится к презентации экзогенных белковых антигенов Т-клеткам с помощью молекул МНС класса I и класса II на APC.

Используемый в данном документе термин "вступает в перекрестную реакцию" относится к способности антитела по настоящему изобретению связываться с CD137 другого вида. Например, антитело по настоящему изобретению, которое связывает CD137 человека, может также связывать другой вид CD137. Используемую в данном документе перекрестную реактивность измеряют путем определения специфической реактивности с очищенным антигеном в анализах связывания (например, SPR, ELISA) или при связывании или иным образом функциональном взаимодействии с клетками, физиологически экспрессирующими CD137. Способы определения перекрестной реактивности включают стандартные анализы связывания, описанные в данном документе, например, с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) Biacore™ с использованием прибора Biacore™ 2000 SPR (Biacore AB, Упсала, Швеция) или методик проточной цитометрии.

Используемый в данном документе термин "ответ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL)" относится к иммунному ответу, индуцированному цитотоксическими Т-клетками. Ответы CTL опосредуются в основном CD8⁺ Т-клетками.

Используемый в данном документе термин "димеризация" относится к образованию макромолекулярного комплекса двумя, обычно нековалентно связанными макромолекулами, такими как белки или мультимеры белков. Гомодимеризация относится к процессу димеризации, когда макромолекулы (например, белки) идентичны по природе. Гетеродимеризация относится к процессу димеризации, когда макромолекулы (например, белки) не идентичны по природе. Способы определения димеризации из-

вестны специалисту в данной области техники. Например, такие способы включают без ограничения дрожжевой двухгибридный анализ, резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), резонансный перенос энергии биоломинесценции (BRET), масс-спектрометрию белков, способы на основе затухающих волн, эксклюзионную хроматографию, аналитическое ультрацентрифугирование, методы рассеяния, ЯМР-спектроскопию, изотермическую титрационную калориметрию, флуоресцентную анизотропию, флуоресцентную корреляционную спектроскопию (FCS), восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания (FRAP), бесконтактную визуализацию (PRIM) и бимолекулярную комплементацию флуоресценции (BiFC) (см., например, Gell D.A., Grant R.P., Mackay J.P. (2012) The Detection and Quantitation of Protein Oligomerization. In: Matthews J.M. (eds) Protein Dimerization and Oligomerization in Biology. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 747. Springer, New York, NY; и Xie, Q. et al. Methods Mol Biol, 2011; 680: 3-28).

Используемый в данном документе термин "димеризация CD137" относится к димеризации двух тримеров CD137. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, индуцируют или повышают димеризацию CD137. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, индуцируют или повышают димеризацию CD137 относительно величины димеризации в отсутствие антитела-агониста к CD137. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, индуцируют или повышают димеризацию CD137 относительно величины димеризации в присутствии эталонного антитела-агониста к CD137. В некоторых вариантах осуществления димеризация увеличивается на по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%.

Используемый в данном документе термин "EC₅₀" относится к концентрации антитела или его антигенсвязывающей части, которые индуцирует ответ в анализе *in vitro*, или *in vivo*, который составляет 50% от максимального ответа, т.е. половину между максимальным ответом и исходным уровнем.

Используемый в данном документе термин "эффективная доза" или "эффективная дозировка" определяется как количество, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения требуемого эффекта. Термин "терапевтически эффективная доза" определяется как количество, достаточное для излечения или по меньшей мере частичной остановки заболевания и его осложнений у пациента, уже страдающего данным заболеванием. Количество, эффективное для этого применения, будет зависеть от тяжести нарушения, которое подвергают лечению, и общего состояния собственной иммунной системы пациента.

Используемый в данном документе термин "эпитоп" или "антигенная детерминанта" относится к детерминанте или участку на антигене (например, CD137), с которым специфически связывается антигенсвязывающий белок (например, иммуноглобулин, антитело или антигенсвязывающий фрагмент). Эпитопы белковых антигенов можно разграничить на "линейные эпитопы" и "конформационные эпитопы". Используемый в данном документе термин "линейный эпитоп" относится к эпитопу, образованному из непрерывной линейной последовательности связанных аминокислот. Линейные эпитопы белковых антигенов обычно сохраняются при воздействии химических денатурирующих средств (например, кислот, оснований, растворителей, сшивающих реагентов, хаотропных средств, средств, восстанавливающих дисульфидную связь) или физических денатурирующих средств (например, теплового нагревания, ионизирующего излучения или механического сдвига или напряжения). В некоторых вариантах осуществления эпитоп является нелинейным, также называемым прерывистым эпитопом. Используемый в данном документе термин "конформационный эпитоп" или "нелинейный эпитоп" относится к эпитопу, образованному из несмежных аминокислот, располагающихся рядом за счет укладки в третичную структуру полипептида. Конформационные эпитопы обычно утрачиваются при обработке денатурирующими средствами. Как правило, эпитоп включает по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. В некоторых вариантах осуществления эпитоп включает менее 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Обычно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфичные для конкретной молекулы-мишени, будет предпочтительно распознаваться специфическим эпитопом на молекуле-мишени и связываться с ним в сложной смеси белков и/или макромолекул. В некоторых вариантах осуществления эпитоп не включает все аминокислоты внеклеточного домена CD137 человека.

Настоящим изобретением также охвачены антитела, которые связываются с эпитопом на CD137, который содержит весь эпитоп, распознаваемый конкретными антителами, или его часть, описанными в данном документе (например, такой же или перекрывающийся участок или участок в промежутке или охватывающий данный участок).

Используемый в данном документе термин "картирование эпитопа" относится к процессу или способу идентификации сайта связывания или эпитопа антитела или его антигенсвязывающего фрагмента на его целевом белковом антигене. Способы и методики картирования эпитопов представлены в данном документе.

Используемый в данном документе термин "CD137" относится к конкретному представителю се-

мейства трансмембранных белков-рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR). Альтернативные названия и аббревиатуры для CD137 в данной области техники включают "представитель 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли" (TNFRSF9), 4-1BB и "индуцированный активацией лимфоцитов" (ILA) (Alderson et al., (1994) Eur J Immunol 24(9):2219-2227; Schwarz et al., (1993) Gene 134(2):295-298). Иллюстративная аминокислотная последовательность полноразмерного CD137 человека, включая лидерный, трансмембранный и цитоплазматический домены, представлена в табл. 4 (SEQ ID NO: 3) и здесь:

```
MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQCSPCPPNSFSSA
GGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTK
KGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSV
TPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMR
PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL.
```

Используемый в данном документе термин "CD137L" или "лиганд CD137" относится к представителю семейства трансмембранных белков фактора некроза опухоли (TNF). Альтернативные названия и аббревиатуры для CD137L в данной области техники включают "представитель 9 суперсемейства фактора некроза опухоли" (TNFSF9) и лиганд 4-1BB (4-1BBL) (Alderson et al., (1994) Eur J Immunol 24(9):2219-2227). Иллюстративная аминокислотная последовательность полноразмерного CD137L приведена в табл. 4 (SEQ ID NO: 97).

Используемые в данном документе термины "Fc-опосредованные эффекторные функции" или "Fc-эффекторные функции" относятся к видам биологической активности антитела, отличным от основной функции и назначения антитела. Например, эффекторными функциями терапевтического антитела-агониста являются виды биологической активности, отличные от активации целевого белка или пути. Примеры эффекторных функций антитела включают связывание C1q и комплемент-зависимую цитотоксичность; связывание с Fc-рецептором; антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; супрессию рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора); недостаточную активацию тромбоцитов, которые экспрессируют Fc-рецептор; и активацию B-клеток. Многие эффекторные функции начинаются со связывания Fc с Fcγ-рецептором.

Используемый в данном документе термин "Fc-рецептор" относится к полипептиду, обнаруженному на поверхности иммунных эффекторных клеток, который связан с Fc-участком антитела. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой Fcγ-рецептор. Существует три подкласса Fcγ-рецепторов, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16). IgG всех четырех изотипов (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) связывает и активирует Fc-рецепторы FcγRI, FcγRIIA и FcγRIIIA. FcγRIIB представляет собой ингибиторный рецептор, и, следовательно, связывание антитела с этим рецептором не активирует комплемент и клеточные ответы. FcγRI является высокоаффинным рецептором, который связывается с IgG в мономерной форме, тогда как FcγRIIA и FcγRIIIA представляют собой низкоаффинные рецепторы, которые связывают IgG только в мультимерной форме и имеют несколько более низкую аффинность. Связывание антитела с Fc-рецептором и/или C1q регулируется специфическими остатками или доменами внутри Fc-участков. Связывание также зависит от остатков, расположенных внутри шарнирных участков и внутри C_H2-части антитела. В некоторых вариантах осуществления агонистическая и/или терапевтическая активность антител, описанных в данном документе, зависит от связывания Fc-участка с Fc-рецептором (например, FcγR). В некоторых вариантах осуществления агонистическая и/или терапевтическая активность антител, описанных в данном документе, повышается при связывании Fc-участка с Fc-рецептором (например, FcγR).

Используемый в данном документе термин "профиль гликозилирования" определяется как профиль углеводных фрагментов, которые ковалентно связаны с белком, более конкретно с иммуноглобулиновым белком. Профиль гликозилирования гетерологичного антитела можно охарактеризовать как по сути сходный с профилями гликозилирования, которые в природе встречаются на антителах, продуцируемых видом трансгенного животного, отличного от человека, если специалист в данной области техники распознает профиль гликозилирования гетерологичного антитела, как являющийся более сходным с указанным профилем гликозилирования у вида трансгенного животного, отличного от человека, чем у вида, от которого получены гены C_H трансгена.

Используемый в данном документе термин "гемобластоз" включает лимфому, лейкоз, миелому или лимфоидное злокачественное новообразование, а также рак селезенки и лимфатических узлов. Иллюстративные лимфомы включают как B-клеточные лимфомы (B-клеточный гемобластоз), так и T-клеточные лимфомы. B-клеточные лимфомы включают как лимфомы Ходжкина, так и большинство неходжкинских лимфом. Неограничивающие примеры B-клеточных лимфом включают диффузную крупноклеточную B-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (совпадает с хроническим лимфоцитарным лейкозом), лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), лимфому Беркитта, медиастинальную крупноклеточную B-клеточную лимфому, макроглобулинемию Вальденстрема, узловую B-клеточную лимфому из клеток краевой зоны,

лимфому из клеток краевой зоны селезенки, внутрисосудистую крупноклеточную В-клеточную лимфому, первичную эффузионную лимфому, лимфогрануломатоз. Неограничивающие примеры Т-клеточных лимфом включают внеузловую Т-клеточную лимфому, кожную Т-клеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому и ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому. Гемобласты также включают лейкоз, такой как без ограничения вторичный лейкоз, хронический лимфолейкоз, острый миелогенный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз и острый лимфобластный лейкоз. Гемобласты дополнительно включают миеломы, такие как без ограничения множественная миелома и вялотекущая множественная миелома. Другие гематологические и/или ассоциированные с В-клетками или Т-клетками формы рака охватываются термином гемобласты.

Используемый в данном документе термин "человеческое антитело" включает антитела, имеющие переменные и константные участки (если они присутствуют) последовательностей иммуноглобулина зародышевого типа человека. Человеческие антитела по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевого типа человека (например, мутации, вводимые случайным или сайт-специфичным мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*) (см., например, Lonberg et al., (1994) *Nature* 368(6474): 856-859); Lonberg, (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg & Huszar, (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 и Harding & Lonberg, (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). Однако термин "человеческое антитело" не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающего, например мыши, привиты на последовательности каркасных участков человека (т.е. гуманизированные антитела).

Используемый в данном документе термин "гетерологичное антитело" определяется в связи с трансгенным организмом, не являющимся человеком, продуцирующим такое антитело. Этот термин относится к антителу, имеющему аминокислотную последовательность или кодируемую последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующей последовательности, выявленной в организме, не совпадающей с трансгенным животным, не являющимся человеком, и, как правило, полученной от вида, отличного от вида трансгенного животного, не являющегося человеком.

Термины "индуцирование иммунного ответа" и "повышение иммунного ответа" используются взаимозаменяемо и относятся к стимуляции иммунного ответа (т.е. пассивного или адаптивного) на конкретный антиген. Термин "индуцировать", используемый в отношении индуцирования CDC или ADCC, относится к стимуляции конкретных механизмов прямого уничтожения клеток.

Используемый в данном документе термин субъект, "нуждающийся в предупреждении", "нуждающийся в лечении" или "нуждающийся в этом", относится к субъекту, который по решению соответствующего врача (например, врача, медсестры или практикующей медсестры в случае людей; ветеринара в случае млекопитающих, не являющихся людьми) получит достаточную пользу от данного лечения (такого как лечение композицией, содержащей антитело к CD137).

Термин "in vivo" относится к процессам, которые происходят в живом организме.

Используемый в данном документе термин "выделенное антитело" предназначен для обозначения антитела, которое по сути не содержит других антител с иной антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с CD137 человека, по сути не содержит антител, которые специфически связывают антигены, отличные от CD137). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом, может характеризоваться перекрестной реактивностью в отношении других белков CD137 от других видов. Однако антитело продолжает демонстрировать специфическое связывание с CD137 человека в анализе специфического связывания, который описан в данном документе. Кроме того, выделенное антитело, как правило, по сути не содержит другого клеточного материала и/или химических веществ. В некоторых вариантах осуществления комбинацию "выделенных" антител, имеющих различную специфичность в отношении CD137, объединяют в четко определенной композиции.

Используемый в данном документе термин "выделенная молекула нуклеиновой кислоты", относящийся к нуклеиновым кислотам, кодирующим антитела или части антител (например, V_H, V_L, CDR3), которые связываются с CD137, предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, в которой нуклеотидные последовательности, кодирующие антитело или часть антитела, не содержат других нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитела или части антител, которые связывают антигены, отличные от CD137, причем эти другие последовательности могут естественным образом фланкировать нуклеиновую кислоту в геномной ДНК человека. Например, последовательность, выбранная из последовательности, представленной в табл. 3 или табл. 4, соответствует нуклеотидным последовательностям, содержащим переменные участки тяжелой цепи (V_H) и легкой цепи (V_L) моноклональных антител к CD137, описанных в данном документе.

Используемый в данном документе термин "изотип" относится к классу антител (например, IgM или IgG1), который кодируется генами константного участка тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления человеческое моноклональное антитело по настоящему изобретению имеет изотип IgG1. В некоторых вариантах осуществления человеческое моноклональное антитело по настоящему изобретению имеет изотип IgG1 и содержит мутацию. В некоторых вариантах осуществления человеческое мо-

ноклональное антитело по настоящему изобретению имеет изотип IgG2. В некоторых вариантах осуществления человеческое моноклональное антитело по настоящему изобретению имеет изотип IgG3. В некоторых вариантах осуществления человеческое моноклональное антитело по настоящему изобретению имеет изотип IgG4. В некоторых вариантах осуществления человеческое моноклональное антитело по настоящему изобретению имеет изотип IgG4 и содержит мутацию. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой замену по Ser228. В некоторых вариантах осуществления замена по Ser228 представляет собой S228P.

Используемый в данном документе термин "переключение изотипа" относится к явлению, посредством которого класс или изотип антитела изменяется с одного класса Ig на другой класс Ig.

Используемый в данном документе термин "KD" или "K_D" относится к равновесной константе диссоциации реакции связывания антитела и антигена. Значение K_D является числовым представлением соотношения константы скорости диссоциации антитела (K_D) и константы скорости ассоциации антитела (k_a). Значение K_D обратно пропорционально аффинности связывания антитела с антигеном. Чем меньше значение K_D, тем больше аффинность антитела к его антигену. Аффинность представляет собой силу связывания отдельной молекулы с ее лигандом, которая обычно измеряется и выражается равновесной константой диссоциации (K_D), которую используют для оценки и ранжирования сил бимолекулярных взаимодействий.

Используемый в данном документе термин "kd" или "k_d" (альтернативно "koff" или "k_{off}") предназначен для обозначения константы скорости диссоциации антитела из комплекса антитело/антиген. Значение kd является числовым представлением доли комплексов, которые распадаются или диссоциируют в секунду, и выражается в единицах с⁻¹.

Используемый в данном документе термин "ka" или "k_a" (альтернативно "kon" или "k_{on}") предназначен для обозначения константы скорости ассоциации антитела с антигеном. Значение ka является числовым представлением количества комплексов антитело/антиген, образующихся в секунду в 1-молярном (1 M) растворе антитела и антигена, и выражается в единицах M⁻¹s⁻¹.

Используемые в данном документе термины "связан", "слит" или "слияние", задействованы взаимозаменяемо. Эти термины относятся к объединению больше двух элементов, или компонентов, или доменов любыми средствами, включая химическую конъюгацию или средства рекомбинации. Способы химической конъюгации (например, с использованием гетеробифункциональных сшивающих средств) известны в данной области техники.

Используемый в данном документе термин "местное введение" или "местная доставка" относится к доставке, которая не зависит от транспорта композиции или средства к предполагаемым целевым тканям или сайту посредством сосудистой системы. Например, композицию можно доставить путем инъекции или имплантации композиции или средства или путем инъекции или имплантации устройства, содержащего композицию или средство. После местного введения рядом с целевыми тканями или сайтом композиция или средство или один или более их компонентов могут диффундировать в требуемые целевые ткани или сайт.

Используемый в данном документе термин "молекулы МНС" относится к двум типам молекул, МНС класса I и МНС класса II. Молекулы МНС класса I презентуют антиген специфическим CD8⁺ Т-клеткам, а молекулы МНС класса II презентуют антиген специфическим CD4⁺ Т-клеткам. Антигены, доставляемые к APC экзогенно, процессируются главным образом с целью ассоциации с МНС класса II. В отличие от этого, антигены, доставляемые к APC эндогенно, процессируются главным образом с целью ассоциации с МНС класса I.

Используемый в данном документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, которое проявляет единственную специфичность связывания и аффинность по отношению к конкретному эпитопу. Соответственно, термин "человеческое моноклональное антитело" относится к антителу, которое проявляет единственную специфичность связывания и которое содержит вариабельные и необязательные константные участки, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевого типа человека. В некоторых вариантах осуществления человеческие моноклональные антитела продуцируются гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного животного, не являющегося человеком, например, трансгенной мышью, имеющей геном, содержащий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи человека, слитую с иммортализованной клеткой.

Используемый в данном документе термин "мультивмеризация" относится к образованию макромолекулярного комплекса, содержащего более двух макромолекул, таких как белки, обычно связанных нековалентными взаимодействиями. Способы определения мультивмеризации известны специалистам в данной области техники и описаны выше для димеризации. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, индуцируют или повышают мультивмеризацию CD137. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, индуцируют или повышают мультивмеризацию CD137 относительно величины мультивмеризации в отсутствие антитела-агониста к CD137. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, индуцируют или повышают мультивмеризацию CD137 относительно величины мультивмеризации в присутствии эталонного антитела-агониста к CD137. В некоторых

вариантах осуществления мультимеризация увеличивается на по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%.

Используемый в данном документе термин "встречающийся в природе" применительно к объекту относится к тому факту, что объект можно обнаружить в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая вирусы), которую можно выделить из источника в природе и которая не была преднамеренно изменена человеком в лаборатории, является встречающейся в природе.

Используемый в данном документе термин "непереключенный изотип" относится к изотипическому классу тяжелой цепи, который образуется тогда, когда не происходит переключения изотипа; ген СН, кодирующий непереключенный изотип, как правило является первым геном СН, расположенным сразу после функционально перестроенного гена VDJ. Переключение изотипа классифицируется как классическое или неклассическое переключение изотипа. Классическое переключение изотипа происходит за счет событий рекомбинации, которые задействуют по меньшей мере один участок последовательности переключения в трансгене. Неклассическое переключение изотипа может происходить, например, путем гомологичной рекомбинации между σ_{μ} человека и Σ_{μ} человека (δ -ассоциированная делеция). Альтернативные неклассические механизмы переключения, такие как среди прочего межтрансгенная и/или межхромосомная рекомбинация, могут иметь место и приводить к переключению изотипа.

Используемый в данном документе термин "нуклеиновая кислота" относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам в одно- или двухнитевой форме. Если не ограничено конкретно, то термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают свойствами связывания, подобными свойствам эталонной нуклеиновой кислоты, и метаболизируются способом, подобным встречающимся в природе нуклеотидам. Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также неявно охватывает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, как и конкретно указанную последовательность. В частности, замены вырожденными кодонами могут быть осуществлены посредством создания последовательностей, в которых третье положение в одном или более выбранных (или во всех) кодонах заменено любым из канонических нуклеозидов и/или дезоксиинозиновыми остатками (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081, 1991; Ohtsuka et al., *Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985; и Cassol et al., 1992; Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98, 1994). В случае аргинина и лейцина модификации во втором основании также могут быть консервативными. Термин нуклеиновая кислота используется взаимозаменяемо с геном, кДНК и мРНК, кодируемой геном.

Используемые в данном документе полинуклеотиды могут состоять из любого полирибонуклеотида или полидезоксирибонуклеотида, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. Например, полинуклеотиды могут состоять из одно- и двухнитевой ДНК, ДНК, которая представляет собой смесь одно- и двухнитевых участков, одно- и двухнитевой РНК и РНК, которая представляет собой смесь одно- и двухнитевых участков, гибридных молекул, содержащих ДНК и РНК, которые могут быть однонитевыми или, что более типично, двухнитевыми или смесью однонитевых и двухнитевых участков. Кроме того, полинуклеотид может состоять из трехнитевых участков, включающих РНК или ДНК или одновременно РНК и ДНК. Полинуклеотид также может содержать одно или более модифицированных оснований или остовы ДНК или РНК, модифицированные с целью стабильности или по другим причинам. "Модифицированные" основания включают, например, тритилированные основания и нетипичные основания, такие как инозин. Различные модификации можно вносить в ДНК и РНК; таким образом, "полинуклеотид" охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы.

Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", когда она находится в функциональной связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности. Что касается регуляторных последовательностей транскрипции, то "функционально связанный" означает, что последовательности ДНК, являющиеся связанными, являются смежными и там, где это необходимо, соединяют два участка, кодирующих белки, смежные и в рамке считывания. В случае последовательностей переключения функционально связанный означает, что последовательности способны осуществлять рекомбинацию на стадии переключения.

Используемый в данном документе термин "паратоп", а также "антигенсвязывающий участок" относятся к части антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которая распознает и связывается с эпитопом на антигене, содержащей набор участков, определяющих комплементарность (CDR), расположенных внутри вариабельных участков тяжелой и легкой цепей.

Используемый в данном документе термин "парентеральное введение", "вводимый парентерально" и другие грамматически эквивалентные фразы относятся к способам введения, отличным от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают без ограничения внутривенную, интраназальную, внутриглазную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспиналь-

ную, эпидуральную, интрацеребральную, внутрочерепную, интракаротидную и интратеральную инъекцию и инфузию.

Используемый в данном документе термин "пациент" включает людей и других млекопитающих, которые получают лечение либо с целью профилактики, либо с целью терапии.

Термин "процент идентичности" в контексте двух или более последовательностей нуклеиновой кислоты или полипептида относится к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые имеют определенное процентное содержание нуклеотидов или аминокислотных остатков, являющихся одинаковыми, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, что измерено с использованием одного из алгоритмов сравнения последовательностей, описанных ниже (например, BLASTP и BLASTN или других алгоритмов, доступных специалистам) или путем визуального осмотра. В зависимости от применения "процент идентичности" может иметь место в участке сравниваемой последовательности, например, в функциональном домене, или альтернативно может иметь место по всей длине двух последовательностей, подлежащих сравнению. При сравнении последовательностей одна последовательность обычно выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестируемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, если это необходимо, задают координаты подпоследовательностей, и устанавливают программные параметры алгоритма для анализа последовательностей. Затем алгоритм сравнения последовательностей вычисляет значение процента идентичности последовательностей для тестируемой последовательности (последовательностей) относительно эталонной последовательности, исходя из установленных программных параметров.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма поиска локальной гомологии согласно Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), с помощью алгоритма выравнивания участков гомологии согласно Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), с помощью способа поиска сходства согласно Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), с помощью программной реализации данных алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA из Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Мадисон, Висконсин) или с помощью визуального осмотра (см. в целом Ausubel et al., ниже).

Одним из примеров алгоритма, который подходит для определения процента идентичности последовательности и сходства последовательности, является алгоритм BLAST, который описан в Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). Программное обеспечение для проведения анализов BLAST является общедоступным на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации.

Как в основном используется в данном документе, "фармацевтически приемлемый" относится к тем соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые в по результатам тщательной медицинской оценки подходят для применения в контакте с тканями, органами и/или физиологическими жидкостями организма людей и животных без чрезмерных токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соизмеримых с обоснованным соотношением выгоды/риска.

Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится и включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства и им подобные, которые являются физиологически совместимыми. Композиции могут включать фармацевтически приемлемую соль, например соль присоединения кислоты или соль присоединения основания (см., например, Berge et al. (1977) *J Pharm Sci* 66:1-19).

Используемые в данном документе термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются взаимозаменяемо и относятся к полимеру из аминокислотных остатков. Эти термины применимы к аминокислотным полимерам, в которых один или более аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к встречающимся в природе аминокислотным полимерам и не встречающемуся в природе аминокислотному полимеру.

Используемый в данном документе термин "предупреждение" при его использовании в отношении состояния относится к введению композиции, которая уменьшает частоту возникновения или замедляет возникновение симптомов патологического состояния у субъекта по сравнению с субъектом, который не получает композицию.

Используемый в данном документе термин "очищенный" или "выделенный" применительно к любому из белков (антител или фрагментов), описанных в данном документе, относится к полипептиду, который был отделен или очищен от компонентов (например, белков или других встречающихся в природе биологических или органических молекул), которые естественным образом сопровождают его, например, другие белки, липиды и нуклеиновые кислоты в прокариоте, экспрессирующем белки. Обычно полипептид является очищенным, когда его содержание составляет по меньшей мере 60 (например, по меньшей мере 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 97 или 99) % по весу от общего белка в образце.

Используемый в данном документе термин "перестроенный" относится к конфигурации локуса иммуноглобулина тяжелой цепи или легкой цепи, где V-сегмент расположен непосредственно рядом с D-J

или J-сегментом в конформации, кодирующей, по сути, полный домен V_H или V_L соответственно. Перестроенный локус гена иммуноглобулина можно идентифицировать путем сравнения с ДНК линии зародышевого типа; перестроенный локус будет иметь по меньшей мере один рекомбинированный гептамерный/нонамерный элемент гомологии.

Используемый в данном документе термин "кластеризация рецепторов" относится к клеточному процессу, который приводит к группированию или местному накоплению набора рецепторов в конкретном клеточном местоположении, часто для индуцирования или усиления сигнального ответа. Многие белковые рецепторы связывают когнатные лиганды и кластеризуются, т.е. образуют димеры, тримеры, олигомеры или мультимеры при связывании их когнатных лигандов. Например, представители суперсемейства рецепторов PDGF и рецепторов TNF образуют димеры и тримеры при связывании лиганда соответственно. Кластеризация, индуцированная когнатным лигандом (например, димеризация, мультимеризация), индуцирует передачу сигнала через рецептор. Соответственно, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут активировать рецептор путем связывания с более чем одним рецептором и индуцировать или стабилизировать димеризацию, тримеризацию и/или мультимеризацию со связыванием когнатного лиганда или без него.

Кластеризация и мультимеризация рецепторов необходимы для передачи сигналов TNFR (Wajant (2015) *Cell Death Differ* 22(11):1727-1741) и, в частности, для активации TNFRSF. 4-1BB (CD137), CD40, GITR, CD27, DR3, DR5 и Fas являются некоторыми из рецепторов TNFRSF, которые, как известно, требуют кластеризации для запуска передачи нисходящих сигналов. Экспериментальное доказательство того, что рецептор 4-1BB должен быть сшит для передачи сигнала, исходит от Rabu et al. Эти авторы сообщили, что 1-тримерная форма человеческого 4-1BBL не оказывает активирующего воздействия на Т-клетки человека, тогда как сшивание белка в 2 или более тримеров приводит к образованию сильно активирующего белка (Rabu et al., (2005) *J Biol Chem* 280:41472-41481). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антитело-агонист к CD137 индуцирует мультимеризацию 2 или более тримеров CD137.

Используемый в данном документе термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") предназначен для обозначения клетки, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только конкретного клетки-субъекта, но и потомства такой клетки. Поскольку определенные модификации могут возникать в последующих поколениях из-за мутации или влияния окружающей среды, такое потомство может не быть по сути идентичным родительской клетке, но все же включено в объем термина "клетка-хозяин", используемого в данном документе.

Используемый в данном документе термин "рекомбинантное человеческое антитело" включает все человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют посредством рекомбинантных способов, таких как (а) антитела, выделенные у животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным по генам иммуноглобулина человека, или из гибридомы, полученной из него, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной с целью экспрессии антитела, например, из трансфектомы, (с) антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные посредством любых других способов, которые включают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат переменные и константные участки, в которых используются конкретные последовательности иммуноглобулина зародышевого типа человека, кодируемые генами зародышевого типа, но включают последующие перестройки и мутации, которые возникают, например, в ходе созревания антитела. В данной области техники известно (см., например, Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23(9): 1117-1125), что переменный участок содержит антигенсвязывающий домен, который кодируется разными генами, которые перестраиваются с образованием антитела, специфичного в отношении чужеродного антигена. В дополнение к перестройке переменный участок можно дополнительно модифицировать за счет множества единичных изменений аминокислот (называемых соматической мутацией или гипермутацией) для увеличения аффинности антитела к чужеродному антигену. Константный участок будет изменяться при дальнейшем ответе на антиген (т.е. переключение изотипа). Следовательно, у перестроенных и соматически мутированных молекул нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи иммуноглобулина в ответ на антиген, может отсутствовать идентичность последовательности с исходными молекулами нуклеиновой кислоты, но вместо этого они будут по сути идентичными или подобными (т.е. характеризоваться по меньшей мере 80% идентичностью).

Используемый в данном документе термин "эталонное антитело" (используемый взаимозаменяемо с "эталонным mAb") или "эталонный антигенсвязывающий белок" относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются со специфическим эпитопом на CD137 человека и используются для установления взаимоотношения между собой и одним или более отличающимися антителами. В некоторых вариантах осуществления взаимоотношение представляет собой связывание эталонного антитела и одного или более отличающихся антител с одним и тем же эпитопом на CD137. Используемый в данном документе термин обозначает антитело к CD137, которое применимо в тесте или анализе, таких, которые описаны в данном документе (например, анализ конкурентного связывания), в

качестве конкурирующего средства, где анализ применим для выявления, идентификации или разработки одного или более разных антител, которые связываются с одним и тем же эпитопом. Аминокислотные последовательности переменного участка тяжелой (V_H) и легкой (V_L) цепей иллюстративного эталонного антитела (mAb1) представлены в табл. 4 (V_{H1} , SEQ ID NO: 4; V_{H2} , SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления этот термин подразумевает антитело к CD137, которое применимо в тесте или анализе в качестве препарата сравнения, где анализ применяется для различения характеристик антител (например, гепатотоксичности, противоопухолевой эффективности). В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело представляет собой урелумаб. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело представляет собой утомилумаб.

Используемые в данном документе термины "специфическое связывание", "селективное связывание", "селективно связывает" и "специфически связывает" относятся к связыванию антитела с эпитопом на предварительно определенном антигене. Как правило, антитело связывается с равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей примерно менее 10^{-6} М, например, примерно менее 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже ниже, что определено с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIACORE 2000 с использованием рекомбинантного CD137 человека в качестве аналита и антитела в качестве лиганда, и связывается с предварительно определенным антигеном с аффинностью, которая в по меньшей мере два раза превышает его аффинность связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеин), отличным от предварительно определенного антигена, или близкородственным антигеном. Фразы "антитело, распознающее антиген" и "антитело, специфичное к антигену" используются в данном документе взаимозаменяемо с термином "антитело, которое специфически связывается с антигеном".

Используемый в данном документе термин "последовательность переключения" относится к тем последовательностям ДНК, которые отвечают за рекомбинацию на стадии переключения. Последовательность "донора для переключения", как правило, μ -участок для переключения, будет располагаться в направлении 5' (т.е. выше) относительно участка конструкции, подлежащего удалению в ходе рекомбинации на стадии переключения. Участок "акцептора для переключения" будет располагаться между участком конструкции, подлежащим удалению, и константным участком для замены (например, γ , ϵ и т.д.). Поскольку нет конкретного сайта, где всегда происходит рекомбинация, конечную последовательность гена, как правило, нельзя предсказать исходя из конструкции.

Используемый в данном документе термин "субъект" включает любого человека или животное, не являющееся человеком. Например, способы и композиции по настоящему изобретению можно использовать для лечения субъекта с иммунным нарушением. Термин "животное, не являющееся человеком" включает всех позвоночных животных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как приматы, отличные от человека, овца, собака, корова, цыплята, земноводные, рептилии и т.д.

В случае нуклеиновых кислот термин "существенная гомология" указывает на то, что две нуклеиновые кислоты или их установленные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении идентичны с соответствующими вставками или делециями нуклеотидов в по меньшей мере приблизительно 80% нуклеотидов, обычно по меньшей мере приблизительно от 90% до 95% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно от 98% до 99,5% нуклеотидов. Альтернативно существенная гомология имеет место тогда, когда сегменты будут гибридизироваться в условиях селективной гибридизации с комплементарной нитью.

Процент идентичности двух последовательностей зависит от количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. % гомологии = # идентичных положений/всего # положений \times 100), при этом учитывается количество гэпов и длина каждого гэпа, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности двух последовательностей можно осуществлять с применением математического алгоритма, описанного в неограничивающих примерах ниже.

Процент идентичности двух нуклеотидных последовательностей можно определить с использованием программы GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступный по адресу <http://www.gcg.com>) с использованием матрицы NWSgapdna.CMP и штрафа за введение гэпа, составляющего 40, 50, 60, 70 или 80, и штрафа за продление гэпа, составляющего 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процент идентичности двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей можно определить с помощью алгоритма E. Meyers и W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за продление гэпа 12 и штрафа за введение гэпа 4. Кроме того, процент идентичности двух аминокислотных последовательностей можно определить с помощью алгоритма Нидлмана-Вунша (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в составе пакета программного обеспечения GCG (доступно по адресу <http://www.gcg.com>), с использованием либо матрицы Blossom 62, либо матрицы PAM250, а также штрафа за введение гэпа, составляющего 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, и штрафа за продление гэпа, составляющего 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Последовательности нуклеиновой кислоты и белка по настоящему изобретению можно дополни-

тельно применять в качестве "запрашиваемой последовательности" для проведения поиска в общедоступных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Такие поиски можно выполнять с использованием программ NBLAST и XBLAST (версии 2.0) от Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Поиск нуклеотидов в BLAST можно выполнять с помощью программы NBLAST, оценка=100, длина слова=12, чтобы получить нуклеотидные последовательности, гомологичные молекулам нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Поиск белка в BLAST можно выполнять с помощью программы XBLAST, оценка=50, длина слова=3, чтобы получить аминокислотные последовательности, гомологичные молекулам белка по настоящему изобретению. Для получения выравниваний с гэпами для сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию из соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). См. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или по сути чистой форме. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "оказывается по сути чистой" при очистке от других клеточных компонентов или других контаминантов, например, других клеточных нуклеиновых кислот или белков, с помощью стандартных методик, включая щелочную/SDS обработку, CsCl-бэндинг, колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие методики, хорошо известные в данной области техники. См., F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

Композиции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, хотя зачастую в нативной последовательности (за исключением модифицированных сайтов рестрикции и им подобных) из кДНК, геномной ДНК или их смесей, можно подвергнуть мутации в соответствии со стандартными методиками для получения последовательностей генов. В случае кодирующих последовательностей данные мутации могут оказывать влияние на аминокислотную последовательность, если это требуется. В частности, рассматриваются последовательности ДНК, по сути гомологичные или полученные из нативных V, D, J, константных участков, переключателей и других подобных последовательностей, описанных в данном документе (где "полученный" означает, что последовательность идентична или модифицирована из другой последовательности).

Используемый в данном документе термин "микроокружение опухоли" (альтернативно "микроокружение рака"; сокращенно ТМЕ) относится к клеточному окружению или среде, в которых существует опухоль или новообразование, включая окружающие кровеносные сосуды, а также клетки без злокачественного перерождения, включая без ограничения иммунные клетки, фибробласты, воспалительные клетки из костного мозга и лимфоциты. Сигнальные молекулы и внеклеточный матрикс также составляют ТМЕ. Опухоль и внешнее микроокружение тесно связаны и постоянно взаимодействуют. Опухоли могут влиять на микроокружение, высвобождая внеклеточные сигналы, стимулируя ангиогенез в опухоли и индуцируя периферическую иммунную толерантность, тогда как иммунные клетки в микроокружении могут влиять на рост и развитие опухолевых клеток.

Термин "Т-клетка" относится к типу лейкоцитов, которые можно отличить от других лейкоцитов по присутствию Т-клеточного рецептора на поверхности клетки. Существует несколько субпопуляций Т-клеток, включая без ограничения Т-хелперные клетки (также известные как T_H -клетки или $CD4^+$ Т-клетки) и подтипы, в том числе T_H1 -, T_H2 -, T_H3 -, T_H17 -, T_H9 - и T_{FH} -клетки, цитотоксические Т-клетки (т.е. T_C -клетки, $CD8^+$ Т-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты, Т-клетки-киллеры, киллерные Т-клетки), Т-клетки памяти и подтипы, в том числе центральные Т-клетки памяти (T_{CM} -клетки), эффекторные Т-клетки памяти (T_{EM} - и T_{EMRA} -клетки) и резидентные Т-клетки памяти (T_{RM} -клетки), регуляторные Т-клетки (также известные как T_{reg} -клетки или супрессорные Т-клетки) и подтипы, в том числе $CD4^+$ $FOXP3^+$ T_{reg} -клетки, $CD4^+$ $FOXP3^-$ T_{reg} -клетки, T_H1 -клетки, T_H3 -клетки и $T_{reg}17$ -клетки, естественные киллерные Т-клетки (также известные как НКТ-клетки), ассоциированные со слизистой оболочкой инвариантные Т-клетки (MAIT) и гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки), в том числе $V\gamma9/V\delta2$ Т-клетки. Любые одна или более из вышеупомянутых или не упомянутых Т-клеток могут быть целевыми типами клеток для способа применения по настоящему изобретению.

Используемый в данном документе термин "Т-клеточная активация" или "активация Т-клеток" относится к клеточному процессу, в котором зрелые Т-клетки, которые экспрессируют антигенспецифические Т-клеточные рецепторы на своей поверхности, распознают свои когнатные антигены и отвечают посредством вхождения в клеточный цикл, секретируя цитокины или литические ферменты и иницируя или становясь компетентными для выполнения клеточных эффекторных функций. Активация Т-клеток требует по меньшей мере двух сигналов, чтобы они стали полностью активированными. Первый возникает после вовлечения Т-клеточного антигенспецифического рецептора (TCR) при помощи антигена с главным комплексом гистосовместимости (МНС), а второй при последующем вовлечении костимуляторных молекул (например, CD28). Эти сигналы передаются в ядро и приводят к клональному размножению Т-клеток, повышению экспрессии маркеров активации на клеточной поверхности, дифференцировке в эффекторные клетки, индуцированию цитотоксичности или секреции цитокинов, индуцированию апоптоза или их комбинации.

Используемый в данном документе термин "опосредованный Т-клетками ответ" относится к любому ответу, опосредованному Т-клетками, включая без ограничения эффекторные Т-клетки (например, CD8⁺ клетки) и хелперные Т-клетки (например, CD4⁺ клетки). Ответы, опосредованные Т-клетками, включают, например, Т-клеточную цитотоксичность и пролиферацию.

Используемые в данном документе термины "терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная доза" или подобные термины, используемые в данном документе, предназначены для обозначения количества средства (например, антитела к CD137 или его антигенсвязывающего фрагмента), которое будет проявлять требуемый биологический или медицинский ответ (например, положительная динамика со стороны одного или более симптомов рака).

Термины "лечить", "проводить лечение" и "лечение", используемые в данном документе, относятся к терапевтическим или профилактическим мероприятиям, описанным в данном документе. Способы "лечения" включают введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, человеческого антитела по настоящему изобретению, например субъекту, нуждающемуся в повышенном иммунном ответе против конкретного антигена, или субъекту, у которого в перспективе может возникнуть такое нарушение, для того чтобы предотвратить, вылечить, замедлить прогрессирование, уменьшить тяжесть или ослабить один или более симптомов нарушения или рецидивирующего нарушения, или для того, чтобы продлить выживаемость субъекта сверх ожидаемого в отсутствие такого лечения.

Используемый в данном документе термин "неперестроенная" или "конфигурация зародышевого типа" относится к конфигурации, в которой V-сегмент не рекомбинирован так, чтобы быть расположенным непосредственно смежно с D- или J-сегментом.

Используемый в данном документе термин "вектор" предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Одним из типов вектора является "плазида", которая относится к кольцевой двухнитевой петле ДНК, в которую можно лигировать дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК можно лигировать в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их ввели (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и, таким образом, они реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны к управлению экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы упомянуты в данном документе как "рекомбинантные векторы экспрессии" (или проще "векторы экспрессии"). Как правило, векторы экспрессии, используемые в методиках рекомбинантной ДНК, часто представлены в форме плазмид. В настоящем описании "плазида" и "вектор" могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако настоящее изобретение предназначено для включения таких других форм векторов экспрессии, как вирусные векторы (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом обычной квалификации в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Предпочтительные способы и материалы описаны ниже, хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, также можно использовать в практическом применении или тестировании раскрытых в данном документе способов и композиций. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, включены посредством ссылки в их полном объеме.

Антитела к CD137 и их антигенсвязывающие фрагменты.

Настоящее изобретение предусматривает антитела, которые специфически связываются и выступают в качестве агонистов CD137. В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены антитела-агонисты к CD137, которые применимы в лечении рака. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137 индуцируют продуцирование цитокинов. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137 повышают количество CD8⁺ Т-клеток в микроокружении опухоли. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137 индуцируют защитный противоопухолевый иммунитет. В настоящем изобретении также представлены антитела-агонисты к CD137, которые при введении *in vivo* не приводят к существенному повышению количества внутриселезеночной или внутрипеченочной популяции CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток.

CD137 человека представляет собой трансмембранный полипептид из 255 аминокислот (SEQ ID NO: 3; номера доступа NM_001561; NP_001552) и является представителем филогенетически консервативного суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR). CD137 (альтернативно 4-1BB, представитель 9 суперсемейства TNFR) и его лиганд (CD137L) принимают участие в регуляции широкого спектра иммунных активностей. Происходит сшивание лиганда CD137 со своим рецептором, CD137, который экспрессируется на активированных Т-клетках, и стимулирует виды Т-клеточной активности. CD137 представляет собой костимуляторную молекулу, индуцируемую активацией. Недавние исследования показали, что опосредованные CD137 противораковые эффекты в значительной степени основаны

на его способности активировать Т-клетки, в частности, индуцировать ответ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) и индуцировать продуцирование цитокинов, в частности, больших количеств IFN γ (Ye et al., (2014) Clin Cancer Res 20(1):44-55). Лиганд CD137 является трансмембранным белком на клеточной поверхности и передает сигналы в клетки, на которых он экспрессируется, - явление, называемое "ответной передачей сигналов" или "обратной передачей сигналов"). Экспрессия лиганда CD137 обнаружена на большинстве типов лейкоцитов и на некоторых неиммунных клетках. В моноцитарных клетках (моноцитах, макрофагах и DC) передача сигналов лиганда CD137 индуцирует активацию, миграцию, выживаемость и дифференцировку.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления выделенное антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с CD137 и выступают в качестве его агониста и обеспечивают возможность связывания CD137L или способствует этому. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с CD137 и выступают в качестве его агониста. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, представленные в настоящем изобретении, связываются с CD137 и выступают в качестве агонистов CD137 и костимулируют активацию Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, обладает одними или более из следующих свойств или характеристик:

- специфически связываются с CD137 человека;
- связываются с CD137 человека и яванского макака, и
- связываются с CD137 человека и мыши.

В некоторых вариантах осуществления антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связывается с CD137 и костимулируют Т-клеточную активность. В некоторых вариантах осуществления антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с CD137 и индуцируют или повышают активацию Т-клеток, ответ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), пролиферацию Т-клеток, продуцирование цитокинов или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с CD137 и индуцируют или повышают активацию Т-клеток, ответ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), пролиферацию Т-клеток, продуцирование цитокинов или их комбинацию в микроокружении опухоли. В некоторых вариантах осуществления антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, не вызывают значительного индуцирования или повышения внутрипеченочной и/или внутриселезеночной активации Т-клеток и/или пролиферации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанное в данном документе, связывается с CD137 и индуцирует продуцирование IFN γ . В некоторых вариантах осуществления антитела, представленные в настоящем изобретении, связываются с CD137 и индуцируют продуцирование IL-2, TNF- α , IL-13 или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, специфически связываются с CD137 и выступают в качестве его агониста. В некоторых вариантах осуществления агонизм с CD137 измеряют путем определения концентрации цитокинов, продуцируемых иммунными клетками. Способы анализа продуцирования цитокинов известны в данной области техники и используются в "Примерах". В некоторых вариантах осуществления повышение продуцирования цитокинов иммунными клетками указывает на агонизм к CD137. В некоторых вариантах осуществления агонизм к CD137 измеряют путем анализа пролиферации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления повышение пролиферации Т-клеток указывает на агонизм к CD137. В некоторых вариантах осуществления агонизм к CD137 измеряют путем измерения уровня передачи сигналов в клетке либо посредством количественного определения фосфорилирования соответствующих молекул, либо по экспрессии репортерного гена после соответствующего промотора. В некоторых вариантах осуществления повышение передачи сигналов в клетке указывает на агонизм к CD137. В некоторых вариантах осуществления агонизм к CD137 измеряют путем измерения объема опухоли. В некоторых вариантах осуществления уменьшение объема опухоли указывает на агонизм к CD137.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, индуцируют, увеличивают или стабилизируют олигомеризацию, мультимеризацию или другую кластеризацию CD137 более высокого порядка. В некоторых вариантах осуществления кластеризацию CD137 на поверхности клетки наблюдают посредством флуоресцентной микроскопии.

В настоящем изобретении представлены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с CD137 и выступают в качестве агонистов CD137. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (i) связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ); (ii) связывают эпитоп на CD137 человека, описанный в данном документе; и/или (iii) содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность

DXXXXLXXXXYXYX (SEQ ID NO: 126).

Аффинность к CD137.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ или от приблизительно 40 нМ до приблизительно 100 нМ). В некоторых вариантах осуществления аффинность антитела к CD137 относительно CD137 человека в по меньшей мере два раза (например, в по меньшей мере три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или 10 раз) выше аффинности mAb10 к CD137 мыши. В некоторых вариантах осуществления аффинность антитела к CD137 составляет не более 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 250, 200, 175, 150, 125, 110 или 100 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность антитела к CD137 относительно CD137 человека в по меньшей мере два раза (например, в по меньшей мере три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или 10 раз) выше аффинности mAb10 к CD137 мыши, но составляет не более 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 250, 200, 175, 150, 125, 110 или 100 нМ. Аффинность антитела представляет собой силу связывания с отдельным полипептидом CD137. В некоторых вариантах осуществления аффинность выражается равновесной константой диссоциации (K_D). Значение K_D обратно пропорционально аффинности связывания антитела с антигеном. Соответственно, чем меньше значение K_D , тем больше аффинность антитела к его антигену.

Способы определения аффинности антитела к его антигену известны в данной области техники. В иллюстративном способе определения аффинности связывания используют поверхностный плазмонный резонанс. Поверхностный плазмонный резонанс представляет собой оптическое явление, которое предусматривает анализ биоспецифических взаимодействий в режиме реального времени посредством выявления изменений концентрации белков в биосенсорной матрице, например, при помощи системы BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Уппсала, Швеция и Пискатауэй, Нью-Джерси). Для дополнительного описания см. Jönsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51: 19-26; Jönsson, U., i (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8: 125-131 и Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 40-100 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-40 нМ, 40-50 нМ, 50-60 нМ, 60-70 нМ, 70-80 нМ, 80-90 нМ, 90-100 нМ, 45-55 нМ, 55-65 нМ, 75-85 нМ, 85-95 нМ, 45-95 нМ, 50-90 нМ, 55-85 нМ, 60-80 нМ, 65-75 нМ, 55-75 нМ, 40-70 нМ, 50-80 нМ или 60-90 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 60-80 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 60-75 нМ.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 60-90 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 50-80 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 40-70 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 55-75 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 65-75 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 60-80 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 55-85 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 50-90 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 45-95 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 85-95 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 75-85 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 75-85 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 55-65 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 55-

CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека, CD137 мыши и CD137 яванского макака.

Связывание эпитопа CD137

В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, связываются с эпитопом на CD137 человека, содержащим одну или более (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или все 25) аминокислот 111-132 из SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, связываются с эпитопом в пределах аминокислот 111-132 из SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах настоящего изобретения представлено, что выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, связываются со всеми аминокислотами или частью аминокислот 111-132 из SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с эпитопом CD137 человека, содержащим остаток K114 из SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с эпитопом CD137 человека, содержащим остатки E111, T113 и K114 из SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с эпитопом CD137 человека, содержащим остатки E111, T113, K114, N126 и I132 из SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с эпитопом CD137 человека, содержащим E111, T113, K114, N126, I132 и P135 из SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с эпитопом CD137 человека, содержащим один или более из остатков E111, T113, K114, N126, I132 и P135 из SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с эпитопом CD137 человека, содержащим последовательность из одного или более аминокислотных остатков, соответствующих положениям аминокислот 100-135, 101-135, 102-135, 103-135, 104-135, 105-135, 106-135, 107-135, 108-135, 109-135, 110-135 или 111-135 в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с эпитопом CD137 человека, содержащим последовательность из одного или более аминокислотных остатков, соответствующих положениям аминокислот 111-135 в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислотных остатков, соответствующих положениям аминокислот 111-135 в SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с эпитопом CD137 человека в пределах положений аминокислот 100-135, 101-135, 102-135, 103-135, 104-135, 105-135, 106-135, 107-135, 108-135, 109-135, 110-135 или 111-135 в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с эпитопом CD137 человека в пределах положений аминокислот 111-135 в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислотных остатков, соответствующих положениям аминокислот 111-135 в SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с эпитопом CD137 человека, содержащим ELTK (соответствуют аминокислотным остаткам 111-114 в SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток L112 может быть другим аминокислотным остатком.

В некоторых вариантах осуществления эпитоп представляет собой нелинейный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления мутация аминокислотного остатка K114 устраняет связывание выделенного антитела-агониста к CD137 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, с CD137 человека.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с эпитопом CD137 человека, содержащим последовательность из одного или более аминокислотных остатков, соответствующих положениям аминокислот 111-135 в SEQ ID NO: 3, где эпитоп содержит по меньшей мере аминокислоту K114, и где антитело или его антигенсвязывающая часть связывают CD137 мыши и не связывают CD137 крысы. В некоторых вариантах осуществления эпитоп представляет собой нелинейный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть связывают CD137 мыши и CD137 яванского макака и не связывают CD137 крысы. В некоторых вариантах осуществления связывание выделенного антитела-агониста к CD137 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, с CD137 человека, мыши, крысы и яванского макака определяют при помощи поверхностно-

го плазмонного резонанса (SPR).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть связываются с CD137 мыши, яванского макака или человека с аффинностью, которая в по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500 или 1000 раз выше аффинности данного антитела к CD137 крысы. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть связываются с CD137 мыши, яванского макака или человека с аффинностью, которая в по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500 или 1000 раз выше аффинности данного антитела к полипептиду CD137, который не содержит лизин в положении 114 по сравнению с CD137 человека под SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с эпитопом CD137 человека и конкурируют с mAb1 за связывание с данным эпитопом CD137 человека. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с CD137 и выступают в качестве его агониста. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, представленные в настоящем изобретении, связываются с CD137 и выступают в качестве агонистов CD137 и костимулируют активацию Т-клеток.

В настоящем изобретении представлены антитела, которые конкурируют за связывание с эпитопом на CD137, содержащим весь эпитоп или его часть, распознаваемые одним или более определенными эталонными антителами, описанными в данном документе (например, mAb1). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 связываются с эпитопом CD137 человека и конкурируют с эталонным антителом (например, mAb1) за связывание с данным эпитопом CD137 человека, и где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают CD137 человека с равновесной константой диссоциации K_D , составляющей 1×10^{-6} или меньше. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 связываются с эпитопом на CD137, где одна или более мутаций в эпитопе подавляют, снижают или блокируют связывание как с данными антителами, так и с эталонным антителом (например, mAb1). В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело представляет собой антитело mAb1, описанное в данном документе. В некоторых вариантах осуществления эталонным антителом является любое антитело, представленное в табл. 3 или табл. 4.

Соответственно, антитела к CD137, представленные в настоящем изобретении, можно оценить с помощью рентгеноструктурного анализа кристаллической структуры, содержащей антитело, связанное с CD137, или его фрагмент или часть. В некоторых аспектах эпитопы, которые связываются антителами, представленными в настоящем изобретении, идентифицируют путем определения остатков на антигене CD137 человека, которые расположены или находятся в пределах 4 ангстрем (Å) от остатка паратопа антитела, например, mAb1.

В некоторых вариантах осуществления эпитоп, связываемый антителами к CD137, описанными в данном документе, состоит из по меньшей мере 3 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления эпитоп, связываемый антителами к CD137, описанными в данном документе, состоит из по меньшей мере 4 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления эпитоп, связываемый антителами к CD137, описанными в данном документе, состоит из по меньшей мере 5 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления эпитоп, связываемый антителами к CD137, описанными в данном документе, состоит из по меньшей мере 6 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления эпитоп, связываемый антителами к CD137, описанными в данном документе, состоит из по меньшей мере 7 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления эпитоп, связываемый антителами к CD137, описанными в данном документе, состоит из по меньшей мере 8 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления эпитоп, связываемый антителами к CD137, описанными в данном документе, состоит из по меньшей мере 9 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления эпитоп, связываемый антителами к CD137, описанными в данном документе, состоит из по меньшей мере 10 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления эпитоп, связываемый антителами к CD137, описанными в данном документе, состоит из по меньшей мере 12 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления эпитоп, связываемый антителами к CD137, описанными в данном документе, состоит из по меньшей мере 3 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления эпитоп, связываемый антителами к CD137, описанными в данном документе, состоит из по меньшей мере 13 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления эпитоп, связываемый антителами к CD137, описанными в данном документе, состоит из по меньшей мере 14 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления эпитоп, связываемый антителами к CD137, описанными в данном документе, состоит из по меньшей мере 15 аминокислотных остатков.

В некоторых вариантах осуществления эпитоп, связываемый антителами к CD137, описанными в данном документе, состоит из менее 25 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления эпитоп, связываемый антителами к CD137, описанными в данном документе, состоит из менее 24 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления эпитоп, связываемый антителами к CD137, описанными в данном документе, состоит из менее 23 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления эпитоп, связываемый антителами к CD137, описанными в данном документе,

- (d) SEQ ID NO: 4 и 32 соответственно;
- (e) SEQ ID NO: 4 и 34 соответственно;
- (f) SEQ ID NO: 4 и 36 соответственно;
- (g) SEQ ID NO: 4 и 38 соответственно;
- (h) SEQ ID NO: 4 и 40 соответственно;
- (i) SEQ ID NO: 4 и 42 соответственно;
- (j) SEQ ID NO: 4 и 44 соответственно;
- (k) SEQ ID NO: 4 и 46 соответственно;
- (l) SEQ ID NO: 8 и 6 соответственно;
- (m) SEQ ID NO: 10 и 6 соответственно;
- (n) SEQ ID NO: 12 и 6 соответственно;
- (o) SEQ ID NO: 14 и 6 соответственно;
- (p) SEQ ID NO: 16 и 6 соответственно;
- (q) SEQ ID NO: 18 и 6 соответственно;
- (r) SEQ ID NO: 20 и 6 соответственно;
- (s) SEQ ID NO: 22 и 6 соответственно;
- (t) SEQ ID NO: 24 и 6 соответственно;
- (u) SEQ ID NO: 26 и 6 соответственно;
- (v) SEQ ID NO: 101 и 6 соответственно;
- (w) SEQ ID NO: 103 и 6 соответственно и
- (x) SEQ ID NO: 4 и 105 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат переменные участки тяжелой и легкой цепей, где переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 101 и 103; и где переменный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 и 105.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат переменные участки тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые на по меньшей мере 90% идентичны аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно;
- (b) SEQ ID NO: 4 и 28 соответственно;
- (c) SEQ ID NO: 4 и 30 соответственно;
- (d) SEQ ID NO: 4 и 32 соответственно;
- (e) SEQ ID NO: 4 и 34 соответственно;
- (f) SEQ ID NO: 4 и 36 соответственно;
- (g) SEQ ID NO: 4 и 38 соответственно;
- (h) SEQ ID NO: 4 и 40 соответственно;
- (i) SEQ ID NO: 4 и 42 соответственно;
- (j) SEQ ID NO: 4 и 44 соответственно;
- (k) SEQ ID NO: 4 и 46 соответственно;
- (l) SEQ ID NO: 8 и 6 соответственно;
- (m) SEQ ID NO: 10 и 6 соответственно;
- (n) SEQ ID NO: 12 и 6 соответственно;
- (o) SEQ ID NO: 14 и 6 соответственно;
- (p) SEQ ID NO: 16 и 6 соответственно;
- (q) SEQ ID NO: 18 и 6 соответственно;
- (r) SEQ ID NO: 20 и 6 соответственно;
- (s) SEQ ID NO: 22 и 6 соответственно;
- (t) SEQ ID NO: 24 и 6 соответственно;
- (u) SEQ ID NO: 26 и 6 соответственно;
- (v) SEQ ID NO: 101 и 6 соответственно;
- (w) SEQ ID NO: 103 и 6 соответственно и
- (x) SEQ ID NO: 4 и 105 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела, которые специфически связывают CD137 человека, содержащие переменные участки тяжелой цепи и легкой цепи, кодируемые нуклеотидными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 5 и 7 соответственно;
- (b) SEQ ID NO: 5 и 29 соответственно;
- (c) SEQ ID NO: 5 и 31 соответственно;

- (d) SEQ ID NO: 5 и 33 соответственно;
- (e) SEQ ID NO: 5 и 35 соответственно;
- (f) SEQ ID NO: 5 и 37 соответственно;
- (g) SEQ ID NO: 5 и 39 соответственно;
- (h) SEQ ID NO: 5 и 41 соответственно;
- (i) SEQ ID NO: 5 и 43 соответственно;
- (j) SEQ ID NO: 5 и 45 соответственно;
- (k) SEQ ID NO: 5 и 47 соответственно;
- (l) SEQ ID NO: 9 и 7 соответственно;
- (m) SEQ ID NO: 11 и 7 соответственно;
- (n) SEQ ID NO: 13 и 7 соответственно;
- (o) SEQ ID NO: 15 и 7 соответственно;
- (p) SEQ ID NO: 17 и 7 соответственно;
- (q) SEQ ID NO: 19 и 7 соответственно;
- (r) SEQ ID NO: 21 и 7 соответственно;
- (s) SEQ ID NO: 23 и 7 соответственно;
- (t) SEQ ID NO: 25 и 7 соответственно;
- (u) SEQ ID NO: 27 и 7 соответственно;
- (v) SEQ ID NO: 102 и 7 соответственно;
- (w) SEQ ID NO: 104 и 7 соответственно и
- (x) SEQ ID NO: 5 и 106 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела, которые специфически связывают CD137 человека, содержащие переменные участки тяжелой цепи и легкой цепи, кодируемые нуклеотидными последовательностями, которые на по меньшей мере 90% идентичны нуклеотидным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 5 и 7 соответственно;
- (b) SEQ ID NO: 5 и 29 соответственно;
- (c) SEQ ID NO: 5 и 31 соответственно;
- (d) SEQ ID NO: 5 и 33 соответственно;
- (e) SEQ ID NO: 5 и 35 соответственно;
- (f) SEQ ID NO: 5 и 37 соответственно;
- (g) SEQ ID NO: 5 и 39 соответственно;
- (h) SEQ ID NO: 5 и 41 соответственно;
- (i) SEQ ID NO: 5 и 43 соответственно;
- (j) SEQ ID NO: 5 и 45 соответственно;
- (k) SEQ ID NO: 5 и 47 соответственно;
- (l) SEQ ID NO: 9 и 7 соответственно;
- (m) SEQ ID NO: 11 и 7 соответственно;
- (n) SEQ ID NO: 13 и 7 соответственно;
- (o) SEQ ID NO: 15 и 7 соответственно;
- (p) SEQ ID NO: 17 и 7 соответственно;
- (q) SEQ ID NO: 19 и 7 соответственно;
- (r) SEQ ID NO: 21 и 7 соответственно;
- (s) SEQ ID NO: 23 и 7 соответственно;
- (t) SEQ ID NO: 25 и 7 соответственно;
- (u) SEQ ID NO: 27 и 7 соответственно;
- (v) SEQ ID NO: 102 и 7 соответственно;
- (w) SEQ ID NO: 104 и 7 соответственно и
- (x) SEQ ID NO: 5 и 106 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат переменные участки тяжелой и легкой цепей, где переменный участок тяжелой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 102 и 104; и где переменный участок легкой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 и 106.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат переменные участки тяжелой и легкой цепей, где переменный участок тяжелой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 102 и 104; и где переменный участок легкой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 и 106.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела к CD137, которые специфически связываются с CD137 человека и содержат CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью DXXXXLXXXXYXYXX (SEQ ID NO: 126), где X представляет собой любую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой любую аминокислоту за исключением аланина. В некоторых вариантах осуществления мутация остатков D95, L100, Y100E, Y100G, и/или Y100H из SEQ ID NO: 126 приводит к потере связывания с CD137 человека.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела к CD137, которые специфически связываются с CD137 человека и содержат CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью DXPFXLDXXYYYYYX (SEQ ID NO: 127), где X представляет собой любую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления мутация с заменой на аланин остатков F98, D100A, Y100D, и/или Y100F, и/или Y100H из SEQ ID NO: 126 приводит к потере связывания с CD137 человека. В некоторых вариантах осуществления мутация остатков F98, D100A, Y100D, и/или Y100F, и/или Y100H из SEQ ID NO: 126 с заменой на любой остаток за исключением аланина приводит к повышению связывания с CD137 человека.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела к CD137, которые специфически связываются с CD137 человека и содержат CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью DX₁X₂X₃X₄LX₅X₆X₇X₈YX₉YYX₁₀ (SEQ ID NO: 128), где X₁ представляет собой любую аминокислоту, где X₂ представляет собой неполярную аминокислоту, где X₃ представляет собой неполярную аминокислоту, где X₄ представляет собой любую аминокислоту, где X₅ представляет собой полярную аминокислоту, где X₆ представляет собой любую аминокислоту, где X₇ представляет собой любую аминокислоту, где X₈ представляет собой полярную аминокислоту, где X₉ представляет собой полярную аминокислоту, и где X₁₀ представляет собой любую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления X₂ представляет собой пролин, где X₃ представляет собой фенилаланин или триптофан, где X₅ представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту, где X₈ представляет собой тирозин, и где X₉ представляет собой тирозин.

Функцию аминокислотного остатка в CDR3 тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающей части в связывании с указанной мишенью (например, CD137) можно определить способами, известными специалисту в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления первичный анализ с использованием сканирования аланином завершают с определением ключевых остатков для связывания антигена. Как описано в данном документе, сканирование аланином представляет собой методику, используемую для определения вклада конкретного остатка дикого типа в стабильность или функцию (функции) (например, аффинность связывания) данного белка или полипептида. Методика включает замену остатка дикого типа в полипептиде на остаток аланина с последующей оценкой стабильности или функции (функций) (например, аффинности связывания) замещенного аланином производного или мутантного полипептида и сравнение с полипептидом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления остатки, идентифицированные как некритические, дополнительно оценивают в отношении модулирования связывания антитела с антигеном (например, увеличения или уменьшения связывания). Неограничивающим примером такого анализа является глубокое мутационное сканирование. Этот способ позволяет оценить большое количество мутаций. В некоторых вариантах осуществления каждый аминокислотный остаток в CDR3 тяжелой цепи мутируют с заменой на каждый возможный аминокислотный остаток (за исключением аланина) и оценивают связывание. Другие способы анализа влияния мутаций аминокислотных остатков известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления эти способы используют для оценки функции остатков во всех CDR тяжелой цепи и легкой цепи в связывании с CD137 человека.

Иллюстративные антитела, связывающие CD137

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 40-100 нМ (например, от приблизительно 40 нМ до приблизительно 100 нМ). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают эпитоп на CD137 человека, описанный выше (например, содержащий K114). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DXXXXLXXXXYXYXX (SEQ ID NO: 126). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), и связывают эпитоп на CD137 человека, описанный выше (например, содержащий K114). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), и содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DXXXXLXXXXYXYXX (SEQ ID NO: 126). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают эпитоп на CD137 человека, описанный выше (например, со-

(iii) содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность $DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$, где X_1 представляет собой любую аминокислоту, где X_2 представляет собой неполярную аминокислоту, где X_3 представляет собой неполярную аминокислоту, где X_4 представляет собой любую аминокислоту, где X_5 представляет собой полярную аминокислоту, где X_6 представляет собой любую аминокислоту, где X_7 представляет собой любую аминокислоту, где X_8 представляет собой полярную аминокислоту, где X_9 представляет собой полярную аминокислоту, и где X_{10} представляет собой любую аминокислоту; или

(iv) их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137

(i) связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ);

(ii) связываются с эпитопом, содержащим ELTK (соответствуют аминокислотным остаткам 111-114 в SEQ ID NO: 3); и

(iii) содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность $DXXXXLXXXXYXYX$, где X представляет собой любую аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137

(i) связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ);

(ii) связываются с эпитопом, содержащим ELTK (соответствуют аминокислотным остаткам 111-114 в SEQ ID NO: 3); и

(iii) содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность $DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$, где X_1 представляет собой любую аминокислоту, где X_2 представляет собой неполярную аминокислоту, где X_3 представляет собой неполярную аминокислоту, где X_4 представляет собой любую аминокислоту, где X_5 представляет собой полярную аминокислоту, где X_6 представляет собой любую аминокислоту, где X_7 представляет собой любую аминокислоту, где X_8 представляет собой полярную аминокислоту, где X_9 представляет собой полярную аминокислоту, и где X_{10} представляет собой любую аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные выше, содержат CDR тяжелой и легкой цепей, выбранные из группы, состоящей из:

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно; и

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 51, 108 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 содержат переменные участки тяжелой и легкой цепей, где переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 101; и где переменный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 содержат переменные участки тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно и

SEQ ID NO: 101 и 6 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 содержат переменные участки тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

(a) SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно;

(b) SEQ ID NO: 101 и 6 соответственно и

(c) SEQ ID NO: 26 и 6 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 содержат переменные участки тяжелой и легкой цепей, кодируемые нуклеотидными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из:

(a) SEQ ID NO: 5 и 7 соответственно и

(b) SEQ ID NO: 102 и 7 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 содержат переменные участки тяжелой и легкой цепей, кодируемые нуклеотидными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из:

(a) SEQ ID NO: 5 и 7 соответственно;

(b) SEQ ID NO: 102 и 7 соответственно и

(c) SEQ ID NO: 27 и 7 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 содержат переменные участки тяжелой и легкой цепей, где переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы,

состоящей из SEQ ID NO: 4 и 101; и где вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, где вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 26 и 101; и где вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, где вариабельный участок тяжелой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 102; и где вариабельный участок легкой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, где вариабельный участок тяжелой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 27 и 102; и где вариабельный участок легкой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые на по меньшей мере 90% идентичны аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно и

SEQ ID NO: 101 и 6 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые на по меньшей мере 90% идентичны аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из:

(a) SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно;

(b) SEQ ID NO: 101 и 6 соответственно и

(c) SEQ ID NO: 26 и 6 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, кодируемые нуклеотидными последовательностями, которые на по меньшей мере 90% идентичны нуклеотидным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 5 и 7 соответственно и

SEQ ID NO: 102 и 7 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, кодируемые нуклеотидными последовательностями, которые на по меньшей мере 90% идентичны нуклеотидным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из:

(a) SEQ ID NO: 5 и 7 соответственно;

(b) SEQ ID NO: 102 и 7 соответственно и

(c) SEQ ID NO: 27 и 7 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, обладают по меньшей мере функциональными свойствами mAb1 (т.е. антитела, содержащего последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей под SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно), mAb8 (т.е. антитела, содержащего последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей под SEQ ID NO: 101 и 6 соответственно) или mAb10 (т.е. антитела, содержащего последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей под SEQ ID NO: 26 и 6 соответственно). В некоторых вариантах осуществления функциональные свойства антитела, описанного в

данном документе, включают без ограничения: индуцирование или повышение димеризации CD137; индуцирование или повышение мультимеризации CD137; индуцирование или повышение CD137-опосредованной активации Т-клеток; индуцирование или повышение CD137-опосредованного ответа цитотоксических Т-клеток; индуцирование или повышение CD137-опосредованной пролиферации Т-клеток; индуцирование или повышение CD137-опосредованного продуцирования цитокинов; отсутствие индуцирования или повышения внутрипеченочной и/или внутриселезеночной активации Т-клеток и/или пролиферации Т-клеток и уменьшение или подавление роста опухоли.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с равновесной константой диссоциации K_D , которая по меньшей мере эквивалентна такой для mAb1 (т.е. антитела, содержащего последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей под SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно), mAb8 (т.е. антитела, содержащего последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей под SEQ ID NO: 101 и 6 соответственно) или mAb10

(т.е. антитела, содержащего последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей под SEQ ID NO: 26 и 6 соответственно).

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат константный участок тяжелой цепи человеческого IgG1 или константный участок тяжелой цепи человеческого IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат константный участок тяжелой цепи человеческого IgG1 дикого типа или константный участок тяжелой цепи человеческого IgG4 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат константный участок тяжелой цепи человеческого IgG1 дикого типа, изложенный под SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат мутантный константный участок тяжелой цепи IgG1 или мутантный константный участок тяжелой цепи IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат мутантный константный участок тяжелой цепи IgG4, где мутантный константный участок тяжелой цепи IgG4 предусматривает аминокислотную замену в остатке Ser228. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена по остатку Ser228 представляет собой S228P. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат константный участок тяжелой цепи IgG4, где С-концевой остаток лизина удален. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат константный участок тяжелой цепи IgG4, где С-концевой остаток лизина удален и содержится аминокислотная замена S228P. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат константный участок тяжелой цепи IgG4, изложенный под SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат тяжелую и легкую цепи, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 129 и 133 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат тяжелую и легкую цепи, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 130 и 133 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат тяжелую и легкую цепи, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 131 и 133 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат тяжелую и легкую цепи, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 132 и 133 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат тяжелую и легкую цепи, содержащие аминокислотные последовательности, которые на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентичны SEQ ID NO: 129 и 133 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат тяжелую и легкую цепи, содержащие аминокислотные последовательности, которые на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентичны SEQ ID NO: 130 и 133 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат тяжелую и легкую цепи, содержащие аминокислотные последовательности, которые на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентичны SEQ ID NO: 131 и 133 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат тяжелую и легкую цепи, содержащие аминокислотные последовательности, которые на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентичны SEQ ID NO: 132 и 133 соответственно.

Определение характеристик и функций CD137-связывающих антител

I. Аффинность.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, связывает CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 40-100 нМ (например, от приблизительно 40 нМ до приблизительно 100 нМ), что определено с помощью анализа связывания антигена. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, связывает CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), что определено с помощью анализа связывания антигена. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, связывает CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 45-95 нМ, 50-90 нМ, 55-85 нМ, 60-80 нМ, 65-75 нМ, 55-75 нМ, 40-70 нМ, 50-80 нМ или 60-90 нМ, что определено с помощью анализа связывания антигена.

В некоторых вариантах осуществления в анализе связывания антигена определяют аффинность связывания антитела к CD137 для полипептида CD137. В некоторых вариантах осуществления анализ связывания антигена представляет собой поверхностный плазмонный резонанс. Соответственно, в некото-

рых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, связывает CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 40-100 нМ (например, от приблизительно 40 нМ до приблизительно 100 нМ), что определено с применением поверхностного плазмонного резонанса. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, связывает CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), что определено с применением поверхностного плазмонного резонанса. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, связывает CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 45-95 нМ, 50-90 нМ, 55-85 нМ, 60-80 нМ, 65-75 нМ, 55-75 нМ, 40-70 нМ, 50-80 нМ или 60-90 нМ, что определено с применением поверхностного плазмонного резонанса.

Фраза "поверхностный плазмонный резонанс" включает оптическое явление, которое предусматривает анализ биоспецифических взаимодействий в режиме реального времени посредством выявления изменений концентраций белков в биосенсорной матрице, например, при помощи системы VIAcoge (Pharmacia Biosensor AB, Уппсала, Швеция и Пискаатауэй, Нью-Джерси). Для дополнительного описания см. Jönsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131 и Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277. В некоторых вариантах осуществления анализ связывания антигена представляет собой интерферометрию биослоев (BLI). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, связывает CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 40-100 нМ (например, от приблизительно 40 нМ до приблизительно 100 нМ), что установлено с применением интерферометрии биослоев. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, связывает CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), что установлено с применением интерферометрии биослоев. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, связывает CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 45-95 нМ, 50-90 нМ, 55-85 нМ, 60-80 нМ, 65-75 нМ, 55-75 нМ, 40-70 нМ, 50-80 нМ или 60-90 нМ, что определено с применением интерферометрии биослоев.

Фраза "интерферометрия биослоев" или "BLI" включает оптическое явление, которое позволяет измерять изменения субнанометрового диапазона в толщине его воспринимающей поверхности оптического слоя. В некоторых вариантах осуществления биомолекулы связываются на поверхности сенсора и изменяют толщину оптического слоя. Величина изменения толщины оптического слоя пропорциональна массе или молекулярной массе связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления CD137 иммобилизуют на поверхности сенсора для измерения связывания антителом, где связывание вызывает изменения молекулярной массы с получением соответствующего изменения толщины оптического слоя. В некоторых вариантах осуществления BLI проводят с помощью системы OCTET (ForteBio).

II. Влияния на иммунные клетки.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, индуцирует или повышает продуцирование цитокинов иммунной клеткой, что определено с помощью анализа цитокинов. В некоторых вариантах осуществления в анализе цитокинов определяют количество по меньшей мере одного цитокина, секретируемого иммунной клеткой, вступившей в контакт с антителом к CD137, где увеличение количества по меньшей мере одного цитокина указывает на индуцирование или повышение продуцирования цитокинов под воздействием антитела к CD137. В некоторых вариантах осуществления достигается повышение продуцирования цитокинов в по меньшей мере 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза или 5 раз по сравнению с контрольным антителом (например, антителом, которое не связывается с CD137 и не индуцирует продуцирование цитокинов).

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, индуцирует или повышает продуцирование цитокинов иммунной клеткой, что определено с помощью анализа цитокинов, где анализ цитокинов предусматривает следующие стадии:

(i) приведение в контакт иммунной клетки с антителом к CD137 и

(ii) определение количества по меньшей мере одного цитокина, продуцируемого иммунной клеткой,

где увеличение количества по меньшей мере одного цитокина указывает на то, что антитело к CD137 индуцирует или повышает продуцирование цитокинов иммунной клеткой.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, индуцирует или повышает продуцирование цитокинов иммунной клеткой, что определено с помощью анализа цитокинов, где анализ цитокинов предусматривает следующие стадии:

(i) приведение в контакт иммунной клетки с антителом к CD137 и

(ii) определение количества по меньшей мере одного цитокина, продуцируемого иммунной клеткой, и

(iii) сравнение количества по меньшей мере одного цитокина, продуцируемого иммунной клеткой, с количеством, секретируемым эталонной иммунной клеткой,

где эталонная иммунная клетка вступает в контакт с контрольным антителом, и где увеличение ко-

личества по меньшей мере одного цитокина, продуцируемого иммунной клеткой, по сравнению с эталонной иммунной клеткой, указывает на индуцирование или повышение продуцирования цитокинов, опосредованных CD137 человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, индуцирует или повышает продуцирование цитокинов иммунной клеткой, что определено с помощью анализа цитокинов, где анализ цитокинов предусматривает следующие стадии:

- (i) приведение в контакт иммунной клетки с антителом к CD137;
- (ii) определение количества по меньшей мере одного цитокина, продуцируемого иммунной клеткой, и
- (iii) сравнение количества по меньшей мере одного цитокина, продуцируемого иммунной клеткой, с количеством или уровнем цитокинов, продуцируемых эталонной иммунной клеткой,

где эталонная иммунная клетка не вступает в контакт с антителом к CD137, и где увеличение количества по меньшей мере одного цитокина, продуцируемого иммунной клеткой, по сравнению с эталонной иммунной клеткой, указывает на индуцирование или повышение опосредованного CD137 человека продуцирования цитокинов иммунной клеткой.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один цитокин выбран из группы, состоящей из IL-2, IFN γ , TNF α , IL-13 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-2. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IFN γ . В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой TNF α . В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-13. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137 индуцирует или повышает продуцирование IL-2. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137 индуцирует или повышает продуцирование TNF α . В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137 индуцирует или повышает продуцирование IL-13. В некоторых аспектах продуцируемым цитокином является IL-2. В некоторых аспектах продуцируемым цитокином является TNF α . В некоторых аспектах продуцируемым цитокином является IL-13. В некоторых аспектах продуцируемым цитокином является IFN γ . В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются IL-2 и TNF α . В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются IL-2 и IL-13. В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются IL-2 и IFN γ . В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются TNF α и IL-13. В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются TNF α и IFN γ . В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются IL-13 и IFN γ . В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются IL-2, TNF α и IL-13. В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются IFN γ , TNF α и IL-13.

В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления эталонная иммунная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой CD8⁺ Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления анализ цитокинов представляет собой микроматричный анализ цитокинов на микрогранулах. Микроматричный анализ цитокинов на гранулах представляет собой иммунологический анализ на основе гранул, который позволяет проводить многоканальное проточно-цитометрическое определение нескольких цитокинов в образце. Применение микросфер разного размера или цвета является основой для микроматричного анализа цитокинов на гранулах, в котором каждая микросфера (или "гранула") покрыта антителом, которое специфически связывается с антигеном (например, цитокином). Затем покрытые антителом гранулы вводят в образец в комбинации с детектирующими антителами. Комплексы гранула:антиген:детектирующее антитело затем анализируют с помощью проточной цитометрии. Коммерчески доступные микроматричные анализы цитокинов на гранулах включают без ограничения системы BDTM Cytometric Bead Array (BD Biosciences) и анализы Luminex[®] (R&D Systems). В некоторых вариантах осуществления индуцирование или повышение опосредованного CD137 человека продуцирования цитокинов определяют с помощью микроматричного анализа цитокинов на микрогранулах. В некоторых вариантах осуществления индуцирование или повышение опосредованного CD137 человека продуцирования цитокинов определяют с помощью анализа Luminex[®].

В некоторых вариантах осуществления анализ цитокинов представляет собой анализ Meso Scale Discovery (MSD) (Meso Scale Diagnostics; Роквилл, Мэриленд). Анализ MSD представляет собой коммерчески доступный анализ на основе выявления электрохемилюминесцентно-меченых антител, которые специфически связываются с представляющим интерес антигеном (например, цитокином). Анализ MSD включает углеродные электроды с высокой степенью связывания в нижней части лунок микропланшета, которые позволяют прикреплять биологические реагенты (например, иммобилизованные антитела, специфичные к цитокину). В анализах MSD используют электрохемилюминесцентные метки, которые конъюгированы с детектирующими антителами. Образец добавляют в лунки микропланшета и подают электричество на электроды планшета с помощью прибора MSD, что приводит к испусканию света электрохемилюминесцентными метками. Интенсивность света измеряют для количественного определения аналитов (например, цитокинов) в образце. В некоторых вариантах осуществления индуцирование или повышение опосредованного CD137 человека продуцирования цитокинов определяют с помощью анали-

за Meso Scale Discovery (MSD).

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, индуцирует или повышает активацию Т-клеток, что определено с помощью анализа активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления в анализе активации Т-клеток определяют количество по меньшей мере одного цитокина, секретируемого Т-клетками, вступившими в контакт с антителом к CD137, описанным в данном документе, где увеличение количества по меньшей мере одного цитокина указывает на индуцирование или повышение активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления достигается повышение продуцирования цитокинов в по меньшей мере 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза или 5 раз по сравнению с контрольным антителом (например, антителом, которое не связывается с CD137 и не индуцирует продуцирование цитокинов).

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, индуцирует или повышает активацию Т-клеток, что определено с помощью анализа активации Т-клеток, где анализ активации Т-клеток предусматривает следующие стадии:

- (i) выделение Т-клеток у субъекта;
 - (ii) приведение в контакт Т-клеток с антителом к CD137 и
 - (iii) определение количества по меньшей мере одного цитокина, секретируемого Т-клетками после
- (ii),

где увеличение уровня по меньшей мере одного цитокина указывает на то, что антитело к CD137 индуцирует или повышает активацию Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, индуцирует или повышает активацию Т-клеток, что определено с помощью анализа активации Т-клеток, где анализ активации Т-клеток предусматривает следующие стадии:

- (i) выделение Т-клеток у субъекта;
- (ii) приведение в контакт Т-клеток с антителом к CD137;
- (iii) определение количества по меньшей мере одного цитокина, секретируемого Т-клетками; и
- (iv) сравнение количества по меньшей мере одного цитокина, продуцируемого Т-клетками, с количеством или уровнем цитокинов, секретируемых эталонными Т-клетками,

где эталонные Т-клетки не приводили в контакт с антителом к CD137, и где увеличение количества по меньшей мере одного цитокина, продуцируемого Т-клетками, по сравнению с эталонными Т-клетками указывает на то, что антитело к CD137 индуцирует или повышает активацию Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, индуцирует или повышает активацию Т-клеток, что определено с помощью анализа активации Т-клеток, где анализ активации Т-клеток предусматривает следующие стадии:

- (i) выделение Т-клеток у субъекта;
- (ii) приведение в контакт Т-клеток с антителом к CD137;
- (iii) определение количества по меньшей мере одного цитокина, секретируемого Т-клетками; и
- (iv) сравнение количества по меньшей мере одного цитокина, продуцируемого Т-клетками, с количеством, секретируемым эталонными Т-клетками,

где эталонные Т-клетки вступают в контакт с контрольным антителом, и где увеличение количества по меньшей мере одного цитокина, продуцируемого Т-клетками, по сравнению с эталонными Т-клетками, указывает на то, что антитело к CD137 индуцирует или повышает активацию Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления анализ активации Т-клеток предусматривает определение уровня по меньшей мере одного цитокина, секретируемого Т-клетками после контакта с антителом к CD137, описанным в данном документе, где по меньшей мере один цитокин выбран из группы, состоящей из IL-2, IFN γ , TNF α и IL-13. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-2. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IFN γ . В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой TNF α . В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-13. В некоторых вариантах осуществления анализ активации Т-клеток предусматривает анализ цитокинов, например, таких, которые описаны в данном документе, для определения количества по меньшей мере одного цитокина. В некоторых аспектах продуцируемым цитокином является IL-2. В некоторых аспектах продуцируемым цитокином является TNF α . В некоторых аспектах продуцируемым цитокином является IL-13. В некоторых аспектах продуцируемым цитокином является IFN γ . В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются IL-2 и TNF α . В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются IL-2 и IL-13. В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются IL-2 и IFN γ . В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются TNF α и IL-13. В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются TNF α и IFN γ . В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются IL-13 и IFN γ . В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются IL-2, TNF α и IL-13. В некоторых аспектах продуцируемым цитокином являются IFN γ , TNF α и IL-13.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, индуцирует или повышает активацию Т-клеток, что определено с помощью анализа активации Т-клеток, где

анализ активации Т-клеток предусматривает выявление поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках, и где повышение уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера активации указывает на индуцирование или повышение активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления "повышение поверхностной экспрессии" означает по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% повышение поверхностной экспрессии по сравнению с поверхностной экспрессией в присутствии контрольного антитела или в отсутствие антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, индуцирует или повышает активацию Т-клеток, что определено с помощью анализа активации Т-клеток *in vitro*, где анализ активации Т-клеток предусматривает следующие стадии:

- (i) выделение Т-клеток у субъекта;
- (ii) приведение в контакт Т-клеток с антителом к CD137 и
- (iii) выявление поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках,

где повышение поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации указывает на то, что антитело к CD137 индуцирует или повышает активацию Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, индуцирует или повышает активацию Т-клеток, что определено с помощью анализа активации Т-клеток, где анализ активации Т-клеток предусматривает следующие стадии:

- (i) выделение Т-клеток у субъекта;
- (ii) приведение в контакт Т-клеток с антителом к CD137;
- (iii) определение поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках и

(iv) сравнение поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках с поверхностной экспрессией по меньшей мере одного маркера активации на эталонных Т-клетках,

где эталонные Т-клетки не приводили в контакт с антителом к CD137, и где повышение поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках по сравнению с эталонными Т-клетками указывает на то, что антитело к CD137 индуцирует или повышает активацию Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, индуцирует или повышает активацию Т-клеток, что определено с помощью анализа активации Т-клеток, где анализ активации Т-клеток предусматривает следующие стадии:

- (i) выделение Т-клеток у субъекта;
- (ii) приведение в контакт Т-клеток с антителом к CD137;
- (iii) определение поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках,

(iv) сравнение поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках с поверхностной экспрессией по меньшей мере одного маркера активации на эталонных Т-клетках,

где эталонные Т-клетки вступают в контакт с контрольным антителом, и где повышение поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках по сравнению с поверхностной экспрессией по меньшей мере одного маркера активации на эталонных Т-клетках указывает на то, что антитело к CD137 индуцирует или повышает активацию Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, индуцирует или повышает активацию Т-клеток, что определено с помощью анализа активации Т-клеток *in vivo*, где анализ активации Т-клеток предусматривает следующие стадии:

- (i) введение антитела к CD137 субъекту;
- (ii) выделение Т-клеток у субъекта и
- (iii) выявление поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках,

где повышение поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации указывает на то, что антитело к CD137 индуцирует или повышает CD137-опосредованную активацию Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, индуцирует или повышает активацию Т-клеток, что определено с помощью анализа активации Т-клеток, где анализ активации Т-клеток предусматривает следующие стадии:

- (i) введение антитела к CD137 субъекту;
- (ii) выделение Т-клеток у субъекта;
- (iii) последующее последующее определение поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках и

(iv) сравнение поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках с поверхностной экспрессией по меньшей мере одного маркера активации на эталонных Т-клетках,

где в эталонные Т-клетки, выделенные у субъекта, не вводят антитело к CD137, и где повышение поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках по сравнению с эталонными Т-клетками указывает на то, что антитело к CD137 индуцирует или повышает активацию Т-

клеток.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, индуцирует или повышает активацию Т-клеток, что определено с помощью анализа активации Т-клеток, где анализ активации Т-клеток предусматривает следующие стадии:

- (i) введение антитела к CD137 субъекту;
- (ii) выделение Т-клеток у субъекта;
- (iii) определение поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках и

(iv) сравнение поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках с поверхностной экспрессией по меньшей мере одного маркера активации на эталонных Т-клетках, где эталонные Т-клетки выделены у субъекта, вступившего в контакт с контрольным антителом, и где повышение поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках по сравнению с поверхностной экспрессией по меньшей мере одного маркера активации на эталонных Т-клетках указывает на то, что антитело к CD137 индуцирует или повышает активацию Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, не индуцирует или не повышает внутрипеченочную активацию Т-клеток, что определено с помощью анализа активации Т-клеток *in vivo*, где анализ активации Т-клеток предусматривает следующие стадии:

- (i) введение антитела к CD137 субъекту;
- (ii) выделение Т-клеток из печени субъекта;
- (iii) выявление поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках

и

(iv) сравнение поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках с поверхностной экспрессией по меньшей мере одного маркера активации на эталонных Т-клетках, где эталонные Т-клетки выделены у субъекта, которому не вводили антитело к CD137, где необязательно эталонные Т-клетки выделены у субъекта, которому вводили контрольное антитело, и где отсутствие повышения поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках по сравнению с поверхностной экспрессией по меньшей мере одного маркера активации на эталонных Т-клетках указывает на то, что антитело к CD137 индуцирует или повышает активацию Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, не индуцирует или не повышает внутриселезеночную активацию Т-клеток, что определено с помощью анализа активации Т-клеток *in vivo*, где анализ активации Т-клеток предусматривает следующие стадии:

- (i) введение антитела к CD137 субъекту;
- (ii) выделение Т-клеток из селезенки субъекта;
- (iii) выявление поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках

и

(iv) сравнение поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках с поверхностной экспрессией по меньшей мере одного маркера активации на эталонных Т-клетках, где эталонные Т-клетки выделены у субъекта, которому не вводили антитело к CD137, где необязательно эталонные Т-клетки выделены у субъекта, которому вводили контрольное антитело, и где отсутствие повышения поверхностной экспрессии по меньшей мере одного маркера активации на Т-клетках по сравнению с поверхностной экспрессией по меньшей мере одного маркера активации на эталонных Т-клетках указывает на то, что антитело к CD137 индуцирует или повышает активацию Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления "не индуцирует или не повышает" предназначено для обозначения отсутствия активности (например, активации Т-клеток) или отсутствия повышения активности по сравнению с повышением под воздействием эталонного антитела.

В некоторых вариантах осуществления поверхностная экспрессия маркера активации Т-клеток эквивалентна поверхностной экспрессии в отсутствие антитела. В некоторых вариантах осуществления поверхностная экспрессия маркера активации Т-клеток меньше поверхностной экспрессии в присутствии эталонного антитела, которое индуцирует или повышает поверхностную экспрессию в по меньшей мере 1, 5, 10, 50 или 100 раз по сравнению с поверхностной экспрессией в отсутствие антитела.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один маркер активации выбран из группы, состоящей из CD25, CD69 и CD40L. В некоторых вариантах осуществления одним или более маркерами активации является CD25.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки выделяют у субъекта, имеющего опухоль. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки выделяют из опухоли. В некоторых вариантах осуществления контрольное антитело представляет собой изотипическое контрольное антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, индуцирует или повышает инфильтрацию одной или более иммунных клеток в микроокружении опухоли, что определено с помощью анализа инфильтрации иммунными клетками. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, уменьшает инфильтрацию одной или более иммунными клетками микроокружения опухоли, что определено с помощью анализа инфильтрации иммунными клетками.

В некоторых вариантах осуществления в анализе инфильтрации иммунными клетками определяют количество иммунных клеток, экспрессирующих один или более маркеров иммунных клеток, в опухоли. В некоторых вариантах осуществления один или более маркеров иммунных клеток мечены антителом. В некоторых вариантах осуществления один или более маркеров иммунных клеток выбраны из группы, состоящей из CD45, CD25, FOXP3, CD4, CD8, F4/80, CD11b, TIGIT и PD-1. В некоторых вариантах осуществления количество иммунных клеток, экспрессирующих один или более маркеров иммунных клеток в опухоли, определяют с помощью проточной цитометрии. Способы количественной оценки иммунных клеток, экспрессирующих один или более маркеров иммунных клеток, с помощью проточной цитометрии известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137 индуцирует или повышает инфильтрацию одной или более иммунными клетками микроокружения опухоли по сравнению с эталонным антителом, что определено с помощью анализа инфильтрации иммунными клетками. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело представляет собой антитело, которое имеет тот же изотип, что и антитело к CD137, и специфически не связывается с CD137. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело представляет собой антитело, которое имеет тот же изотип, что и антитело к CD137, и специфически связывается с CD137. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело представляет собой антитело, которое имеет изотип, отличный от изотипа антитела к CD137, и специфически не связывается с CD137. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело представляет собой антитело, которое имеет изотип, отличный от изотипа антитела к CD137, и специфически связывается с CD137.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, повышает инфильтрацию иммунными клетками, экспрессирующими CD45, микроокружения опухоли у субъекта, что определено с помощью анализа инфильтрации иммунными клетками, где анализ предусматривает следующие стадии:

- (i) введение антитела к CD137 субъекту, имеющему опухоль;
- (ii) получение образца опухоли;
- (iii) приведение в контакт образца с флуоресцентно-меченым детектирующим антителом, которое специфически связывается с CD45, где детектирующее антитело осуществляет флуоресцентное мечение иммунных клеток, экспрессирующих CD45; и
- (iv) определение количества флуоресцентно-меченых иммунных клеток, экспрессирующих CD45, с помощью проточной цитометрии,

где увеличение количества флуоресцентно-меченых иммунных клеток, экспрессирующих CD45, в опухоли указывает на то, что антитело к CD137 индуцирует или повышает инфильтрацию иммунными клетками микроокружения опухоли. В некоторых вариантах осуществления повышение количества иммунных клеток, экспрессирующих CD45, составляет по меньшей мере 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или 80% от общего количества клеток в микроокружении опухоли.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, снижает или подавляет инфильтрацию одной или более иммунными клетками микроокружения опухоли, что определено с помощью анализа инфильтрации иммунными клетками. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, уменьшает инфильтрацию одной или более иммунными клетками микроокружения опухоли по сравнению с эталонным антителом, что определено с помощью анализа инфильтрации иммунными клетками. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело представляет собой антитело, которое имеет тот же изотип, что и антитело к CD137, и специфически не связывается с CD137. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело представляет собой антитело, которое имеет тот же изотип, что и антитело к CD137, и специфически связывается с CD137. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело представляет собой антитело, которое имеет изотип, отличный от изотипа антитела к CD137, и специфически не связывается с CD137. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело представляет собой антитело, которое имеет изотип, отличный от изотипа антитела к CD137, и специфически связывается с CD137. В некоторых вариантах осуществления уменьшение количества иммунных клеток составляет менее 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5% от общего количества клеток в микроокружении опухоли.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, уменьшает инфильтрацию опухолеассоциированными макрофагами микроокружения опухоли у субъекта, что определено с помощью анализа инфильтрации иммунными клетками, где анализ предусматривает следующие стадии:

- (i) получение образца опухоли;
- (ii) приведение в контакт образца с одним или более антителами, которые осуществляют мечение опухолеассоциированного макрофага, где одно или более антител специфически связываются с маркером иммунных клеток, выбранным из группы, состоящей из F4/80, CD11b, CD45 и их комбинации; и
- (iii) определение количества меченых опухолеассоциированных макрофагов с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированные макрофаги составляют менее 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5% от иммунных клеток в микроокружении опухоли. В

некоторых вариантах осуществления опухлеассоциированные макрофаги экспрессируют F4/80, CD11b и CD45.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, уменьшает инфильтрацию регуляторными Т-клетками (Treg) микроокружения опухоли у субъекта, что определено с помощью анализа инфильтрации иммунными клетками, где анализ предусматривает следующие стадии:

- (i) получение образца опухоли;
- (ii) приведение в контакт образца с одним или более антителами, которые осуществляют мечение опухлеассоциированного макрофага, где одно или более антител специфически связываются с маркером иммунных клеток, выбранным из группы, состоящей из CD25, FOXP-3, CD4 и их комбинации; и
- (iii) определение количества меченых клеток Treg с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления клетки Treg составляют менее 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5% от CD4⁺ Т-клеток в микроокружении опухоли. В некоторых вариантах осуществления клетки Treg экспрессируют CD4, FOXP-3 и CD25.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, защищает Т-клетки от истощения Т-клеток и/или вызывает регресс истощения Т-клеток, что определено с помощью анализа истощения Т-клеток. Истощенные Т-клетки можно отличить от других дисфункций Т-клеток, таких как иммунологическая толерантность и старение, на основе лежащих в их основе молекулярных механизмов. (Crespo et al., (2013) *Curr Opin Immunol* 25(2):241-221). Принимая во внимание, что в ходе примирования возникает иммунологическая толерантность из-за отсутствия костимулирующих сигналов, а старение представляет собой остановку роста после экстенсивной пролиферации, истощенные Т-клетки возникают из Т-клеток, которые первоначально получили и обеспечивали эффекторную функцию Т-клеток, но демонстрируют постепенное ухудшение эффекторной функции Т-клеток вследствие непрерывной стимуляции Т-клеточного рецептора (TCR) персистирующими антигенами и медиаторами воспаления, которые обычно встречаются в опухолях (Wherry & Kurachi (2015) *Nat Rev Immunol* 15(8):486-99). Признаки истощения Т-клеток включают без ограничения непрерывное ухудшение функции Т-клеток *in vivo* и/или *ex vivo*, повышенную экспрессию нескольких ингибиторных рецепторов (IR) (например, PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, CD244, CD160, TIGIT), прогрессирующую потерю или снижение секреции эффекторных цитокинов (например, IL-2, гамма-интерферона (IFN γ), фактора некроза опухоли альфа (TNF α)), потерю или снижение продуцирования СС-хемокина (β -хемокина), низкую чувствительность к IL-7 и IL-15, потерю или снижение пролиферативной способности, потерю или снижение цитолитической активности *in vivo* и/или *ex vivo*, измененный метаболизм клеток и другой транскрипционный профиль по сравнению с неистощенными Т-клетками. Сильно истощенные Т-клетки могут быть устранены (Yi et al., (2010) *Immunology* 129(4):474-481).

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, защищает Т-клетки от истощения Т-клеток и/или вызывает регрессию истощения Т-клеток, что определено с помощью анализа истощения Т-клеток, где в анализе истощения Т-клеток определяют количество или уровень одного или более эффекторных цитокинов, секретируемых Т-клетками, обработанными антителом к CD137, описанным в данном документе, где количество или уровень одного или более эффекторных цитокинов указывает на защиту от истощения Т-клеток или его регрессию. В некоторых вариантах осуществления анализ истощения Т-клеток предусматривает следующие стадии:

- (i) выделение Т-клеток у субъекта (например, человека);
 - (ii) приведение в контакт Т-клеток с антигеном, который индуцирует истощение Т-клеток;
 - (iii) приведение в контакт Т-клеток с антителом к CD137;
 - (iv) определение количества одного или более эффекторных цитокинов, секретируемых Т-клетками;
- и
- (v) сравнение количества или уровня одного или более эффекторных цитокинов, секретируемых Т-клетками, с количеством или уровнем цитокинов, секретируемых эталонными Т-клетками, где эталонные Т-клетки не приводили в контакт с антигеном, который индуцирует истощение Т-клеток, и где различие в количестве или уровне одного или более эффекторных цитокинов, секретируемых Т-клетками и эталонными Т-клетками, указывает на защиту от истощения Т-клеток или его регрессию.

В некоторых вариантах осуществления один или более эффекторных цитокинов выбраны из IL-2, IFN γ и TNF α . В некоторых вариантах осуществления количество или уровень одного или более эффекторных цитокинов определяют с помощью ELISA. ELISA, подходящие для определения количества или уровня одного или более эффекторных цитокинов, известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления количество или уровень одного или более эффекторных цитокинов определяют с помощью Meso Scale Discovery. В некоторых вариантах осуществления количество или уровень одного или более эффекторных цитокинов определяют с помощью любого из анализов продуцирования цитокинов, описанного в данном документе.

Постепенная дисфункция истощенных Т-клеток сопровождается экспрессией IR, которые передают

ингибиторные сигналы ядру при взаимодействии с лигандами на клетках-мишенях. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, защищает Т-клетки от Т-клеточного истощения и/или вызывает регрессию истощения Т-клеток, что определено с помощью анализа истощения Т-клеток, где в анализе истощения Т-клеток определяют уровень экспрессии одного или более ингибиторных рецепторов на Т-клетках, обработанных антителом к CD137, описанным в данном документе, где уровень экспрессии одного или более ингибиторных рецепторов указывает на защиту от истощения Т-клеток или его регрессию. В некоторых вариантах осуществления анализ истощения Т-клеток предусматривает следующие стадии:

- (i) выделение Т-клеток у субъекта (например, человека);
- (ii) приведение в контакт Т-клеток с антигеном, который индуцирует истощение Т-клеток;
- (iii) приведение в контакт Т-клеток с антителом к CD137;
- (iv) определение уровня экспрессии одного или более ингибиторных рецепторов на Т-клетках и
- (v) сравнение уровня экспрессии одного или более ингибиторных рецепторов на Т-клетках с количеством или уровнем, секретируемым эталонными Т-клетками, где эталонные Т-клетки не приводили в контакт с антигеном, который индуцирует истощение Т-клеток, и где различие в уровне экспрессии одного или более ингибиторных рецепторов на Т-клетках и эталонных Т-клетках указывает на защиту от истощения Т-клеток или его регрессию.

В некоторых вариантах осуществления один или более ингибиторных рецепторов выбраны из TIG-IT и PD-1. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии одного или более ингибиторных рецепторов определяют с помощью проточной цитометрии. Способы определения уровней экспрессии ингибиторных рецепторов на иммунных клетках (например, Т-клетках) с помощью проточной цитометрии известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления количество истощенных Т-клеток составляет менее 20%, 15%, 10% или 5% от общего количества CD8⁺ или CD4⁺ Т-клеток в микроокружении опухоли.

Там, где описанные в данном документе анализы относятся к "выделению Т-клеток у субъекта", следует понимать, что анализ может быть подходящим образом проведен на Т-клетках, ранее выделенных у субъекта.

Там, где описанные в данном документе анализы относятся к (i) введению антитела к CD137 субъекту и (ii) выделению Т-клеток у субъекта, следует понимать, что анализ может быть подходящим образом проведен на Т-клетках, ранее выделенных у субъекта, которому вводили антитело к CD137.

Там, где описанные в данном документе анализы относятся к "получению образца опухоли", следует понимать, что анализ может быть подходящим образом проведен на образце опухоли, ранее выделенном у субъекта.

Там, где описанные в данном документе анализы относятся к (i) введению антитела к CD137 субъекту, имеющему опухоль, и (ii) получению образца опухоли, следует понимать, что анализ может быть подходящим образом проведен на образце опухоли, ранее выделенном у субъекта, которому вводили антитело к CD137.

III. Связывание, отличное от связывания лиганда.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, связывается с участком, отличным от лигандсвязывающего участка, CD137, что определено с помощью анализа связывания с лигандом. Анализ связывания с лигандом (LBA) представляет собой анализ или аналитическую процедуру, которая обеспечивает меру взаимодействий, которые происходят между двумя вступающими в реакцию молекулами (например, полипептидами рецептора и лиганда). Соответственно, LBA обеспечивает показатель степени аффинности между двумя вступающими в реакцию молекулами (например, полипептидами рецептора и лиганда). Например, в некоторых вариантах осуществления анализ связывания с лигандом используют для определения присутствия, скорости, степени связывания или их комбинации для молекулы лиганда (например, CD137L) и рецептора (например, CD137). В некоторых вариантах осуществления для определения присутствия, скорости и/или степени связывания лиганда с рецептором анализ связывания с лигандом предусматривает выявление образования комплекса лиганд:рецептор. В некоторых вариантах осуществления для определения присутствия, скорости и/или степени связывания лиганда с рецептором анализ связывания с лигандом предусматривает определение диссоциации комплекса лиганд:рецептор.

В некоторых вариантах осуществления образование и/или диссоциацию комплекса лиганд:рецептор определяют путем выявления флуоресцентно-меченого лиганда в комплексе с рецептором. В некоторых вариантах осуществления образование и/или диссоциацию комплекса лиганд:рецептор определяют путем выявления и/или количественного определения флуоресцентно-меченого рецептора в комплексе с лигандом. В некоторых вариантах осуществления образование и/или диссоциацию комплекса лиганд:рецептор определяют путем выявления и/или количественного определения флуоресцентно-меченого антитела, которое специфически связывается с комплексом лиганд:рецептор. Способы выявления и количественного определения флуоресценции известны в данной области техники и включают без ограничения поляризацию флуоресценции (FP) и анизотропию флуоресценции (FA).

В некоторых вариантах осуществления образование и/или диссоциацию комплекса лиганд:рецептор

определяют путем выявления и/или количественного определения радиоактивно меченного лиганда в комплексе с рецептором. В некоторых вариантах осуществления образование и/или диссоциацию комплекса лиганд:рецептор определяют путем выявления и/или количественного определения радиоактивно меченного рецептора в комплексе с лигандом. В некоторых вариантах осуществления образование и/или диссоциацию комплекса лиганд:рецептор определяют путем выявления и/или количественного определения радиоактивно меченного антитела, которое специфически связывается с комплексом лиганд:рецептор. Способы выявления и количественного определения радиоактивности известны в данной области техники и включают без ограничения количественную автордиографию и сцинтилляционный счет.

В некоторых вариантах осуществления образование и/или диссоциацию комплекса лиганд:рецептор определяют путем выявления и/или количественного определения биоломинесцентно меченного лиганда в комплексе с рецептором. В некоторых вариантах осуществления образование и/или диссоциацию комплекса лиганд:рецептор определяют путем выявления и/или количественного определения биоломинесцентно меченного рецептора в комплексе с лигандом. В некоторых вариантах осуществления образование и/или диссоциацию комплекса лиганд:рецептор определяют путем выявления и/или количественного определения биоломинесцентно меченного антитела, которое специфически связывается с комплексом лиганд:рецептор. Способы выявления и количественного определения биоломинесценции известны в данной области техники и включают без ограничения люминометрию.

В некоторых вариантах осуществления образование и/или диссоциацию комплекса лиганд:рецептор определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), что описано выше.

В некоторых вариантах осуществления в анализе связывания с лигандом определяют, влияет ли антитело, которое специфически связывается с рецептором (например, антитело к CD137), на образование комплекса лиганд:рецептор путем определения присутствия, скорости и/или степени связывания лиганда с рецептором в присутствии антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело (например, антитело к CD137), которое специфически связывается с рецептором (например, CD137) и снижает, нарушает или блокирует образование комплекса лиганд:рецептор (например, комплекса CD137:CD137L), известно под названием "антитело, блокирующее лиганд". В некоторых вариантах осуществления "антитело, блокирующее лиганд" может снижать образование комплекса лиганд:рецептор (например, комплекса CD137:CD137L) на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50% по сравнению с образованием комплекса лиганд:рецептор (например, комплекса CD137: CD137L), которое происходит в отсутствие антитела, блокирующего лиганд. В некоторых вариантах осуществления антитело (например, антитело к CD137), которое специфически связывается с рецептором (например, CD137) и не снижает, не нарушает или не блокирует образование комплекса лиганд:рецептор (например, комплекса CD137:CD137L), известно под названием "антитело, не блокирующее лиганд". В некоторых вариантах осуществления "антитело, не блокирующее лиганд" может снижать образование комплекса лиганд:рецептор (например, комплекса CD137:CD137L) на менее чем 10%, на менее чем 5%, на менее чем 2% или на менее чем 1% по сравнению с образованием комплекса лиганд:рецептор (например, комплекса CD137: CD137L), которое происходит в отсутствие антитела, не блокирующего лиганд. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления анализ связывания с лигандом дает характеристику антителу, которое связывается с рецептором, как "антитело, блокирующее лиганд" или "антитело, не блокирующее лиганд".

В некоторых вариантах осуществления анализ связывания с лигандом дает характеристику антителу, которое специфически связывается с рецептором и стимулирует образование комплекса лиганд:рецептор. В некоторых вариантах осуществления анализ связывания с лигандом дает характеристику антителу, которое специфически связывается с рецептором и стабилизирует образование комплекса лиганд:рецептор. В некоторых вариантах осуществления индуцирование и/или стабилизация образования комплекса лиганд:рецептор с помощью антитела делает вклад в агонистическое воздействие антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, проявляет функцию агониста CD137, что определено с помощью анализа связывания с лигандом.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с CD137 и индуцируют связывание CD137L, что определено с помощью анализа связывания с лигандом (LBA).

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с CD137 и индуцируют связывание CD137L, что определено с помощью анализа связывания с лигандом, где анализ связывания с лигандом предусматривает следующие стадии:

(i) объединение антитела к CD137 с CD137 и CD137L при разных концентрациях, где CD137 и CD137L образуют комплекс CD137:CD137L, и

(ii) выявление количества комплекса CD137:CD137L в присутствии антитела к CD137 с течением времени, где повышение количества комплекса CD137:CD137L в присутствии антитела к CD137 указывает на то, что антитело к CD137 индуцирует связывание CD137L с CD137. Повышение количества комплекса CD137:CD137L в присутствии антитела к CD137 может быть в по меньшей мере 1,5 раза, по меньшей

мере 2 раза, по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 10 раз или по меньшей мере 20 раз больше, чем количество комплекса CD137:CD137L в отсутствие антитела к CD137.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с участком, отличным от лигандсвязывающего участка, CD137, что определено с помощью анализа связывания с лигандом, где анализ связывания с лигандом предусматривает следующие стадии:

(i) объединение антитела к CD137 с CD137 и CD137L при разных концентрациях, где CD137 и CD137L образуют комплекс CD137:CD137L, и

(ii) выявление комплекса CD137:CD137L в присутствии антитела к CD137 с течением времени,

где отсутствие изменения количества комплекса CD137:CD137L в присутствии антитела к CD137 указывает на то, что антитело к CD137 связывается с участком, отличным от лигандсвязывающего участка, CD137. В некоторых вариантах осуществления менее чем 2%-е изменение количества комплекса CD137:CD137L указывает на то, что антитело к CD137 связывается с участком, отличным от лигандсвязывающего участка, CD137. В некоторых вариантах осуществления менее чем 5%-е изменение количества комплекса CD137:CD137L указывает на то, что антитело к CD137 связывается с участком, отличным от лигандсвязывающего участка, CD137. В некоторых вариантах осуществления менее чем 10%-е изменение количества комплекса CD137:CD137L указывает на то, что антитело к CD137 связывается с участком, отличным от лигандсвязывающего участка, CD137.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, связывается с участком, отличным от лигандсвязывающего участка, CD137, что определено с помощью интерферометрии биослоев. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, связывается с участком, отличным от лигандсвязывающего участка, CD137, что определено путем визуализации с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPRi). В некоторых вариантах осуществления CD137 и CD137L последовательно наносят на датчик, предварительно нагруженный антителом к CD137 (т.е. антитело иммобилизовано на датчике). В некоторых вариантах осуществления на связывание антитела к CD137 с участком, отличным от лигандсвязывающего участка, указывает повышение ответа при воздействии CD137L.

IV. Функции CD137-связывающих антител.

В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), и подавляют или снижают истощение Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), и индуцируют или повышают активацию Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), и индуцируют или повышают продукцию цитокинов иммунными клетками. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), индуцируют или повышают пролиферацию Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), и проявляют противоопухолевую эффективность. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), и подавляют или снижают дифференцировку и/или активацию макрофагов. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), и индуцируют или повышают передачу сигналов NF κ B. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), и индуцируют или повышают инфильтрацию иммунными клетками микроокружения опухоли. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), и не индуцируют гепатотоксичность. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), и связываются с не связывающим лиганд доменом на внеклеточном CD137. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 30-100 нМ (например, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 100 нМ), и не подавляют

ваются с не связывающим лиганд доменом на внеклеточном CD137. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, индуцируют или повышают передачу сигналов NF κ B и не подавляют взаимодействие CD137 и CD137L. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, индуцируют или повышают передачу сигналов NF κ B и связываются с эпитопом, содержащим K114 из SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, индуцируют или повышают инфильтрацию иммунными клетками микроокружения опухоли и не индуцируют гепатотоксичность. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, индуцируют или повышают инфильтрацию иммунными клетками микроокружения опухоли и связываются с не связывающим лиганд доменом на внеклеточном CD137. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, индуцируют или повышают инфильтрацию иммунными клетками микроокружения опухоли и не подавляют взаимодействие CD137 и CD137L. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, индуцируют или повышают инфильтрацию иммунными клетками микроокружения опухоли и связываются с эпитопом, содержащим K114 из SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, не индуцируют гепатотоксичность и связываются с не связывающим лиганд доменом на внеклеточном CD137. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, не индуцируют гепатотоксичность и не подавляют взаимодействие CD137 и CD137L. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, не индуцируют гепатотоксичность и связываются с эпитопом, содержащим K114 из SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, связываются с не связывающим лиганд доменом на внеклеточном CD137 и не подавляют взаимодействие CD137 и CD137L. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, связываются с не связывающим лиганд доменом на внеклеточном CD137 и связываются с эпитопом, содержащим K114 из SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления антитела-агонисты к CD137, описанные в данном документе, не подавляют взаимодействие CD137 и CD137L и связываются с эпитопом, содержащим K114 из SEQ ID NO: 3.

Картирование эпитопа

В настоящем изобретении представлены антитела к CD137 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с эпитопом CD137 человека и конкурируют с эталонным mAb (например, mAb1) за связывание с эпитопом CD137 человека. Способы определения характеристик, картирования или иного получения информации об эпитопе антитела к CD137 можно сгруппировать в структурные, функциональные или вычислительные способы. Особенно подходящим структурным способом определения точного молекулярного строения взаимодействия между антителом и соответствующим антигеном, с которым оно связывается, является рентгеновская кристаллография (альтернативно "рентгеновская совместная кристаллография"). Кристаллическая структура связанной пары антитело-антиген позволяет очень точно определить ключевые взаимодействия между отдельными атомами аминокислот как боковых цепей, так и атомами основной цепи как в эпитопе антигена, так и в паратопе антитела. Аминокислоты, которые расположены в пределах 4 ангстрем (Å) друг от друга, обычно считаются вступающими в контакт остатками. Методика обычно включает очистку антитела и антигена, образование и очистку комплекса с последующими последовательными циклами скрининга кристаллизации и оптимизации с получением кристаллов надлежащего качества для дифракции. Пояснение структуры часто получают после рентгеновской кристаллографии на источнике синхротронного излучения. Другие структурные способы картирования эпитопов включают без ограничения водородно-дейтериевый обмен в сочетании с масс-спектрометрией, масс-спектрометрию в сочетании со шшивкой и ядерный магнитный резонанс (ЯМР) (см., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996); Abbott et al., (2014) *Immunology* 142(4):526-535).

Функциональные способы картирования эпитопов хорошо известны в данной области техники и обычно включают оценку или количественную оценку связывания антител с полными белками, фрагментами белков или пептидами. Функциональные способы картирования эпитопов можно использовать, например, для идентификации линейных или конформационных эпитопов и/или можно использовать для определения, когда два или более разных антитела связываются с одними и теми же или схожими эпитопами. Функциональные способы картирования эпитопов включают, например, анализы иммуноблоттинга и иммунопреципитации, в которых перекрывающиеся или смежные пептиды из CD137 тестируют на способность вступать в реакцию с антителом к CD137, например, mAb1. Другие функциональные способы картирования эпитопов включают сканирование олигопептидов на основе массива (альтернативно известное как "сканирование перекрывающихся пептидов" или "анализ pepscan"), сайт-направленный мутагенез (например, аланин-сканирующий мутагенез) и картирование с высокопроизводительным мутагенезом (например, картирование с мутагенезом по методике "дробовика").

Известно множество типов анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой

или непрямой радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (см. Stahl et al., *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); твердофазный прямой EIA с биотин-авидином (см. Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный сэндвич-анализ с прямым мечением (см. Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); твердофазный RIA с прямым мечением с использованием в качестве метки I-125 (см. Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); твердофазный прямой EIA с биотин-авидином (Cheung et al., *Virology* 176:546 (1990)) и RIA с прямым мечением. (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Обычно такие анализы включают применение очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью или клетками, и либо 1) немеченого тестируемого антигенсвязывающего белка и меченого эталонного антигенсвязывающего белка, либо 2) меченого тестируемого антигенсвязывающего белка и немеченого эталонного антигенсвязывающего белка. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клетками в присутствии тестируемого антигенсвязывающего белка. Обычно тестируемый антигенсвязывающий белок присутствует в избытке. Антигенсвязывающие белки, идентифицированные в конкурентном анализе (конкурирующие антигенсвязывающие белки), включают антигенсвязывающие белки, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонные антигенсвязывающие белки (например, mAb1), и антигенсвязывающие белки, связывающиеся со смежным эпитопом, достаточно близко расположенному к эпитопу, связанному эталонным антигенсвязывающим белком (например, mAb1), для возникновения стерических затруднений. Дополнительные подробности относительно способов определения конкурентного связывания представлены в примерах в данном документе. Обычно если конкурирующий антигенсвязывающий белок присутствует в избытке (например, приблизительно 1-кратном, приблизительно 5-кратном, приблизительно 10-кратном, приблизительно 20-кратном, приблизительно 50-кратном или приблизительно 100-кратном избытке), он будет подавлять (например, уменьшать или блокировать) специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка с общим антигеном на по меньшей мере приблизительно 40-45%, приблизительно 45-50%, приблизительно 50-55%, приблизительно 55-60%, приблизительно 60-65%, приблизительно 65-70%, приблизительно 70-75% или приблизительно 75% или больше. В некоторых случаях связывание подавляется на по меньшей мере приблизительно 80-85%, приблизительно 85-90%, приблизительно 90-95%, приблизительно 95-97% или приблизительно 97% или больше.

Способ сайт-направленного мутагенеза включает целенаправленно воздействующий сайт-направленный мутагенез, где критические аминокислоты идентифицируют путем систематического введения замен вдоль последовательности белка с последующим определением влияния каждой замены на связывание антител. Это можно выполнить путем "аланин-сканирующего мутагенеза" (Cunningham and Wells (1989) *Science* 244:1081-085) или некоторой другой формы точечного мутагенеза аминокислотных остатков в CD137. Не вдаваясь в теорию, два или более антител (например, тестируемое антитело и эталонное антитело, например, mAb1) имеют один и тот же эпитоп, если по сути все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание первого антитела, уменьшают или устраняют связывание второго или большего количества антител.

При картировании с мутагенезом по методике "дробовика" используют всеобъемлющую библиотеку плазмид с мутациями для гена-мишени, причем каждый клон в библиотеке несет уникальную аминокислотную мутацию, а вся библиотека охватывает каждую аминокислоту в целевом белке. Клоны, которые составляют библиотеку мутаций, по отдельности располагают в микропланшетах, экспрессируют в живых клетках млекопитающих и тестируют на иммунологическую реактивность с представляющими интерес антителами. Аминокислоты, критические для эпитопов антител, идентифицируют по потере реакционной способности, а затем картируют на структуре белка для визуализации эпитопов. Экспрессия антигена целевого белка в клетках млекопитающих часто обеспечивает нативную структуру антигена целевого белка, которая позволяет картировать структуры как линейных, так и конформационных эпитопов на сложных белках. (Paes et al., *J. Am. Chem. Soc.* 131 (20): 6952-6954 (2009); Banik and Doranz, *Genetic Engineering and Biotechnology News* 3(2): 25-28 (2010)).

Эпитоп, связанный антителом к CD137, также можно определить способом пептидного сканирования. При пептидном сканировании библиотеки коротких пептидных последовательностей из перекрывающихся сегментов целевого белка, CD137, тестируют на их способность связывать представляющие интерес антитела. Пептиды синтезируют и подвергают скринингу на связывание, например, с использованием ELISA, или BIACORE, или на чипе, с помощью любого из множества способов твердофазного скрининга (Reineke et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 59-64, 2001), как в методике "pepscan" (WO 84/03564; WO 93/09872).

Недавно разработанную технологию, названную CLIPS (химическое связывание пептидов на каркасах), можно использовать для картирования конформационных эпитопов. Свободные концы пептидов прикрепляют к синтетическим каркасам, так что пептид на каркасе способен принимать ту же пространственную структуру, что и соответствующая последовательность в интактном белке. Технологию CLIPS используют для закрепления линейных пептидов в циклических структурах (формат "одинарной петли") и для объединения различных частей сайта связывания белка (формат "двойной петли", "тройной петли")

и т.д.), за счет чего образуются конформационные эпитопы, которые можно анализировать на связывание антител, (патент США № 7972993).

Эпитопы, связанные антителами, представленными в настоящем изобретении, также можно картировать с использованием вычислительных способов. В этих способах, например, библиотеки пептидных фрагментов экспрессируют на поверхности фага или клетки. Затем эпитопы картируют путем скрининга антител в отношении этих фрагментов с использованием анализов селективного связывания. Был разработан ряд вычислительных средств, которые позволяют прогнозировать конформационные эпитопы на основе линейных отобранных по аффинности пептидов, полученных с использованием фагового дисплея (Maygose et al., (2007) *Bioinformatics* 23:3244-3246). Также доступны способы выявления конформационных эпитопов с помощью фагового дисплея. Системы на основе микробных дисплеев также можно использовать для экспрессии антигенных фрагментов с правильным фолдингом на поверхности клетки с целью идентификации конформационных эпитопов (Cochran et al., *J. Immunol. Meth.* 287: 147-158, 2004; Rockberg et al., *Nature Methods* 5: 1039-1045, 2008).

Способы, включающие протеолиз и масс-спектроскопию, также можно использовать для определения эпитопов для антител (Baerga-Ortiz et al., *Protein Sci.* 2002 June; 11(6):1300-1308). При ограниченном протеолизе антиген расщепляют различными протеазами в присутствии и в отсутствие антитела, и его фрагменты идентифицируют масс-спектрометрией. Эпитоп - это участок антигена, который становится защищенным от протеолиза при связывании антитела (Suckau et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9848-9852, 1990). Дополнительные способы на основе протеолиза включают, например, селективную химическую модификацию (Fiedler et al., *Bioconjugate Chemistry* 1998, 9(2): 236-234, 1998), вырезание эпитопа (Van de Water et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1997, 85(3): 229-235, 1997) и недавно разработанный способ водородно-дейтериевого (H/D) обмена (Flanagan, N., *Genetic Engineering and Biotechnology News* 3(2): 25-28, 2010).

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связываются с эпитопом, расположенным в пределах аминокислотных остатков 111-135 в SEQ ID NO: 3, что определено с помощью мутагенеза и дисплея на основе клеток млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связываются с эпитопом, содержащим K114 из SEQ ID NO: 3, что определено с помощью мутагенеза и дисплея на основе клеток млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связываются с эпитопом, содержащим E111, T113 и K114 из SEQ ID NO: 3, что определено с помощью мутагенеза и дисплея на основе клеток млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связываются с эпитопом, содержащим E111, T113, K114 и P135 из SEQ ID NO: 3, что определено с помощью мутагенеза и дисплея на основе клеток млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, связываются с эпитопом, содержащим E111, T113, K114, N126, I132 и P135 из SEQ ID NO: 3, что определено с помощью мутагенеза и дисплея на основе клеток млекопитающих.

Способы получения антител к CD137 и их антигенсвязывающих фрагментов

Настоящее изобретение также включает способы получения любых антител к CD137 или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способы получения антитела, описанные в данном документе, могут включать иммунизацию субъекта (например, млекопитающего, не являющегося человеком) соответствующим иммуногеном. Подходящие иммуногены для получения любого из антител, описанных в данном документе, изложены в данном документе. Например, для получения антитела, которое связывается с CD137, опытный специалист может иммунизировать подходящего субъекта (например, млекопитающего, не являющегося человеком, такого как крыса, мышь, песчанка, хомяк, собака, кошка, свинья, коза, лошадь или примат, отличный от человека) полноразмерным полипептидом CD137, таким как полноразмерный полипептид CD137 человека, содержащий аминокислотную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 3.

Подходящего субъекта (например, млекопитающего, не являющегося человеком) можно иммунизировать подходящим антигеном вместе с последующими бустерными иммунизациями несколько раз, достаточными для выявления продуцирования антитела млекопитающим. Иммуноген можно вводить субъекту (например, млекопитающему, не являющемуся человеком) с адьювантом. Адьюванты, применимые в получении антитела у субъекта, включают без ограничения белковые адьюванты; бактериальные адьюванты, например, цельные бактерии (БЦЖ, *Corynebacterium parvum* или *Salmonella minnesota*) и бактериальные компоненты, в том числе скелет клеточной стенки, трегалозы димиколат, монофосфориллипид А, экстрагируемый метанолом остаток (MER) туберкулезной бациллы, полный или неполный адьювант Фрейнда; вирусные адьюванты; химические адьюванты, например гидроксид алюминия, иодоацетат и холестерил гемисукцинат. Другие адьюванты, которые можно использовать в способах индуцирования иммунного ответа, включают, например, белки холерного токсина и парапоксвируса. См. также Bieg et al. (1999) *Autoimmunity* 31(1):15-24. См. также, например, Lodmell et al. (2000) *Vaccine* 18:1059-1066; Johnson et al. (1999) *J Med Chem* 42:4640-4649; Baldrige et al. (1999) *Methods* 19:103-107 и Gupta et al. (1995) *Vaccine* 13(14): 1263-1276.

В некоторых вариантах осуществления способы включают получение линии клеток гибридомы,

секретирующей моноклональное антитело, которое связывается с иммуногеном. Например, подходящее млекопитающее, такое как лабораторная мышь, иммунизируют полипептидом CD137, как это описано выше. Антителопродуцирующие клетки (например, В-клетки селезенки) иммунизированного млекопитающего можно выделить через два-четыре дня после по меньшей мере одной бустерной иммунизации иммуногеном, а затем кратковременно растить в культуре перед слиянием с клетками подходящей клеточной линии миеломы. Клетки можно подвергнуть слиянию в присутствии активатора слияния, такого как, например, вирус коровьей оспы или полиэтиленгликоль. Гибридные клетки, полученные в результате слияния, клонируют и отбирают клеточные клоны, секретирующие требуемые антитела. Например, клетки селезенки мышей Balb/c, иммунизированных подходящим иммуногеном, можно подвергнуть слиянию с клетками линии клеток миеломы РА1 или линии клеток миеломы Sp2/0-Ag 14. После слияния клетки размножают в подходящей культуральной среде, которую дополняют селективной средой, например средой НАТ, через равные промежутки времени с целью предотвращения избыточного роста нормальных клеток миеломы относительно требуемых клеток гибридомы. Затем полученные клетки гибридомы подвергают скринингу в отношении секреции требуемых антител, например антитела, которое связывается с CD137.

В некоторых вариантах осуществления специалист в данной области техники может идентифицировать антитело к CD137 из неиммунной направленной библиотеки, как это описано, например, в патенте США № 6300064 (от Knappik et al.; Morphosys AG) и Schoonbroodt et al. (2005) *Nucleic Acids Res* 33(9):e81.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, могут включать например, технологии фагового дисплея, бактериальный дисплей, дисплей на поверхности дрожжей, эукариотический вирусный дисплей, дисплей на основе клеток млекопитающих и бесклеточные (например, рибосомный дисплей) методики скрининга антител, или использоваться в сочетании с ними (см., например, Etz et al. (2001) *J Bacteriol* 183:6924-6935; Cornelis (2000) *Curr Opin Biotechnol* 11:450-454; Klemm et al. (2000) *Microbiology* 146:3025-3032; Kieke et al. (1997) *Protein Eng* 10:1303-1310; Yeung et al. (2002) *Biotechnol Prog* 18:212-220; Boder et al. (2000) *Methods Enzymology* 328:430-444; Grabherr et al. (2001) *Comb Chem High Throughput Screen* 4:185-192; Michael et al. (1995) *Gene Ther* 2:660-668; Pereboev et al. (2001) *J Virol* 75:7107-7113; Schaffitzel et al. (1999) *J Immunol Methods* 231:119-135 и Hanes et al. (2000) *Nat Biotechnol* 18:1287-1292).

Способы идентификации антител с использованием различных способов фагового дисплея известны в данной области техники. В способах фагового дисплея функциональные домены антител экспрессируются на поверхности фаговых частиц, которые несут кодирующие их полинуклеотидные последовательности. Такой фаг можно использовать для экспрессии антигенсвязывающих доменов антител, таких как Fab, Fv или стабилизированные дисульфидной связью Fv-фрагменты антител, экспрессируемых из репертуара или из комбинаторной библиотеки антител (например, человека или мыши). Фаг, используемый в этих способах, обычно представляет собой ничтчатый фаг, такой как fd и M13. Антигенсвязывающие домены экспрессируются в виде белка, рекомбинантно слитого с любым из белков оболочки фага рIII, рVIII или рIX. См., например, Shi et al. (2010) *JMB* 397:385-396. Примеры способов на основе фагового дисплея, которые можно использовать для получения иммуноглобулинов или их фрагментов, описанных в данном документе, включают способы, раскрытые в Brinkman et al. (1995) *J Immunol Methods* 182:41-50; Ames et al. (1995) *J Immunol Methods* 184:177-186; Kettleborough et al. (1994) *Eur J Immunol* 24:952-958; Persic et al. (1997) *Gene* 187:9-18; Burton et al. (1994) *Advances in Immunology* 57:191-280 и в публикациях согласно РСТ №№ WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, и WO 95/20401. Подходящие способы также описаны, например, в патентах США №№ 5698426; 5223409; 5403484; 5580717; 5427908; 5750753; 5821047; 5571698; 5427908; 5516637; 5780225; 5658727; 5733743 и 5969108.

В некоторых вариантах осуществления библиотеки антител фагового дисплея можно получить с использованием мРНК, собранной из В-клеток иммунизированных млекопитающих. Например, образец клеток селезенки, содержащий В-клетки, можно выделить у мышей, иммунизированных полипептидом CD137, как это описано выше. мРНК можно выделить из клеток и из нее синтезировать кДНК с использованием стандартных методик молекулярной биологии. См., например, Sambrook et al. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition," Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Harlow and Lane (1988), выше; Benny K. C. Lo (2004), выше; и Borrebaek (1995), выше. кДНК, кодирующую вариабельные участки полипептидов тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулинов, используют для конструирования библиотеки фагового дисплея. Способы создания такой библиотеки описаны, например, в Merz et al. (1995) *J Neurosci Methods* 62(1-2):213-9; Di Niro et al. (2005) *Biochem J* 388(Pt 3):889-894 и Engberg et al. (1995) *Methods Mol Biol* 51:355-376.

В некоторых вариантах осуществления комбинацию селекции и скрининга можно использовать для идентификации представляющего интерес антитела, например, из популяции гибридных антител или из библиотеки фагового дисплея. Подходящие способы известны в данной области техники и описаны, например, в Hoogenboom (1997) *Trends in Biotechnology* 15:62-70; Brinkman et al. (1995), выше; Ames et al. (1995), выше; Kettleborough et al. (1994), выше; Persic et al. (1997), выше и Burton et al. (1994), выше. На-

пример, множество фагмидных векторов, каждый из которых кодирует слитый белок из белка оболочки бактериофага (например, рIII, рVIII или рIX фага M13) и отличающегося антигенсвязывающего участка, получают с использованием стандартных методик молекулярной биологии, а затем вводят в популяцию бактерий (например, *E. coli*). В некоторых вариантах осуществления экспрессия бактериофага в бактериях может требовать применения хелперного фага. В некоторых вариантах осуществления хелперный фаг не требуется (см., например, Chasteen et al., (2006) *Nucleic Acids Res* 34(21):e145). Фаг, полученный из бактерий, извлекают, а затем приводят в контакт, например, с антигеном-мишенью, связанным с твердой подложкой (иммобилизированным). Фаг также можно приводить в контакт с антигеном в растворе, и комплекс впоследствии связывается с твердой подложкой.

Субпопуляцию антител, подвергнутых скринингу с использованием вышеуказанных способов, можно охарактеризовать по их специфичности и аффинности связывания с конкретным антигеном (например, CD137 человека) с использованием любого иммунологического или биохимического способа, известного в данной области техники. Например, специфическое связывание антитела с CD137 можно определить, например, с использованием иммунологических или биохимических способов, таких как без ограничения анализ ELISA, анализ SPR, анализ иммунопреципитации, аффинная хроматография и равновесный диализ, как это описано выше. Иммунологические анализы, которые можно использовать для анализа иммуносpezifического связывания и перекрестной реактивности антител, включают без ограничения системы конкурентного и неконкурентного анализа с использованием таких методик, как вестерн-блоттинг, RIA, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), иммунологические "сэндвич"-анализы, анализы иммунопреципитации, анализы иммунодиффузии, анализы агглютинации, анализы связывания комплемента, иммунорадиометрические анализы, флуоресцентные иммунологические анализы и иммунологические анализы с белком А. Такие анализы являются рутинными и хорошо известны в данной области техники.

Понятно, что вышеуказанные способы также можно использовать для определения, например, того, что антитело к CD137 не связывается с полноразмерными белками CD137 и/или CD137 человека.

В тех вариантах осуществления, где выбранные аминокислотные последовательности CDR представляют собой короткие последовательности (например, длиной менее 10-15 аминокислот), нуклеиновые кислоты, кодирующие CDR, можно синтезировать химически, как это описано, например, в Shiraiishi et al. (2007) *Nucleic Acids Symposium Series* 51(1): 129-130 и в патенте США № 6995259. В случае указанной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей акцепторное антитело, участок последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей CDR, можно заменить химически синтезированными нуклеиновыми кислотами с использованием стандартных методик молекулярной биологии. 5'- и 3'-концы химически синтезированных нуклеиновых кислот могут быть синтезированы так, чтобы содержать сайты с липкими концами для рестриктаз с целью применения в клонировании нуклеиновых кислот в нуклеиновую кислоту, кодирующую вариативный участок донорного антитела. Альтернативно фрагменты химически синтезированных нуклеиновых кислот, вместе способные кодировать антитело, можно объединить вместе с использованием методик сборки ДНК, известных в данной области техники (например, сборки по Гибсону).

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, содержат измененный константный участок тяжелой цепи, который характеризуется пониженной (или отсутствующей) эффекторной функцией относительно своего соответствующего неизмененного константного участка. Эффекторные функции с участием константного участка антитела к CD137 можно модулировать путем изменения свойств константного или Fc-участка. Измененные эффекторные функции включают, например, модулирование одной или более из следующих активностей:

антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), комплементзависимая цитотоксичность (CDC), апоптоз, связывание с одним или более Fc-рецепторами и провоспалительные ответы. Модулирование относится к увеличению, уменьшению или устранению активности эффекторной функции, проявляемой антителом субъекта, содержащим измененный константный участок, по сравнению с активностью неизмененной формы константного участка. В конкретных вариантах осуществления модулирование включает ситуации, в которых активность устранена или полностью отсутствует.

Измененный константный участок с измененной аффинностью связывания FcR, и/или активностью ADCC, и/или измененной активностью CDC представляет собой полипептид, который обладает повышенной или пониженной активностью связывания FcR, и/или активностью ADCC, и/или активностью CDC по сравнению с неизменной формой константного участка. Измененный константный участок, который проявляет повышенное связывание с FcR, связывается с по меньшей мере одним FcR с большей аффинностью, чем неизмененный полипептид. Измененный константный участок, который проявляет пониженное связывание с FcR, связывается с по меньшей мере одним FcR с более низкой аффинностью, чем неизменная форма константного участка. Такие варианты, которые проявляют пониженное связывание с FcR, могут обладать незначительным связыванием с FcR или оно практически отсутствует, например, от 0 до 50% (например, менее 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1%) связывания с FcR по сравнению с уровнем связывания нативной последовательности константного уча-

стка иммуноглобулина или Fc-участка с FcR. Аналогично измененный константный участок, который проявляет модулированную активность ADCC и/или CDC, может демонстрировать либо повышенную, либо пониженную активность ADCC и/или CDC по сравнению с неизменным константным участком. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, содержащее измененный константный участок, может проявлять примерно 0-50% (например, менее 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1%) активность ADCC и/или CDC неизменной формы константного участка. Описанное в данном документе антитело к CD137, содержащее измененный константный участок, проявляющий пониженную ADCC и/или CDC, может демонстрировать пониженную активность ADCC и/или CDC или вообще не иметь их.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137, описанное в данном документе, демонстрирует пониженную эффекторную функцию или ее отсутствие. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137 содержит гибридный константный участок или его часть, такой как гибридный константный участок G2/G4 (см. например, Burton et al. (1992) *Adv Immunol* 51:1-18; Canfield et al. (1991) *J Exp Med* 173:1483-1491 и Mueller et al. (1997) *Mol Immunol* 34(6):441-452). См. выше.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137 может содержать измененный константный участок, демонстрирующий повышенную или пониженную комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). Модулирования активности CDC можно достичь путем введения одной или более аминокислотных замен, вставок или делеций в Fc-участок антитела. См., например, патент США № 6194551. Альтернативно или дополнительно цистеиновый (цистеиновые) остаток (остатки) можно вводить в Fc-участок, за счет чего обеспечивается образование межцепочечной дисульфидной связи в этом участке. Полученное таким образом гомодимерное антитело может иметь улучшенную или пониженную способность к интернализации и/или повышенный или пониженный комплемент-опосредованный лизис клетки. См., например, Caron et al. (1992) *J Exp Med* 176:1191-1195 и Shopes (1992) *Immunol* 148:2918-2922; публикации согласно PCT №№ WO 99/51642 и WO 94/29351; Duncan and Winter (1988) *Nature* 322:738-40 и патенты США №№ 5648260 и 5624821.

Экспрессия и очистка рекомбинантных антител

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, можно получить с использованием различных методик, известных в области молекулярной биологии и химии белка. Например, нуклеиновую кислоту, кодирующую один или оба полипептида тяжелой и легкой цепей антитела, можно вставить в вектор экспрессии, который содержит транскрипционные и трансляционные регуляторные последовательности, которые включают, например, последовательности промотора, сайты связывания рибосомы, последовательности инициации и остановки транскрипции, последовательности инициации и остановки трансляции, сигнальные последовательности терминатора транскрипции, сигналы полиаденилирования и последовательности энхансера или активатора. Регуляторные последовательности включают промотор и последовательности инициации и остановки транскрипции. Кроме того, вектор экспрессии может включать более одной системы репликации, поэтому он может поддерживаться в двух разных организмах, например, в клетках млекопитающих или насекомых с целью экспрессии и в прокариотическом хозяине с целью клонирования и амплификации.

Существует несколько доступных векторных систем для экспрессии клонированных полипептидов тяжелой цепи и легкой цепи из нуклеиновых кислот в клетках млекопитающих. Один класс векторов основан на интеграции последовательностей требуемых генов в геном клетки-хозяина. Клетки, которые имеют стабильно интегрированную ДНК, можно подвергать отбору путем одновременного введения генов устойчивости к лекарственным средствам, таких как *gpt E.coli* (Mulligan and Berg (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2072) или *Tn5 neo* (Southern and Berg (1982) *Mol Appl Genet* 1:327). Селектируемый маркерный ген можно связывать с последовательностями ДНК гена, подлежащего экспрессии, или вводить в ту же клетку путем котрансфекции (Wigler et al. (1979) *Cell* 16:77). Второй класс векторов использует элементы ДНК, которые придают способность к автономной репликации внехромосомной плазмиде. Эти векторы можно получить из вирусов животных, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота (Sarver et al. (1982) *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:7147), цитомегаловирус, вирус полиомы (Deans et al. (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1292) или вирус SV40 (Lusky and Botchan (1981) *Nature* 293:79).

Векторы экспрессии можно вводить в клетки способом, подходящим для последующей экспрессии нуклеиновой кислоты. Способ введения в значительной степени определяется целевым типом клеток, обсуждаемым ниже. Примеры способов включают осаждение с $CaPO_4$, слияние с липосомами, катионные липосомы, электропорацию, вирусную инфекцию, опосредованную декстраном трансфекцию, опосредованную полибренном трансфекцию, слияние протопластов и прямую микроинъекцию.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов включают клетки дрожжей, бактерий, насекомых, растений и млекопитающих. Особый интерес представляют бактерии, такие как *E.coli*, грибы, такие как *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*, клетки насекомых, такие как SF9, линии клеток млекопитающих (например, линии клеток человека), а также первичные линии клеток.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент можно экспрессировать и выде-

лять у трансгенных животных (например, трансгенных млекопитающих). Например, антитело можно получать в трансгенных млекопитающих, не являющихся человеком (например, грызунов), и выделять из молока, как это описано, например, в Houdebine (2002) *Curr Opin Biotechnol* 13(6):625-629; van Kuik-Romeijn et al. (2000) *Transgenic Res* 9(2):155-159 и Pollock et al. (1999) *J Immunol Methods* 231(1-2):147-157.

Антитела и их фрагменты можно получить из клеток путем культивирования клетки-хозяина, трансформированной вектором экспрессии, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую антитела или фрагменты, в условиях и в течение периода времени, достаточных для обеспечения экспрессии белков. Такие условия для экспрессии белка будут варьироваться в зависимости от выбора вектора экспрессии и клетки-хозяина, и будут легко определены специалистом в данной области техники с помощью рутинных экспериментов. Например, антитела, экспрессируемые в *E.coli*, можно повторно подвергнуть фолдингу из телец-включений (см., например, Hou et al. (1998) *Cytokine* 10:319-30). Бактериальные системы экспрессии и способы их применения хорошо известны в данной области техники (см. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley & Sons, and *Molecular Cloning--A Laboratory Manual --3rd Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)). Выбор кодонов, подходящих векторов экспрессии и подходящих клеток-хозяев будет варьироваться в зависимости от ряда факторов и может быть легко оптимизирован, если это необходимо. Антитело (или его фрагмент), описанные в данном документе, можно экспрессировать в клетках млекопитающих или в других системах экспрессии, включая без ограничения дрожжевые, бакуловирусные и *in vitro* системы экспрессии (см, например, Kaszubska et al. (2000) *Protein Expression and Purification* 18:213-220).

После экспрессии антитела и их фрагменты можно выделить. Антитело или его фрагмент можно выделить или очистить с помощью разных способов, известных специалистам в данной области техники, в зависимости от того, какие еще компоненты присутствуют в образце. Стандартные способы очистки включают электрофоретические, молекулярные, иммунологические и хроматографические методики, включая ионообменную, гидрофобную, аффинную и обращенно-фазовую HPLC хроматографию. Например, антитело можно очистить с использованием стандартной колонки против антител (например, колонка с белком А или белком G). Также применимы методики ультрафильтрации и диалфильтрации в сочетании с концентрированием белка. См., например, Scopes (1994) "*Protein Purification, 3rd edition*," Springer-Verlag, New York City, New York. Степень необходимой очистки будет варьироваться в зависимости от требуемого применения. В некоторых случаях очистка экспрессированного антитела или его фрагментов не потребуется.

Способы определения выхода или чистоты очищенного антитела или его фрагмента известны в данной области техники и включают, например, анализ по Брэдфорду, УФ-спектроскопию, биуретовый анализ белка, анализ белка по Лоури, анализ белка с амидо-черным, высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC) масс-спектрометрию (MS) и гель-электрофоретические методики (например, с использованием красителя для белков, такого как кумасси синий, или окрашивание коллоидным серебром).

Модификация антител или их антигенсвязывающих фрагментов

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно модифицировать после их экспрессии и очистки. Модификации могут быть ковалентными или нековалентными модификациями. Такие модификации можно ввести в антитела или фрагменты путем, например, реакции целевых аминокислотных остатков полипептида с органическим дериватирующим средством, которое способно вступать в реакцию с выбранными боковыми цепями или концевыми остатками. Подходящие сайты для модификации можно выбрать с использованием любого из множества критериев, включая, например, структурный анализ или анализ аминокислотной последовательности антител или фрагментов.

В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно конъюгировать с гетерологичным фрагментом. Гетерологичный фрагмент может быть, например, гетерологичным полипептидом, терапевтическим средством (например, токсином или лекарственным средством) или поддающейся выявлению меткой, такой как без ограничения радиоактивная метка, ферментная метка, флуоресцентная метка, метка тяжелого металла, люминесцентная метка или аффинная метка, такая как биотин или стрептавидин. Подходящие гетерологичные полипептиды включают, например, антигенную метку (например, FLAG (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 98), полигистидин (6-гис; НННННН; SEQ ID NO: 99), гемагглютинин (HA; YPYDVPDYA; SEQ ID NO: 100), глутатион-S-трансферазу (GST) или мальтозосвязывающий белок (MBP)) для применения в очистке антител или фрагментов. Гетерологичные полипептиды также включают полипептиды (например, ферменты), которые применимы в качестве диагностических или поддающихся выявлению маркеров, например, люциферазу, флуоресцентный белок (например, зеленый флуоресцентный белок (GFP)) или хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT). Подходящие радиоактивные метки включают, например, ³²P, ³³P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S и ³H. Подходящие флуоресцентные метки включают без ограничения флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат (FITC), зеленый флуоресцентный белок (GFP), DyLight™ 488, фикоэритрин (PE), пропидия йодид (PI), PerCP, PE-Alexa Fluor® 700, Cy5, аллофикоцианин и Cy7. Люминесцентные метки включают, например, любой из мно-

жества люминесцентных хелатов лантаноидов (например, европия или тербия). Например, подходящие хелаты европия включают хелат европия и диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТРА) или тетрааза-циклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты (ДОТА). Ферментные метки включают, например, щелочную фосфатазу, САТ, люциферазу и пероксидазу хрена.

Два белка (например, антитело и гетерологичный фрагмент) можно сшивать с использованием любого из ряда известных химических сшивающих средств. Примерами таких сшивающих средств являются те, которые связывают два аминокислотных остатка связью, которая включает "затрудненную" дисульфидную связь. В этих связях дисульфидная связь в сшивающем звене защищена (затрудненными группами с обеих сторон дисульфидной связи) от восстановления под воздействием, например, восстановленного глутатиона или фермента дисульфидредуктазы. Один подходящий реагент, 4-сукцинимидилоксикарбонил- α -метил- α (2-пиридилдитио)толуол (SMPT), образует такую связь между двумя белками, используя концевой лизин на одном из белков и концевой цистеин на другом. Также можно использовать гетеробифункциональные реагенты, которые сшивают разные связывающие фрагменты на каждом из белков. Другие применимые сшивающие средства включают без ограничения реагенты, которые связывают две аминогруппы (например, N-5-азидо-2-нитробензоилоксисукцинимид), две сульфгидрильные группы (например, 1,4-бис-малеимидобутан), аминогруппу и сульфгидрильную группу (например, сложный м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный эфир), аминогруппу и карбоксильную группу (например, 4-[п-азидосалициламидо]бутиламин) и аминогруппу и группу гуанидина, присутствующую в боковой цепи аргинина (например, п-азидофенилглиоксаль моногидрат).

В некоторых вариантах осуществления радиоактивную метку можно непосредственно конъюгировать с аминокислотным каркасом антитела. Альтернативно радиоактивную метку можно включить как часть более крупной молекулы (например, ^{125}I в мета-[^{125}I]йодфенил-N-гидроксисукцинимиде ([^{125}I]mIPNHS), который связывается со свободными аминогруппами с образованием метайодфенильных (mIP) производных соответствующих белков (см., например, Rogers et al. (1997) J Nucl Med 38:1221-1229), или хелата (например, с ДОТА или ДТРА), который в свою очередь связан с белковым каркасом. Способы конъюгирования радиоактивных меток или более крупных молекул/хелатов, содержащих их, с антителами или антигенсвязывающими фрагментами, описанными в данном документе, известны в данной области техники. Такие способы включают инкубирование белков с радиоактивной меткой в условиях (например, pH, концентрация соли и/или температура), которые облегчают связывание радиоактивной метки или хелата с белком (см., например, патент США № 6001329).

Способы конъюгирования флуоресцентной метки (иногда называемой "флуорофором") с белком (например, антителом) известны в области химии белка. Например, флуорофоры можно конъюгировать со свободными аминогруппами (например, лизинами) или сульфгидрильными группами (например, цистеинами) белков с использованием фрагментов сложного сукцинимидилового эфира (NHS) или сложного тетрафторфенильного (TFP) эфира, присоединенных к флуорофорам. В некоторых вариантах осуществления флуорофоры можно конъюгировать с гетеробифункциональным сшивающим фрагментом, таким как сульфо-SMCC. Подходящие способы конъюгации включают инкубирование белка антитела или его фрагмента с флуорофором в условиях, которые облегчают связывание флуорофора с белком. См., например, Welch and Redvanly (2003) "Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications," John Wiley and Sons (ISBN 0471495603).

В некоторых вариантах осуществления антитела или фрагменты можно модифицировать, например фрагментом, который улучшает стабильность и/или удержание антител в кровотоке, например, в крови, сыворотке крови или других тканях. Например, антитело или фрагмент можно ПЭГилировать, как это описано, например, в Lee et al. (1999) Bioconjug Chem 10(6): 973-8; Kinstler et al. (2002) Advanced Drug Deliveries Reviews 54:477-485 и Roberts et al. (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54:459-476 или HESилировать (Fresenius Kabi, Germany; см., например, Pavišić et al. (2010) Int J Pharm 387(1-2):110-119). Стабилизирующий фрагмент может улучшать стабильность или удержание антитела (или фрагмента) в по меньшей мере 1,5 раза (например, в по меньшей мере 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 или 50 или больше раз).

В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, можно гликозилировать. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, можно подвергнуть ферментативной или химической обработке или получить из клетки, за счет чего антитело или его фрагмент характеризуется пониженным гликозилированием или его отсутствием. Способы получения антител с пониженным гликозилированием известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 6933368; Wright et al. (1991) EMBO J 10(10):2717-2723 и Co et al. (1993) Mol Immunol 30:1361.

Фармацевтические композиции и составы

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело к CD137 с фармацевтически приемлемыми разбавителем, носителем, растворителем, эмульгатором, консервантом и/или адьювантом.

В определенных вариантах осуществления приемлемые материалы состава предпочтительно нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях. В определенных вариантах осуществления материал(материалы) состава предназначен(предназначены) для подкожного и/или внутривен-

ного введения. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать материалы состава для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмоляльности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проницаемости композиции. В определенных вариантах осуществления подходящие материалы состава включают без ограничения аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин); противомикробные средства; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как борат, бикарбонат, трис-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты); объемобразующие средства (такие как маннит или глицин); хелатирующие средства (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)); комплексообразующие средства (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); красители, ароматизаторы и разбавители; эмульгаторы; гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как хлорид бензалкония, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенэтиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или пероксид водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие средства; поверхностно-активные вещества или смачивающие средства (такие как плуроники, ПЭГ, сложные эфиры сорбита, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат 80, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал); средства, повышающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); средства, повышающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, сорбит, маннит); среды-носители для доставки; разбавители; вспомогательные вещества и/или фармацевтические адьюванты. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1995)). В определенных вариантах осуществления состав содержит PBS; 20 mM NaOAc, pH 5,2, 50 mM NaCl и/или 10 mM NaOAc, pH 5,2, 9% сахарозы. В определенных вариантах осуществления специалист в данной области техники определит оптимальную фармацевтическую композицию в зависимости, например, от предполагаемого пути введения, формата доставки и требуемой дозировки. См., например, выше Remington's Pharmaceutical Sciences. В определенных вариантах осуществления такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и/или скорость выведения *in vivo* антитела к CD137.

В определенных вариантах осуществления основная среда-носитель или носитель в фармацевтической композиции могут быть водным или неводным по природе. Например, в определенных вариантах осуществления подходящими средой-носителем или носителем может быть вода для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственная спинномозговая жидкость, зачастую дополненная другими материалами, общепринятыми в композициях для парентерального введения. В определенных вариантах осуществления физиологический раствор предусматривает изотонический фосфатно-буферный солевой раствор. В определенных вариантах осуществления нейтральный фосфатно-буферный солевой раствор или физиологический раствор, смешанный с сывороточным альбумином, представляют собой дополнительные иллюстративные среды-носители. В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат трис-буфер с pH приблизительно 7,0-8,5 или ацетатный буфер с pH приблизительно 4,0-5,5, которые могут дополнительно включать сорбит или его подходящую замену. В определенных вариантах осуществления композицию, содержащую антитело к CD137, можно подготовить для хранения путем смешивания выбранной композиции, имеющей требуемую степень чистоты, с необязательными средствами для составления (выше Remington's Pharmaceutical Sciences) в форме лиофилизованного осадка или водного раствора. Кроме того, в определенных вариантах осуществления композицию, содержащую антитело к CD137, можно составить в виде лиофилизата с использованием подходящих вспомогательных веществ, таких как сахароза.

В определенных вариантах осуществления можно выбрать фармацевтическую композицию для парентеральной доставки. В определенных вариантах осуществления композиции можно выбрать для ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, например, перорально. Подготовка таких фармацевтически приемлемых композиций находится в пределах компетенции специалиста в данной области техники.

В определенных вариантах осуществления компоненты состава присутствуют в концентрациях, приемлемых для места введения. В определенных вариантах осуществления буферы используют для поддержания композиции при физиологическом pH или несколько более низком pH, обычно в диапазоне pH от приблизительно 5 до приблизительно 8.

В определенных вариантах осуществления, когда предполагается парентеральное введение, фармацевтическая композиция может быть представлена в форме апиrogenного, приемлемого для парентерального введения водного раствора, содержащего антитело к CD137, в фармацевтически приемлемой среде-носителе. В определенных вариантах осуществления средой-носителем для парентеральной инъекции является стерильная дистиллированная вода, в которой антитело к CD137 составлено в виде сте-

рильного изотонического раствора и надлежащим образом консервировано. В определенных вариантах осуществления препарат может включать составление требуемой молекулы с таким средством, как инъекционные микросферы, биоразрушаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), микрогранулы или липосомы, которые могут обеспечивать контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который затем можно доставить путем инъекции в составе депо-препарата. В определенных вариантах осуществления также можно использовать гиалуроновую кислоту, и она может способствовать длительной циркуляции в кровотоке. В определенных вариантах осуществления имплантируемые устройства для доставки лекарственных средств можно использовать для введения требуемой молекулы.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно составить для ингаляции. В определенных вариантах осуществления антитело к CD137 можно составить в виде сухого порошка для ингаляций. В определенных вариантах осуществления ингаляционный раствор, содержащий антитело к CD137, можно составить с пропеллентом для аэрозольной доставки. В определенных вариантах осуществления растворы можно распылять с помощью небулайзера. Легочное введение дополнительно описано в заявке согласно РСТ № РСТ/US94/001875, которая описывает легочную доставку химически модифицированных белков.

В определенных вариантах осуществления предполагается, что составы можно вводить перорально. В определенных вариантах осуществления антитело к CD137, которое вводят таким способом, можно составить с носителями, которые обычно используют при смешивании твердых лекарственных форм, таких как таблетки и капсулы, или без них. В определенных вариантах осуществления капсулу можно разработать для высвобождения активной части состава в конкретном участке желудочно-кишечного тракта, где биодоступность является максимальной и предсистемная деградация сведена к минимуму. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одно дополнительное средство можно включить для облегчения абсорбции антитела к CD137. В определенных вариантах осуществления также можно использовать разбавители, вкусоароматические вещества, воск с низкой температурой плавления, растительные масла, смазывающие средства, суспендирующие средства, средства для улучшения распадаемости таблеток и связующие вещества.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать эффективное количество антитела к CD137 в смеси с нетоксичными вспомогательными веществами, которые подходят для изготовления таблеток. В определенных вариантах осуществления путем растворения таблеток в стерильной воде или другой подходящей среде-носителе, растворы можно приготовить в форме однократной дозы. В определенных вариантах осуществления подходящие вспомогательные вещества включают без ограничения инертные разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат или бикарбонат натрия, лактоза или фосфат кальция; или связующие средства, такие как крахмал, желатин или аравийская камедь; или смазывающие средства, такие как стеарат магния, стеариновая кислота или тальк.

Специалистам в данной области техники будут очевидны дополнительные фармацевтические композиции, в том числе составы, включающие антитело к CD137 в составах с замедленной или контролируемой доставкой. В определенных вариантах осуществления специалистам в данной области техники также известны методики составления ряда других средств, обеспечивающих замедленную или контролируемую доставку, таких как липосомные носители, биоразрушаемые микрочастицы или пористые микрогранулы, и инъекции депо-препарата. См., например, заявку согласно РСТ № РСТ/US93/00829, которая описывает контролируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц с целью доставки фармацевтических композиций. В определенных вариантах осуществления препараты с замедленным высвобождением могут включать полупроницаемые полимерные матрицы в форме определенных изделий, например, пленок или микрокапсул. Матрицы с замедленным высвобождением могут включать сложные полиэфиры, гидрогели, полилактиды (патент США № 3773919 и EP 058481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., *Biopolymers*, 22:547-556 (1983)), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 (1981) и Langer, *Chem. Tech.*, 12:98-105 (1982)), этиленвинилацетат (Langer et al., выше) или поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту (EP 133988). В определенных вариантах осуществления композиции с замедленным высвобождением могут также включать липосомы, которые можно получить с помощью любого из нескольких способов, известных в данной области техники. См., например, Eppstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688-3692 (1985); EP 036676; EP 088046 и EP 143949.

Фармацевтическая композиция для применения *in vivo* обычно является стерильной. В определенных вариантах осуществления этого можно достичь путем фильтрации через мембраны для стерилизующей фильтрации. В определенных вариантах осуществления, где композиция лиофилизирована, стерилизацию с использованием этого способа можно проводить либо до, либо после лиофилизации и восстановления. В определенных вариантах осуществления композицию для парентерального введения можно хранить в лиофилизированной форме или в растворе. В определенных вариантах осуществления парентеральные композиции обычно помещают в контейнер, имеющий стерильное отверстие для доступа, например, пакет для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, прокалываемую иглой для подкожных инъекций.

В определенных вариантах осуществления, как только составление фармацевтической композиции было завершено, ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества или в виде дегидратированного или лиофилизированного порошка. В определенных вариантах осуществления такие составы можно хранить либо в готовой для применения форме, либо в форме (например, лиофилизированной), которую восстанавливают перед введением.

В определенных вариантах осуществления представлены наборы для получения дозы для однократного приема. В определенных вариантах осуществления набор может содержать как первый контейнер с сухим белком, так и второй контейнер с водным составом. В определенных вариантах осуществления включены наборы, содержащие одно- и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидкостью и шприцы с лиофилизатом).

В определенных вариантах осуществления эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей антитело к CD137, предназначенного для применения в терапии будет зависеть, например, от условий терапии и целей. Специалист в данной области техники поймет, что соответствующие уровни доз для лечения в соответствии с определенными вариантами осуществления, таким образом будут варьироваться, частично в зависимости от доставляемой молекулы, показания для использования антитела к CD137, пути введения и размера (массы тела, поверхности тела или размера органа) и/или состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента. В определенных вариантах осуществления практикующий врач может подобрать дозировку и изменить способ введения для получения оптимального терапевтического эффекта.

В определенных вариантах осуществления для частоты введения доз будут учитывать фармакокинетические параметры антитела к CD137 в используемом составе. В определенных вариантах осуществления практикующий врач будет вводить композицию до тех пор, пока не будет достигнута дозировка, приводящая к достижению требуемого эффекта. В определенных вариантах осуществления композицию, таким образом, можно вводить в виде однократной дозы или в виде двух или более доз (которые могут содержать одинаковое или разное количество требуемой молекулы) с течением времени, или в виде непрерывной инфузии через имплантированное устройство или катетер. Дополнительное уточнение подходящей дозировки обычно проводится специалистами в данной области техники и находится в рамках задач, выполняемых ими рутинно. В определенных вариантах осуществления подходящие дозировки можно определить путем применения соответствующих данных зависимости доза-ответ.

В определенных вариантах осуществления путь введения фармацевтической композиции соответствует известным способам, например, пероральному, внутривенному, внутрибрюшному, интрацеребральному (интрапаренхимальному), интрацеребровентрикулярному, внутримышечному, подкожному, внутриглазному, внутриартериальному, интрапортальному или внутриочаговому инъекционному путям введения; с помощью систем замедленного высвобождения или имплантированных устройств. В определенных вариантах осуществления композиции можно вводить путем болюсной инъекции или непрерывно путем инфузии или с помощью имплантированного устройства. В определенных вариантах осуществления отдельные элементы комбинированной терапии можно вводить разными путями.

В определенных вариантах осуществления композиции можно вводить местно путем имплантации мембраны, губки или другого подходящего материала, на котором требуемая молекула была абсорбирована или инкапсулирована. В определенных вариантах осуществления, когда используют имплантированное устройство, его можно имплантировать в любые подходящие ткань или орган, а доставку требуемой молекулы можно осуществлять посредством диффузии, болюса с замедленным высвобождением или непрерывного введения. В определенных вариантах осуществления может быть желательным использование *ex vivo* фармацевтической композиции, содержащей антитело к CD137. В таких случаях клетки, ткани и/или органы, которые были удалены у пациента, подвергают воздействию фармацевтической композиции, содержащей антитело к CD137, после чего клетки, ткани и/или органы впоследствии имплантируют обратно пациенту.

В определенных вариантах осуществления антитело к CD137 можно доставить путем имплантации определенных клеток, которые были генетически сконструированы с использованием таких способов, которые описаны в данном документе, с целью экспрессии и секреции данных полипептидов. В определенных вариантах осуществления такие клетки могут представлять собой клетки животных или человека и могут быть аутологичными, гетерологичными или ксеногенными. В определенных вариантах осуществления клетки могут быть иммортализованы. В определенных вариантах осуществления для того, чтобы уменьшить вероятность иммунного ответа, клетки можно инкапсулировать с тем, чтобы избежать инфильтрации окружающими тканями. В определенных вариантах осуществления материалы для инкапсуляции, как правило, представляют собой биосовместимые, полупроницаемые полимерные оболочки или мембраны, которые позволяют высвободить белковый (белковые) продукт (продукты), но предотвращают разрушение клеток иммунной системой пациента или другими вредными факторами из окружающих тканей.

Варианты применения

Композиции, описанные в данном документе, можно использовать с целью диагностики и терапии. Например, поддающиеся выявлению меченые антигенсвязывающие молекулы можно использовать в

анализах для выявления присутствия или количества антигенов-мишеней в образце (например, биологическом образце). Композиции можно использовать в анализах *in vitro* для изучения подавления функции антигена-мишени (например, CD137-опосредованной клеточной передачи сигналов или ответа). В некоторых вариантах осуществления, например, в которых композиции связывают и активируют целевой антиген (например, белок или полипептид), композиции можно использовать в качестве положительного контроля в анализах, предназначенных для идентификации дополнительных новых соединений, которые также индуцируют активность целевого белка или полипептида и/или иным образом применимы для лечения нарушения, ассоциированного с целевым белком или полипептидом. Например, композицию, активирующую CD137, можно использовать в качестве положительного контроля в анализе для выявления дополнительных соединений (например, малых молекул, аптамеров или антител), которые индуцируют, повышают или стимулируют функцию CD137. Композиции также можно использовать в способах терапии, как это описано ниже.

Наборы

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлен набор, содержащий антитело к CD137, описанное в данном документе. В некоторых вариантах осуществления набор включает антитело к CD137, раскрытое в данном документе, и инструкции для его применения. Наборы могут содержать в подходящем контейнере антитело к CD137, один или более контролей и разные буферы, реагенты, ферменты и другие стандартные ингредиенты, хорошо известные в данной области техники.

Контейнер может включать по меньшей мере один флакон, лунку, пробирку, колбу, бутылку, шприц или другое вмещающее средство, в котором может размещаться антитело к CD137, а в некоторых случаях соответствующим образом расфасовано на аликвоты. Если представлен дополнительный компонент, набор может содержать дополнительные контейнеры, в которые можно поместить этот компонент. Наборы могут также включать средства для содержания антитела к CD137 и любые другие герметично закрытые контейнеры с реагентами, предназначенные для коммерческой продажи. Такие контейнеры могут включать пластмассовые контейнеры, полученные литьем под давлением или выдувным формованием, в которые помещают необходимые флаконы. Контейнеры и/или наборы могут включать маркировку с инструкциями по применению и/или предупреждениями.

В некоторых вариантах осуществления набор включает контейнер, содержащий антитело к CD137 и фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтическую композицию, содержащую антитело к CD137, и инструкции для лечения или замедления прогрессирования рака или уменьшения или подавления роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта. В некоторых вариантах осуществления набор включает контейнер, содержащий антитело к CD137 и фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтическую композицию, содержащую антитело к CD137, и инструкции по введению антитела к CD137 нуждающемуся в этом субъекту по отдельности или в комбинации с другим средством с целью лечения или замедления прогрессирования рака или уменьшения или подавления роста опухоли у субъекта.

Способы применения

Композиции по настоящему изобретению обладают множеством полезных функций *in vitro* и *in vivo*, включающих выявление и/или количественную оценку CD137 и/или агонизма функции CD137.

Описанные выше композиции применимы, в частности, в способах лечения или профилактики различных видов рака у субъекта. Композиции можно вводить субъекту, например человеку, с использованием множества способов, которые частично зависят от пути введения. Путь может представлять собой, например, внутривенную инъекцию или инфузию (в/в), подкожную инъекцию (п/к), интраперитонеальную инъекцию (и/п), внутримышечную инъекцию (в/м) или интракавальную инъекцию (и/т). Инъекция может быть в виде болюса или непрерывной инфузии.

Введение может быть достигнуто, например, путем местной инфузии, инъекции или с помощью имплантата. Имплантат может быть из пористого, непористого или желатинового материала, включая мембраны, такие как силиконовые мембраны, или волокна. Имплантат может быть выполнен с возможностью длительного или периодического высвобождения композиции у субъекта. См., например, публикацию заявки на патент США № 20080241223; патенты США №№ 5501856; 4863457 и 3710795; EP 488401 и EP 430539, раскрытие каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Композицию можно доставить субъекту посредством имплантируемого устройства на основе, например, диффузионных, разрушаемых или конвекционных систем, например, осмотических насосов, биоразлагаемых имплантатов, электродиффузионных систем, электроосмотических систем, струйных насосов, электролитических насосов, выделяющих газ насосов, пьезоэлектрических насосов, эрозийных систем или электромеханических систем.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент доставляют субъекту путем местного введения с целью терапии.

Подходящая доза антитела или его фрагмента, описанных в данном документе, которая способна лечить или предотвращать рак у субъекта, может зависеть от множества факторов, включая, например, возраст, пол и массу субъекта, подлежащего лечению, и конкретное используемое ингибиторное соединение. Например, для лечения субъекта с раком может потребоваться иная доза полного антитела к

CD137 по сравнению с дозой CD137-связывающего Fab-фрагмента антитела, которая требуется для лечения того же субъекта. Другие факторы, влияющие на дозу, вводимую субъекту, включают, например, тип или тяжесть рака. Например, субъекту с метастатической меланомой может потребоваться введение иной дозы антитела к CD137, чем субъекту с глиобластомой. Другие факторы могут включать, например, другие болезни, одновременно или ранее поражающие субъекта, общее состояние здоровья субъекта, генетическую предрасположенность субъекта, рацион, время введения, скорость выведения, комбинацию лекарственных средств и любые другие дополнительные терапевтические средства, которые вводят субъекту. Следует также понимать, что конкретная доза и схема лечения для любого конкретного субъекта также будут зависеть от решения лечащего врача (например, врача или медсестры). Подходящие дозы описаны в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, эффективны как в высоких, так и в низких дозах.

Фармацевтическая композиция может включать терапевтически эффективное количество антитела к CD137 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе. Такие эффективные количества могут легко определить обычный специалист в данной области техники, исходя частично из эффекта вводимого антитела или сочетательного эффекта антитела и одного или более дополнительных активных средств, если используют более одного средства. Терапевтически эффективное количество антитела или его фрагмента, описанного в данном документе, также может варьироваться в зависимости от таких факторов, как патологическое состояние, возраст, пол и масса индивидуума, а также от способности антитела (и одного или более дополнительных активных средств) вызывать требуемый ответ у индивидуума, например, снижение роста опухоли. Например, терапевтически эффективное количество антитела к CD137 может подавлять (уменьшать тяжесть или исключать распространение) и/или предотвращать конкретное нарушение и/или любой из симптомов конкретного нарушения, известного в данной области техники или описанного в данном документе. Терапевтически эффективное количество также относится к такому количеству, при котором терапевтически благоприятные эффекты превосходят любые токсичные или вредные эффекты композиции.

Подходящие для человека дозы любого из антител или их фрагментов, описанных в данном документе, можно дополнительно оценить, например, в исследованиях фазы I с повышением дозы. См., например, van Gurp et al. (2008) *Am J Transplantation* 8(8): 1711-1718; Hanouska et al. (2007) *Clin Cancer Res* 13(2, part 1):523-531 и Hetherington et al. (2006) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(10): 3499-3500.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит любое из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, и одного или более (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, 10 или 11 или более) дополнительных терапевтических средств, за счет чего композиция в целом является терапевтически эффективной. Например, композиция может содержать антитело к CD137, описанное в данном документе, и алкилирующее средство, где антитело и средство присутствуют в концентрации, каждая из которых в комбинации является терапевтически эффективной для лечения или предотвращения рака (например, меланомы) у субъекта.

Токсичность и терапевтическую эффективность таких композиций можно определить с помощью известных фармацевтических процедур на клеточных культурах или экспериментальных животных (например, на животных моделях любой из форм рака, описанного в данном документе). Эти процедуры можно использовать, например, для определения LD₅₀ (дозы, летальной для 50% популяции) и ED₅₀ (дозы, терапевтически эффективной у 50% популяции). Соотношение доз для токсических и терапевтических эффектов представляет собой терапевтический индекс и его можно выразить как соотношение LD₅₀/ED₅₀. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые демонстрируют высокий терапевтический индекс, являются предпочтительными. Поскольку могут использоваться композиции, которые проявляют токсические побочные эффекты, следует позаботиться о разработке системы для доставки, которая нацеливает такие соединения на участок пораженной ткани и сводит к минимуму потенциальное повреждение нормальных клеток и таким образом уменьшает побочные эффекты.

Данные, полученные в анализах с клеточными культурами и в исследованиях на животных, можно использовать при подборе диапазона доз для применения у людей. Доза таких антител или их антигенсвязывающих фрагментов обычно находится в диапазоне циркулирующих концентраций антител или фрагментов, которые включают ED₅₀ с низкой токсичностью или без нее. Доза может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от используемых лекарственной формы и пути введения. В случае антитела к CD137, описанного в данном документе, терапевтически эффективную дозу можно исходно определить по результатам анализов с клеточными культурами. Доза может быть составлена для животных моделей с целью получения диапазона циркулирующей концентрации в плазме крови, которая включает EC₅₀ (т.е. концентрацию антитела, которая обеспечивает полумаксимальное подавление симптомов), что определено в клеточной культуре. Такую информацию можно использовать для более точного определения применимых у людей доз. Уровни в плазме крови можно измерять, например, при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления, например там, где требуется местное введение (например, в глаз или сустав), для определения дозы, необходимой для достижения терапевтически эффективной концентрации в локальном участке, можно использовать клеточную культуру или моделирование на животных.

В некоторых вариантах осуществления способы можно осуществлять в сочетании с другими способами терапии рака. Например, композицию можно вводить субъекту одновременно с лучевой терапией, хирургическим вмешательством, целевой или цитотоксической химиотерапией, химиолучевой терапией, гормональной терапией, иммунотерапией, генной терапией, терапией с использованием трансплантации клеток, индивидуализированной медициной, терапией с редактированием генома или другой фармакотерапией, до или после нее.

Как описано выше, композиции, описанные в данном документе (например, композиции, направленные против CD137), можно использовать для лечения разных видов рака, таких как без ограничения: саркома Капоши, лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, миелобластный промиелоцитарный миеломоноцитарный моноцитарный эритролейкоз, хронический лейкоз, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, лимфома из клеток мантийной зоны, первичная лимфома центральной нервной системы, лимфома Беркитта и В-клеточная лимфома из клеток краевой зоны, истинная полицитемия, лимфома, болезнь Ходжкина, неходжкинская болезнь, множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, плотные опухоли, саркомы и карциномы, фибросаркома, микосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, остеосаркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, саркома толстого кишечника, колоректальная карцинома, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточный рак, базальноклеточный рак, аденокарцинома, карцинома потовых желез, карцинома сальных желез, папиллярная карцинома, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, почечно-клеточная карцинома, гепатома, карцинома желчных протоков, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак матки, опухоль яичка, карцинома легкого, мелкоклеточная карцинома легкого, немелкоклеточная карцинома легкого, карцинома мочевого пузыря, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, акустическая неврома, олигодендроглиома, менингиома, меланома, нейробластома, ретинобластома, карцинома носоглотки, карцинома пищевода, базально-клеточная карцинома, рак желчных путей, рак мочевого пузыря, рак кости, рак головного мозга и центральной нервной системы (ЦНС), рак шейки матки, хориокарцинома, формы колоректального рака, рак соединительной ткани, рак пищеварительной системы, рак эндометрия, рак пищевода, рак глаза, рак головы и шеи, рак желудка, интраэпителиальное новообразование, рак почки, рак гортани, рак печени, рак легкого (мелкоклеточный, крупноклеточный), меланома, нейробластома; рак полости рта (например, губы, языка, рта и глотки), рак яичника, рак поджелудочной железы, ретинобластома, рабдомиосаркома, рак прямой кишки; рак респираторной системы, саркома, рак кожи, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак матки и рак мочевыделительной системы.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, можно вводить субъекту в виде монотерапии. Альтернативно, как описано выше, антитело или его фрагмент можно вводить субъекту в виде комбинированной терапии с другим средством для лечения, например, другим средством для лечения рака. Например, комбинированная терапия может включать введение субъекту (например, пациенту-человеку) одного или более дополнительных средств, которые обеспечивают терапевтическую пользу субъекту, у которого имеется рак или риск развития рака. Химиотерапевтические средства, подходящие для совместного введения с композициями по настоящему изобретению, включают, например: таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидий бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантранциндон, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дигидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин и их аналоги или гомологи. Дополнительные средства включают, например, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин), алкилирующие средства (например, мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU), ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромоманнитол, стрептозотоцин, митомицин С, цис-дихлордиамин платина (II) (DDP), прокарбазин, алтретамин, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, недаплатин, сатраплатин или триплатин тетранитрат), антрациклин (например, даунорубин (ранее дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномцин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (AMC)), и антимитотические средства (например, винкристин и винбластин), и темозоломид. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137 и одно или более дополнительных активных средств вводят одновременно. В других вариантах осуществления антитело к CD137 вводят первым по времени, а одно или более дополнительных активных средств вводят вторыми по времени. В некоторых вариантах осуществления одно или более дополнительных активных средств вводят первыми по времени, а антитело к CD137 вводят вторым по времени.

Антитело к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, могут заменять или усиливать ранее или в настоящее время проводимую терапию. Например, после лечения антителом к CD137 или его антигенсвязывающим фрагментом введение одного или более дополнитель-

ных активных средств может быть прекращено или уменьшено, например, их можно вводить при более низких уровнях или дозах. В некоторых вариантах осуществления проведение предшествующей терапии можно продолжать. В некоторых вариантах осуществления предшествующую терапию можно продолжать до тех пор, пока уровень антитела к CD137 не достигнет уровня, достаточного для обеспечения терапевтического эффекта. Два вида лечения можно проводить в комбинации.

Проведение мониторинга субъекта (например, пациента-человека) на предмет улучшения при раке, как это определено в данном документе, означает оценку субъекта на предмет изменения параметра заболевания, например, уменьшения роста опухоли. В некоторых вариантах осуществления обследование проводят через по меньшей мере один (1) час, например, через по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 24 или 48 часов, или через по меньшей мере 1 день, 2 дня, 4 дня, 10 дней, 13 дней, 20 дней или больше, или через по меньшей мере 1 неделю, 2 недели, 4 недели, 10 недель, 13 недель, 20 недель или больше после введения. Провести обследование субъекта можно в одном или более из следующих периодов: до начала лечения; в ходе лечения; или после введения одного или более элементов лечения. Обследование может включать оценку необходимости дальнейшего лечения, например, оценку того, следует ли изменить дозу, частоту введения или продолжительность лечения. Это может также включать оценку необходимости добавления или исключения выбранного терапевтического режима, например, добавление или исключение любого из способов лечения рака, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, вводят с целью модулирования Т-клеточного ответа у пациента, например, путем повышения активации и/или пролиферации Т-клеток. Сшивание CD137 сильно повышает пролиферацию Т-клеток, продуцирование и секрецию IFN γ и цитолитическую активность Т-клеток. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антитело-агонист к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению вводят нуждающемуся в этом пациенту с целью индуцирования или повышения активации Т-клеток, повышения пролиферации Т-клеток, индуцирования продуцирования и/или секреции IFN γ и/или индуцирования цитолитического Т-клеточного ответа.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, применимы для модулирования или сдвига популяции Т-клеток у пациента от популяции Т-клеток T_H2/T_{reg} к популяции Т-клеток T_H1/T_H17, чтобы тем самым улучшить или повысить противоопухолевый ответ у пациента. Исследования показали, что хотя CD137 экспрессируется в обеих субпопуляциях Т-клеток, Th1- и Th2-клетках, CD137 экспрессируется на более высоких уровнях в CD8⁺ Т-клетках, чем в CD4⁺ Т-клетках. Соответственно, CD137 главным образом костимулирует CD8⁺ Т-клетки. Соответственно, антитело к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе, вводят пациенту для повышения противоопухолевого ответа, например, путем модулирования или сдвига Т-клеточного ответа и/или популяции Т-клеток у пациента от Т-клеточного ответа и/или популяции Т-клеток T_H2/T_{reg} к Т-клеточному ответу и/или популяции Т-клеток T_H1/T_H17 у пациента.

При некоторых формах рака (например, меланоме и раке яичника) естественные опухолеинфильтрирующие лимфоциты (TIL) можно обогатить с помощью оптимизированных способов культивирования клеток, и они могут служить источником опухоlereактивных лимфоцитов, полезных для адоптивной иммунотерапии. Адоптивная терапия TIL может привести к длительной регрессии опухоли при некоторых типах рака, что требует разработки и оптимизации основанных на TIL подходов в отношении рака. В настоящее время идентификация и размножение естественных опухоlereактивных TIL остается сложной задачей из-за низкого уровня и/или малой распространенности антигенспецифических CD8⁺ Т-клеток. Экспрессия CD137 Т-клетками зависит от активации, что обеспечивает возможность захвата активированных CD137-экспрессирующих Т-клеток из кровотока или из образцов опухоли. Соответственно, антитело к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, можно использовать для селективного обогащения активированных антигенспецифических Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления эффективность антител к CD137, описанных в данном документе, зависит от компетентной иммунной системы. В частности, в некоторых вариантах осуществления истощение CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток и/или естественных клеток-киллеров уменьшает эффективность антител к CD137. В некоторых вариантах осуществления истощение CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток и/или естественных клеток-киллеров снижает подавление или уменьшение роста опухоли, опосредованное антителами к CD137, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления истощение CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток и/или естественных клеток-киллеров снижает подавление или уменьшение роста опухоли, опосредованное антителами к CD137, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления эффективность антител к CD137, описанных в данном документе, зависит от инфильтрации иммунными клетками микроокружения опухоли. В некоторых вариантах осуществления инфильтрация иммунными клетками микроокружения опухоли сопровождается отсутствием инфильтрации селезенки и/или печени.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, индуцируют защитный противоопухолевый иммунный ответ памяти. Т-клетки памяти представляют собой под-

группу антигенспецифических Т-клеток, которые сохраняются в течение длительного времени после того, как столкнулись с их когнатным антигеном и среагировали на него. Такие клетки быстро размножаются до больших количеств эффекторных клеток при повторном воздействии их когнатного антигена. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, стимулируют продуцирование Т-клеток памяти к раковому антигену. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, который получил антитело к CD137, описанное в данном документе, для лечения или излечения рака развиваются Т-клетки памяти, специфичные к данному раку. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, который получил антитело к CD137, описанное в данном документе, для лечения или излечения рака развивается противоопухолевый иммунный ответ памяти при повторном воздействии данного рака. В некоторых вариантах осуществления противоопухолевый иммунный ответ памяти включает стимулирование Т-клеток памяти к превращению в эффекторные клетки. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, который получил антитело к CD137, описанное в данном документе, для лечения или излечения рака развивается противоопухолевый иммунный ответ памяти на раковый антиген.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137, описанные в данном документе, индуцируют перепрограммирование иммунитета с участием микроокружения опухоли. В частности, в некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 индуцируют иммунную инфильтрацию; уменьшают, подавляют или предотвращают пролиферацию Treg; уменьшают, подавляют или предотвращают опухолеассоциированную пролиферацию макрофагов и защищают от истощения Т-клеток или вызывают его регресс.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 индуцируют инфильтрацию иммунными клетками родственного микроокружения опухоли. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 повышают инфильтрацию иммунными клетками на по меньшей мере 5%, на по меньшей мере 10%, на по меньшей мере 15%, на по меньшей мере 20%, на по меньшей мере 25%, на по меньшей мере 30%, на по меньшей мере 35%, на по меньшей мере 40%, на по меньшей мере 45%, на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 100%, на по меньшей мере 105%, на по меньшей мере 110%, на по меньшей мере 115%, на по меньшей мере 120%, на по меньшей мере 125%, на по меньшей мере 130%, на по меньшей мере 135%, на по меньшей мере 140%, на по меньшей мере 145% или на по меньшей мере 150%. В некоторых вариантах осуществления инфильтрацию иммунных клеток определяют путем измерения уровня экспрессии CD45 на клетках, выделенных из микроокружения опухоли. Способы измерения экспрессии белка известны специалистам в данной области техники и описаны в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 предотвращают или подавляют увеличение количества клеток Treg в микроокружении опухоли. В некоторых вариантах осуществления предотвращение или подавление происходит относительно количества клеток Treg в микроокружении опухоли в отсутствие антитела к CD137. В некоторых вариантах осуществления предотвращение или подавление увеличения количества клеток Treg происходит относительно эталонного антитела. В некоторых вариантах осуществления клетки Treg выявляют по экспрессии CD25 и FOXP3 на CD4⁺ Т-клетках, выделенных из микроокружения опухоли. Способы измерения экспрессии белка известны специалистам в данной области техники и описаны в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 предотвращают или подавляют увеличение количества опухолеассоциированных макрофагов в микроокружении опухоли. В некоторых вариантах осуществления предотвращение или подавление происходит относительно количества опухолеассоциированных макрофагов в микроокружении опухоли в отсутствие антитела к CD137. В некоторых вариантах осуществления предотвращение или подавление увеличения количества опухолеассоциированных макрофагов происходит относительно эталонного антитела. В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированные макрофаги выявляют по экспрессии CD11b и F4/80 на CD45⁺ иммунных клетках, выделенных из микроокружения опухоли. Способы измерения экспрессии белка известны специалистам в данной области техники и описаны в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 защищают Т-клетки от истощения Т-клеток в микроокружении опухоли. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 вызывают регрессию истощения Т-клеток в микроокружении опухоли. В некоторых вариантах осуществления истощение Т-клеток в микроокружении опухоли снижается в присутствии антитела к CD137, описанного в данном документе, по сравнению с микроокружением опухоли в отсутствие антитела к CD137. В некоторых вариантах осуществления истощение Т-клеток определяют путем анализа CD8⁺ Т-клеток или CD4⁺ Т-клеток на предмет экспрессии коингибиторных рецепторов (например, PD-1, TIGIT или LAG-3). В некоторых вариантах осуществления истощение Т-клеток выявляют по экспрессии PD-1 и TIGIT на CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетках, выделенных из микроокружения опухоли.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD137 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, можно использовать в способах выявления и/или количественного опре-

деления CD137 человека в биологическом образце. Соответственно, антитела к CD137 или их антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, используют для диагностики, прогнозирования и/или определения прогрессирования заболевания (например, рака) у пациента.

Другие варианты осуществления

E1. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывает CD137 человека, или его антигенсвязывающая часть, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, выбранные из группы, состоящей из:

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 70, 79 и 90 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 71, 80 и 91 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 72, 81 и 92 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 73, 82 и 91 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 74, 83 и 93 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 75, 84 и 91 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 74, 85 и 94 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 76, 86 и 95 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 77, 87 и 93 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 88 и 90 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 49, 57 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 49, 58 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 49, 59 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 49, 60 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 50, 61 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 50, 58 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 51, 62 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 52, 63 и 68

соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 50, 64 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 50, 65 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 51, 108 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно;

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 107, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно; и

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 109, 110 и 92 соответственно.

E2. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывает CD137 человека, или его антигенсвязывающая часть, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, где вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 101 и 103; и где вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 и 105.

E3. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывает CD137 человека, или его антигенсвязывающая часть, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, где CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 68.

E4. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывает CD137 человека, или его антигенсвязывающая часть, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 4 и 28 соответственно;
 SEQ ID NO: 4 и 30 соответственно;
 SEQ ID NO: 4 и 32 соответственно;
 SEQ ID NO: 4 и 34 соответственно;
 SEQ ID NO: 4 и 36 соответственно;
 SEQ ID NO: 4 и 38 соответственно;
 SEQ ID NO: 4 и 40 соответственно;
 SEQ ID NO: 4 и 42 соответственно;
 SEQ ID NO: 4 и 44 соответственно;
 SEQ ID NO: 4 и 46 соответственно;
 SEQ ID NO: 8 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 10 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 12 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 14 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 16 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 18 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 20 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 22 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 24 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 26 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 101 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 103 и 6 соответственно и
 SEQ ID NO: 4 и 105 соответственно.

E5. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывает CD137 человека, или его антигенсвязывающая часть, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, где вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 101 и 103; и где вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ

ID NO: 6, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 и 105.

E6. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывает CD137 человека, или его антигенсвязывающая часть, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат переменные участки тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые на по меньшей мере 90% идентичны аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 4 и 28 соответственно;
 SEQ ID NO: 4 и 30 соответственно;
 SEQ ID NO: 4 и 32 соответственно;
 SEQ ID NO: 4 и 34 соответственно;
 SEQ ID NO: 4 и 36 соответственно;
 SEQ ID NO: 4 и 38 соответственно;
 SEQ ID NO: 4 и 40 соответственно;
 SEQ ID NO: 4 и 42 соответственно;
 SEQ ID NO: 4 и 44 соответственно;
 SEQ ID NO: 4 и 46 соответственно;
 SEQ ID NO: 8 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 10 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 12 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 14 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 16 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 18 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 20 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 22 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 24 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 26 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 101 и 6 соответственно;
 SEQ ID NO: 103 и 6 соответственно и
 SEQ ID NO: 4 и 105 соответственно.

E7. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывает CD137 человека, или его антигенсвязывающая часть, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, где CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 68.

E8. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывает CD137 человека, или его антигенсвязывающая часть, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, где CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность DXXXXLXXXXYXYX, где X представляет собой любую аминокислоту.

E9. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывает CD137 человека, или его антигенсвязывающая часть, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, где CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность DXPFXLDXXYYYYYX, где X представляет собой любую аминокислоту.

E10. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывает CD137 человека, или его антигенсвязывающая часть, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, где CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность DXXXXLXXXXYXYX, где X представляет собой любую аминокислоту за исключением аланина.

E11. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывает CD137 человека, или его антигенсвязывающая часть, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, где CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность DXPFXLDXXYYYYYX, где X представляет собой любую аминокислоту за исключением аланина.

E12. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывает CD137 человека, или его антигенсвязывающая часть, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, где CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность DXXXXLXXXXYXYX, где X представляет собой любую аминокислоту, и где мутация остатков D95, L100, Y100E, Y100G, Y100H или их комбинаций приводит к потере связывания с CD137 человека.

E13. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывает CD137 человека, или его антигенсвязывающая часть, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, где CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность DXPFXLDXXYYYYYX, где X представляет собой любую аминокислоту, и где мутация с заменой на аланин остатков P97, F98, D100A, Y100D, Y100F или их комбинаций приводит к снижению связывания с CD137 человека.

E14. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывает CD137 человека, или

его антигенсвязывающая часть, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, где CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность DXPFXLXXYYYYX, где X представляет собой любую аминокислоту, и где мутация остатков P97, F98, D100A, Y100D, Y100F или их комбинаций с заменой на любой остаток за исключением аланина приводит к повышению связывания с CD137 человека.

E15. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывает CD137 человека, или его антигенсвязывающая часть, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, где CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность DX₁X₂X₃X₄LX₅X₆X₇X₈YX₉YYX₁₀, где X₁ представляет собой любую аминокислоту, где X₂ представляет собой неполярную аминокислоту, где X₃ представляет собой неполярную аминокислоту, где X₄ представляет собой любую аминокислоту, где X₅ представляет собой полярную аминокислоту, где X₆ представляет собой любую аминокислоту, где X₇ представляет собой любую аминокислоту, где X₈ представляет собой полярную аминокислоту, где X₉ представляет собой полярную аминокислоту, и где X₁₀ представляет собой любую аминокислоту.

E16. Выделенное моноклональное антитело согласно варианту осуществления 15, где X₂ представляет собой пролин, где X₃ представляет собой фенилаланин или триптофан, где X₅ представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту, где X₈ представляет собой тирозин, и где X₉ представляет собой тирозин.

E17. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из вариантов осуществления 8-16, где антитело или его антигенсвязывающая часть перекрестно конкурируют с mAb1.

E18. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из вариантов осуществления 8-16, где антитело или его антигенсвязывающая часть перекрестно конкурируют с mAb1, mAb8 или mAb10.

E19. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из вариантов осуществления 8-18, где антитело или его антигенсвязывающая часть проявляют по меньшей мере функциональные свойства mAb1.

E20. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из вариантов осуществления 8-18, где антитело или его антигенсвязывающая часть проявляют по меньшей мере функциональные свойства mAb1, mAb8 или mAb10.

E21. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из вариантов осуществления 8-20, где антитело или его антигенсвязывающая часть характеризуются значением K_D, которое по меньшей мере эквивалентно такому значению у mAb1.

E22. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из вариантов осуществления 8-20, где антитело или его антигенсвязывающая часть характеризуются значением K_D, которое по меньшей мере эквивалентно такому значению у mAb1, mAb8 или mAb10.

E23. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где при связывании с CD137 человека выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть связываются с по меньшей мере одним из аминокислотных остатков, связанных mAb1 или антигенсвязывающим фрагментом mAb1.

E24. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD137 человека, где при связывании с CD137 человека выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть: (i)

связываются с по меньшей мере одним из аминокислотных остатков, связанных mAb1 или антигенсвязывающим фрагментом mAb1, и (ii) проявляют функцию агониста CD137 человека.

E25. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из вариантов осуществления 23-24, где аминокислотные остатки, содержащие эпитоп, связываемый антителом, расположены в пределах 4 ангстрем от аминокислотных остатков, содержащих паратоп антитела mAb1.

E26. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из вариантов осуществления 23-25, где мутация эпитопа, связываемого антителом, подавляет, уменьшает или блокирует связывание как с данным антителом, так и с антителом mAb1.

E27. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывает CD137 человека, или его антигенсвязывающая часть, где антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 40-100 нМ.

E28. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывает CD137 человека, или его антигенсвязывающая часть, где

(i) антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 40-100 нМ, и

(ii) антитело или антигенсвязывающая часть содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DXXXXLXXXXYXX, где X представляет собой любую аминокислоту.

E29. Выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывает CD137 человека, или

его антигенсвязывающая часть, где

(i) антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 40-100 нМ, и

(ii) антитело или антигенсвязывающая часть содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность $DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$, где X_1 представляет собой любую аминокислоту, где X_2 представляет собой неполярную аминокислоту, где X_3 представляет собой неполярную аминокислоту, где X_4 представляет собой любую аминокислоту, где X_5 представляет собой полярную аминокислоту, где X_6 представляет собой любую аминокислоту, где X_7 представляет собой любую аминокислоту, где X_8 представляет собой полярную аминокислоту, где X_9 представляет собой полярную аминокислоту, и где X_{10} представляет собой любую аминокислоту.

E30. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно варианту осуществления 27, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность $DXPFXLDXXYYYYYX$, где X представляет собой любую аминокислоту.

E31. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов осуществления 28-30, где мутация остатков D95, L100, Y100E, Y100G, Y100H или их комбинаций в CDR3 тяжелой цепи приводит к потере связывания с CD137 человека.

E32. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из вариантов осуществления 28-31, где мутация с заменой на аланин остатков P97, F98, D100A, Y100D, Y100F или их комбинаций приводит к снижению связывания с CD137 человека.

E33. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из вариантов осуществления 28-31, где мутация остатков P97, F98, D100A, Y100D, Y100F или их комбинаций с заменой на любой остаток за исключением аланина приводит к повышению связывания с CD137 человека.

E34. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из вариантов осуществления 28 и 29-33, где X представляет собой любую аминокислоту за исключением аланина.

E35. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из вариантов осуществления 29 и 31-33, где X_2 представляет собой пролин, где X_3 представляет собой фенилаланин или триптофан, где X_5 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту, где X_8 представляет собой тирозин, и где X_9 представляет собой тирозин.

E36. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где антитело или антигенсвязывающая часть связывают CD137 человека с аффинностью (K_D), составляющей приблизительно 45-95 нМ, 50-90 нМ, 55-85 нМ, 60-80 нМ, 65-75 нМ, 55-75 нМ, 40-70 нМ, 50-80 нМ или 60-90 нМ.

E37. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из вариантов осуществления 27-36, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, где CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 68.

E38. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из вариантов осуществления 27-37, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат CDR тяжелой и легкой цепей, выбранные из группы, состоящей из:

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно; и

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 51, 108 и 68 соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно.

E39. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из вариантов осуществления 27-37, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат переменные участки тяжелой и легкой цепей, где

вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 101; и где вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6.

E40. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из вариантов осуществления 27-37, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат переменные участки тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно и

SEQ ID NO: 101 и 6 соответственно.

E41. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из вариантов осуществления 27-37, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат переменные

участки тяжелой и легкой цепей, где вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 101; и где вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

E42. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из вариантов осуществления 27-37, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые на по меньшей мере 90% идентичны аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из:

- SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно и
- (b) SEQ ID NO: 101 и 6 соответственно.

E43. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связывают и CD137 человека и выступают в качестве его агониста.

E44. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где антитело или его антигенсвязывающая часть проявляют по меньшей мере одно или более из следующих свойств:

- индуцируют или повышают димеризацию тримеров CD137;
- индуцируют или повышают мультимеризацию тримеров CD137;
- индуцируют или повышают опосредованную CD137 человека активацию Т-клеток;
- индуцируют или повышают опосредованный CD137 человека цитотоксический Т-клеточный ответ;
- индуцируют или повышают опосредованную CD137 человека пролиферацию Т-клеток;
- индуцируют или повышают опосредованное CD137 человека продуцирование цитокинов;
- не вызывают значительное индуцирование или повышение внутрипеченочной и/или внутриселезеночной активации Т-клеток и/или пролиферации Т-клеток;
- связываются с CD137 человека с равновесной константой диссоциации K_D 1×10^{-6} или меньше, или любой комбинации свойств, приведенных в (a)-(h).

E45. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно варианту осуществления 44, где антитело или его антигенсвязывающая часть индуцируют или повышают опосредованную CD137 человека активацию Т-клеток в микроокружении опухоли, но не вызывают значительного индуцирования или повышения опосредованной CD137 человека активации Т-клеток в селезенке и/или печени.

E46. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно варианту осуществления 44, где антитело или его антигенсвязывающая часть индуцируют или повышают опосредованный CD137 человека цитотоксический Т-клеточный ответ в микроокружении опухоли, но не вызывают значительного индуцирования или повышения опосредованного CD137 человека цитотоксического Т-клеточного ответа в селезенке и/или печени.

E47. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно варианту осуществления 44, где антитело или его антигенсвязывающая часть индуцируют опосредованную CD137 человека пролиферацию Т-клеток в микроокружении опухоли, но не вызывают значительного индуцирования или повышения опосредованной CD137 человека пролиферации Т-клеток в селезенке и/или печени.

E48. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно варианту осуществления 44, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют или повышают опосредованное CD137 человека продуцирование цитокинов в микроокружении опухоли, но не вызывает значительного индуцирования или повышения опосредованного CD137 человека продуцирования цитокинов в селезенке и/или печени.

E49. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из вариантов осуществления 44-48, где свойства антитела или его антигенсвязывающей части не зависят от связывания Fc-рецептора.

E50. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из вариантов осуществления 44-49, где свойства антитела или его антигенсвязывающей части повышаются за счет связывания с Fc-рецептором.

E51. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где антитело или его антигенсвязывающая часть вступают в перекрестную реакцию с CD137 яванского макака и/или CD137 мыши.

E52. Выделенное моноклональное антитело-агонист, которое связывается с CD137 человека и проявляет по меньшей мере одно из следующих свойств:

- индуцируют или повышают димеризацию тримеров CD137;
- индуцируют или повышают мультимеризацию тримеров CD137 человека;

индуцируют или повышают опосредованную CD137 человека активацию Т-клеток в микроокружении опухоли, но без значительного индуцирования или повышения опосредованной CD137 человека активации Т-клеток в селезенке и/или печени;

индуцируют или повышают опосредованный CD137 человека цитотоксический Т-клеточный ответ в микроокружении опухоли, но не без значительного индуцирования или повышения опосредованного CD137 человека цитотоксического Т-клеточного ответа в селезенке и/или печени;

индуцируют или повышают опосредованное CD137 человека продуцирование цитокинов в микроокружении опухоли, но без значительного индуцирования или повышения опосредованного CD137 человека продуцирования цитокинов в селезенке и/или печени;

индуцируют или повышают опосредованную CD137 человека пролиферацию Т-клеток в микроокружении опухоли, но без значительного индуцирования или повышения опосредованной CD137 человека пролиферации Т-клеток в селезенке и/или печени;

связываются с CD137 человека с равновесной константой диссоциации K_D 1×10^{-6} или меньше, или любой комбинации свойств, приведенных в (а)-(г).

E53. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где антитело выбрано из группы, состоящей из антитела IgG1, IgG2 и IgG3, и IgG4, и IgM, и IgA1, и IgA2, и IgD и IgE.

E54. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть согласно варианту осуществления 53, где антитело представляет собой IgG1-антитело или IgG4-антитело.

E55. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающую часть согласно любому из предыдущих вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель.

E56. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь, тяжелую цепь или как легкую, так и тяжелую цепи выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части согласно любому из вариантов осуществления 1-54.

E57. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту согласно варианту осуществления 56.

E58. Клетка, трансформированная вектором экспрессии согласно варианту осуществления 57.

E59. Способ обеспечения продуцирования моноклонального антитела, которое специфически связывает CD137 человека, или его антигенсвязывающей части, при этом способ предусматривает поддержание клетки согласно варианту осуществления 58 в условиях, обеспечивающих возможность экспрессии моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части.

E60. Способ согласно варианту осуществления 59, дополнительно предусматривающий получение моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части.

E61. Способ индуцирования или повышения димеризации тримеров CD137 человека у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части согласно любому из вариантов осуществления 1-54 или фармацевтической композиции согласно варианту осуществления 55.

E62. Способ индуцирования или повышения мультимеризации тримеров CD137 человека у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части согласно любому из вариантов осуществления 1-54 или фармацевтической композиции согласно варианту осуществления 55.

E63. Способ индуцирования или повышения активации Т-клеток, опосредованной CD137 человека, у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части согласно любому из вариантов осуществления 1-54 или фармацевтической композиции согласно варианту осуществления 55.

E64. Способ согласно варианту осуществления 63, где активация Т-клеток осуществляется в микроокружении опухоли.

E65. Способ согласно варианту осуществления 63, где активация Т-клеток в селезенке и/или печени субъекта, по сути, не осуществляется.

E66. Способ индуцирования или повышения цитотоксического Т-клеточного ответа, опосредованного CD137 человека, у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части согласно любому из вариантов осуществления 1-54 или фармацевтической композиции согласно варианту осуществления 55.

E67. Способ согласно варианту осуществления 66, где цитотоксический Т-клеточный ответ осуществляется в микроокружении опухоли.

E68. Способ согласно варианту осуществления 66, где цитотоксический Т-клеточный ответ в селезенке и/или печени субъекта, по сути, не осуществляется.

E69. Способ индуцирования или повышения продуцирования цитокинов, опосредованного CD137 человека, у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части согласно любому из вариантов осуществления 1-54 или фармацевтической композиции согласно варианту осуществления

55.

E70. Способ согласно варианту осуществления 69, где продуцируемый цитокин представляет собой IL-2, TNF α , IL-13, IFN γ или их комбинации.

E71. Способ согласно варианту осуществления 69 или варианту осуществления 70, где продуцирование цитокинов осуществляется в микроокружении опухоли.

E72. Способ согласно варианту осуществления 69 или варианту осуществления 70, где продуцирование цитокинов в селезенке и/или печени субъекта, по сути, не осуществляется.

E73. Способ индуцирования или повышения пролиферации Т-клеток, опосредованной CD137 человека, у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части согласно любому из вариантов осуществления 1-54 или фармацевтической композиции согласно варианту осуществления 55.

E74. Способ согласно варианту осуществления 73, где пролиферация Т-клеток осуществляется в микроокружении опухоли.

E75. Способ согласно варианту осуществления 73, где пролиферация Т-клеток в селезенке и/или печени субъекта, по сути, не осуществляется.

E76. Способ уменьшения или подавления роста опухоли, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части согласно любому из вариантов осуществления 1-54 или фармацевтической композиции согласно варианту осуществления 55.

E77. Способ лечения нарушения, опосредованного CD137 человека, у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части согласно любому из вариантов осуществления 1-54 или фармацевтической композиции согласно варианту осуществления 55.

E78. Способ лечения рака у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части согласно любому из вариантов осуществления 1-54 или фармацевтической композиции согласно варианту осуществления 55.

E79. Способ согласно варианту осуществления 78, где рак выбран из группы, состоящей из меланомы, глиомы, рака почки и рака головы и шеи.

E80. Способ согласно любому из вариантов осуществления 76-79, где антитело или его антигенсвязывающая часть связывают Fc-гамма-рецептор.

E81. Способ согласно любому из вариантов осуществления 76-80, где истощение CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, естественных клеток-киллеров или их комбинаций уменьшает эффективность антитела или его антигенсвязывающей части.

E82. Способ выявления присутствия или отсутствия CD137 человека в биологическом образце, предусматривающий:

приведение в контакт биологического образца с антителом по любому из вариантов осуществления 1-54, где антитело помечено поддающимся выявлению веществом; и

(ii) выявление антитела, связанного с CD137 человека, за счет чего осуществляется выявление присутствия или отсутствия CD137 человека в биологическом образце.

Примеры

Хотя настоящее изобретение было описано со ссылкой на его конкретные варианты осуществления, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что могут быть проведены различные изменения и могут быть заменены эквиваленты без отклонения от истинного смысла и объема настоящего изобретения. Кроме того, можно осуществить ряд модификаций с целью адаптации конкретной ситуации, материала, состава вещества, процесса, стадии или стадий процесса к объекту, сущности и объему настоящего раскрытия. Предполагается, что все такие модификации входят в объем настоящего изобретения.

Пример 1. Синтетические моноклональные антитела человека, полученные в дрожжах, проявляют связывание с рекомбинантным CD137 человека.

Очищенный белковый антиген CD137 биотинилировали с использованием набора EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation (Thermo Scientific). Антигены CD137 концентрировали до ~1 мг/мл, и буфер заменяли на PBS перед добавлением реагента для биотинилирования в молярном соотношении 1:7,5 (набор EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation, Thermo Scientific, кат. № 21425). Смесь выдерживали при 4°C в течение ночи перед другой заменой буфера с целью удаления свободного биотина из раствора. Биотинилирование подтверждали с помощью связывания меченых белков со стрептавидиновым сенсором на ForteBio. Успешное биотинилирование белкового антигена CD137 подтверждали с помощью поддающегося выявлению связывания со стрептавидиновым биосенсором, установленным на интерферометре ForteBio Octet™ Red384 (Pall ForteBio, Менло Парк, Калифорния) в соответствии с рекомендациями производителя (данные не показаны).

Получали восемь наивных библиотек на основе дрожжей для человеческих синтетических антител,

каждую из которых сконструировали с разнообразием $\sim 10^9$, и размножали, как это описано ранее (ADDIN EN.CITE <EndNote><Cite><Author>Xu</Author><Year>2013</Year><RecNum>35</RecNum><DisplayText><style font="Helvetica" size="12">(Xu, 2013)</style></DisplayText><recordxrec-number>35</rec-number><foreign-keysxkeyapp="EN" db-id="fv90ssaa0rtzw3e095wxwxemss5exaftf29v">35</keyx/foreign-keysxref-typename="Journal Article">17</ref-type><contributors><authors><author><style face="normal" font="Helvetica" size="12">Xu, Y., Roach, W., Sun T., Jain T., Prinz B., Yu T., Torrey J., Thomas J., Bobrowicz P., Vasquez M., Wittrup, KD., Krauland E</style></author></authors></contributors><titles><title><style face="normal" font="Helvetica" size="12">Addressing polyspecificity of antibodies selected from in vitro display platforms - A FACS-based, high throughput selection and analytical tool</style></title><secondary-title><style face="normal" font="Helvetica" size="12">Protein engineering, design & selection : PEDS</style></secondary-title></titles><dates><year><style face="normal" font="Helvetica" size="12">2013</style></year></dates><urls></urls></record></Citex/EndNote>см., например, WO 2009036379; WO 2010105256; WO 2012009568; Xu et al., Protein Eng Des Sel. 2013 Oct;26(10):663-70). Проводили восемь параллельных отборов с использованием восьми наивных библиотек против биотинилированного гибрида CD137 человека-Fc.

В первых двух циклах отбора проводили методику сортировки с магнитными гранулами с использованием системы Miltenyi MACS, как описано, по сути, (Siegel et al., J Immunol Methods. 2004 Mar;286(1-2):141-53). Вкратце, дрожжевые клетки ($\sim 10^{10}$ клеток/библиотека) инкубировали с 10 мл 10 нМ биотинилированного слитого антигена CD137 человека-Fc в течение 15 минут при комнатной температуре в промывочном буфере для FACS PBS с 0,1% BSA. После однократной промывки 50 мл ледяного промывочного буфера клеточный осадок ресуспендировали в 40 мл промывочного буфера и к дрожжам добавляли 500 мкл микрогранул со стрептавидином Streptavidin MicroBeads (Miltenyi Biotec, Бергиш Гладбах, Германия, кат. № 130-048-101) и инкубировали в течение 15 минут при 4°C. Затем дрожжи осаждали, ресуспендировали в 5 мл промывочного буфера и загружали в колонку MACS LS (Miltenyi Biotec, Бергиш Гладбах, Германия, кат. № 130-042-401). После загрузки 5 мл колонку трижды промывали 3 мл промывочного буфера FACS. Затем колонку удаляли из магнитного поля и дрожжи элюировали 5 мл питательной среды, а затем выращивали в течение ночи.

После двух циклов MACS проводили три цикла сортировки с использованием проточной цитометрии (FACS), которые описаны в следующих трех параграфах.

Стратегия отбора с использованием 8 параллельных отборов с антигеном-Fc.

Восемь библиотек из отборов с помощью MACS отбирали на протяжении трех циклов отборов с помощью FACS. Приблизительно 1×10^8 дрожжей на библиотеку осаждали, трижды промывали промывочным буфером и инкубировали с 10 нМ биотинилированного гибрида CD137 человека-Fc и 10 нМ биотинилированного гибрида антигена CD137 мыши-Fc по отдельности в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем дрожжи дважды промывали и окрашивали козьим антителом к человеческому F(ab')₂ каппа-FITC, разведенным 1:100 (Southern Biotech, Бирмингем, Алабама, кат. № 2062-02), и вторичными реагентами: либо стрептавидином-Alexa Fluor 633 (Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, кат. № S21375), разведенным 1:500, или экстравидином-фикоэртирином (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, кат. № E4011), разведенным 1:50, в течение 15 минут при 4°C. После двухкратной промывки ледяным промывочным буфером клеточные осадки ресуспендировали в 0,4 мл промывочного буфера и переносили в пробирки с крышками с сетчатым фильтром. Сортировку проводили с использованием сортировщика FACS ARIA (BD Biosciences), и сортировочные гейты задавали только с целью отбора связывания CD137. Отобранные популяции мышиных и человеческих антигенов из первого цикла FACS переносили в следующий цикл.

Второй и третий циклы FACS для вышеупомянутых отобранных популяций включал положительную сортировку на связывающихся с реагентами для CD137 человека и/или мыши; или отрицательную сортировку для снижения связывающихся с полиспецифическим реагентом (Xu et al., PEDS. 2013 Oct;26(10):663-70). В зависимости от величины полиспецифического связывания или целевого связывания конкретного результата отбора, после отрицательной сортировки следовала положительная сортировка, или наоборот, для обогащения популяции полного связывания с ограниченным количеством полиспецифического связывания. Также проводили конкурентные отборы с контрольными mAb, известными из литературы. Для конкурентных отборов предварительно получали комплекс mAb4 (урелумаб; Bristol-Myers Squibb; номер CAS: 934823-49-1) и mAb5 (утомилумаб; Pfizer; номер CAS: 1417318-27-4) с биотинилированным гибридом CD137 человека-Fc. Антитела, которые связываются и не связываются в присутствии контрольных mAb, отбирали для FACS. Продукты, полученные в этих циклах, высевали и изоляты отбирали для секвенирования и определения характеристик.

Созревание аффинности клонов, идентифицированных в наивных отборах.

Тяжелые цепи, полученные в первом цикле сортировки FACS против продуктов, представляющих собой биотинилированные гибриды CD137 человека-Fc, использовали для получения библиотек разнообразия легкой цепи, использованных для четырех дополнительных циклов отбора. В первом из этих циклов отбора в качестве антигена использовали гранулы Miltenyi MAC, конъюгированные с 10 нМ биотинилированного гибрида CD137 человека-Fc.

После отбора с гранулами MAC проводили три цикла сортировки FACS. В первом из этих циклов использовали биотинилированный гибрид CD137 человека-Fc в количестве 10 нМ. Второй цикл FACS для вышеуказанного включал положительную сортировку для связывающихся с реагентами CD137 мыши, конкурентную сортировку с ранее упомянутыми контрольными mAb или отрицательную сортировку для уменьшения связывающихся с полиспецифическим реагентом, как это описано выше. Третий и последний цикл отбора FACS проводили с использованием биотинилированного гибрида CD137 мыши-Fc при 10 нМ или биотинилированного мономерного CD137 человека при 50 нМ. Отдельные колонии из каждого цикла отбора FACS, описанного выше, собирали для определения характеристик с помощью секвенирования.

Получение и очистка IgG и Fab.

Клоны дрожжей выращивали до насыщения, а затем их индуцировали в течение 48 часов при 30°C при встряхивании. После индуцирования дрожжевые клетки осаждали и супернатанты собирали для очистки. IgG очищали с использованием колонки с белком А и элюировали уксусной кислотой, pH 2,0. Fab-фрагменты получали путем расщепления папаином и очищали на аффинной матрице CaptureSelect IgG-CH1 (LifeTechnologies, кат. № 1943200250).

Пример 2. Биннинг эпитопов и определение аффинности человеческого антитела к CD137 к рекомбинантному CD137.

Биннинг эпитопов для антител, выделенных в примере 1, проводили в системе Forte Bio Octet Red384 (Pall Forte Bio Corporation, Менло Парк, Калифорния) с использованием стандартного анализа связывания в сэндвич-формате. IgG контрольные антитела к CD137 загружали на сенсоры AHQ, а незанятые Fc-связывающие сайты на сенсоре блокировали нерелевантным человеческим антителом на основе IgG1. Затем сенсоры подвергали воздействию 100 нМ целевого антигена с последующим воздействием выделенными антителами, идентифицированными, как это описано в примере 1. Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения ForteBio для анализа данных версии 7.0. Дополнительное связывание вторым антителом после ассоциации антигена указывает на незанятый эпитоп (не конкурент), в то время как отсутствие связывания указывает на блокирование эпитопа (конкурент) (данные не показаны).

Аффинность антител к CD137 определяли путем измерения их кинетических констант (k_a , k_d , K_D) на ForteBio Octet. Измерения аффинности на ForteBio проводили, главным образом, как это описано ранее (Estep et al., MAbs. 2013 5(2):270-8). Вкратце, измерения аффинности на ForteBio выполняли путем загрузки антител (IgG) в интерактивном режиме на сенсоры AHQ. Сенсоры уравнивали в автономном режиме в буфере для анализа в течение 30 минут, а затем осуществляли их мониторинг в интерактивном режиме в течение 60 секунд для установления исходного уровня. С целью измерения avidного связывания сенсоры с нагруженными IgG подвергали воздействию 100 нМ антигена (CD137 человека, яванского макака или мыши) в течение 3 минут, после чего их переносили в буфер для анализа на 3 минуты для измерения скорости диссоциации. Измерения моновалентного связывания получали путем загрузки гибрида CD137 человека-Fc на сенсоры AHQ с последующим воздействием 200 нМ Fab-антитела в растворе. Данные кинетики аппроксимировали с использованием модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения для анализа данных, предоставленного ForteBio (данные не показаны).

Также проводили оценку того, блокировали ли антитела лиганд. В частности, эксперименты по блокированию лигандов проводили как на Octet HTX (ForteBio), так и на MX96 SPRi без меток (Carterra). mAb1 иммобилизовали на сенсоре Octet или сенсорном чипе MX96. CD137 и CD137L последовательно наносили на сенсоры, предварительно нагруженные mAb1. Увеличение ответа при воздействии CD137L указывает на отсутствие конкуренции между mAb1 и CD137L за связывание с CD137. С другой стороны, отсутствие изменения сигнала указывало на конкуренцию, которая имела место в случае контрольного антитела mAb5. mAb1 не ингибировало связывание CD137L с CD137 (данные не показаны) и поэтому считалось антителом, не блокирующим лиганд.

Пример 3. Распределение по аффинностям связывания антител к CD137 с созревшей аффинностью.

Антитела к CD137 с созревшей аффинностью получали с использованием 2 мутантных библиотек. Первая библиотека содержала мутации в тяжелой цепи, а вторая библиотека содержала мутации в легкой цепи, в результате чего было получено разнообразие доноров в CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи. Мутантные библиотеки подвергли 3 циклам фагового пэннинга, направленного на повышение аффинности и сохранение перекрестной реактивности с CD137 мыши. В каждом цикле после первоначального связывания с биотинилированными антигенами использовали конкурентную стадию на скорость диссоциации (т.е. 1-часовая инкубация с избытком немеченого антигена или исходного IgG при 37°C).

Для полученных антител к CD137 из разных циклов отбора строили двойные логарифмические диаграммы k_d/k_a . Кажущиеся кинетические константы скорости ассоциации и диссоциации (значения k_a и k_d) определяли с помощью ридера SPRi (MX96, Carterra) в рабочем буфере PBS-T 0,01%. Антитела к CD137 человека ковалентно наносили посредством "печати" на микрочип 50L из карбоксиметилдекстранового гидрогеля (Xantec bioanalytics) на CFM (Carterra). Свежеприготовленные и перемешанные активизирующие реагенты (150 мл 0,4 М EDC и 150 мл 0,1 М сульфо-NHS в H₂O) использовали для активации поверхности субстрата SPR в течение 7 минут. Антитела в концентрации 10 мг/мл в буферном растворе уксусной

кислоты pH 4,5 использовали для нанесения посредством "печати" в течение 15 минут. Распечатанный чип затем гасили на ридере SPRi (MX96, Cytiva) с 1 М этаноламином в течение 15 минут. С целью проведения кинетических анализов последовательно вводили очищенный рекомбинантный CD137 человека (0, 2,05, 5,12, 12,8, 32, 80, 200, 500 нМ) с гис-меткой. Для каждой концентрации проводили 5 минут с целью ассоциации, а затем 10 минут с целью диссоциации. Данные обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения SPR Inspection Tool and Scrubber. Кинетические данные сопоставляли с промежуточными контрольными точками и дважды привязывали к буферному циклу, а затем глобально аппроксимировали к модели связывания 1:1, чтобы определить их кажущиеся кинетические константы скорости ассоциации и диссоциации (значения k_a и k_d). Соотношение k_d/k_a использовали для получения значения K_D каждого взаимодействия антиген/mAb, т.е. $K_D = k_d/k_a$.

Антитела с K_D (k_d/k_a) 10-20 нМ показаны в виде треугольников с перевернутой вверх вершиной, тогда как антитела с K_D ниже 10 нМ показаны в виде треугольников с перевернутой вниз вершиной (фиг. 1). Созревание аффинности только тяжелых цепей (верхние панели) или только легких цепей (нижние панели) дало выделение антител к CD137 с более высокой аффинностью связывания, чем у исходного антитела (mAb1) (фиг. 1). Вариабельные участки тяжелой цепи и легкой цепи mAb1 изложены под SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно.

Пример 4. Идентификация содержащих критические для связывания остатки CDR3 тяжелой цепи (CDRH3) антител к CD137.

Чтобы определить, какие аминокислотные остатки в CDRH3 являются критическими для связывания mAb1 с полипептидами CD137 мыши и человека, проводили сканирование аланином. Создали набор полинуклеотидов, кодирующих производные открытой рамки считывания mAb1, где каждое производное содержало одну замену остатком аланина в положении аминокислотного остатка дикого типа, содержащегося в CDRH3. Каждое из положений D95-M100I из SEQ ID NO: 4 подвергали мутации в аланин путем замены кодона дикого типа на кодон аланина GCC. Аминокислотные последовательности каждого CDRH3 каждого замещенного аланином производного mAb1 изложены под SEQ ID NO: 111-125. Полинуклеотиды, кодирующие каждое из 15 замещенных аланином производных mAb1, индивидуально клонировали в вектор экспрессии (аглико-IgG1, DID-2600) с помощью Gibson Assembly. Каждое из замещенных аланином производных mAb1 экспрессировали и очищали с использованием стандартных методов, известных в данной области техники. Аффинности связывания каждого замещенного аланином производного mAb1 для CD137 человека и мыши определяли с помощью измерений кинетики SPR Watch для CD137 человека (huCD137) или анализов равновесного связывания клеток для CD137 мыши (mCD137).

В табл. 1 приведены рассчитанные константы диссоциации (K_D) для каждого мутанта. Если в таблице отмечено "Слабое", то имело место измеримое связывание выше фонового, но с недостаточной достоверностью при аппроксимации кривой для присвоения точного значения K_D . В табл. 1 "NB" означает, что не наблюдалось связывание в ходе определения аффинности связывания, и указывает, какие замены аланином в CDRH3 давали антитело, которое не связывалось с CD137.

Таблица 1

Аффинность связывания (K_D) клонов со сканированием аланином для CD137 человека и мыши

Замена	huCD137	mCD137	Замена	huCD137	mCD137
D95A	NB	NB	Y(100C)A	1 нМ	25 нМ
S96A	1,8 нМ	40 нМ	Y(100D)A	<i>Слабое</i>	170 нМ
P97A	<i>Слабое</i>	<i>Слабое</i>	Y(100E)A	NB	NB
F98A	<i>Слабое</i>	<i>Слабое</i>	Y(100F)A	<i>Слабое</i>	<i>Слабое</i>
L99A	2,7 нМ	33 нМ	Y(100G)A	NB	NB
L100A	NB	NB	Y(100H)A	NB	NB
D(100A)A	<i>Слабое</i>	<i>Слабое</i>	M(100I)A	1,8 нМ	21 нМ
D(100B)A	1,3 нМ	54 нМ	WT K_D	1 нМ	11 нМ

Сохранение, ослабление или потеря аффинности связывания в результате мутаций с заменой на аланин позволили определить, какие остатки требуются для связывания CD137, а какие остатки допускают мутации. На фиг. 2 подытожены данные связывания для сканирования аланином CDRH3 с идентификатором аминокислоты дикого типа, указанным в каждом положении. Положения CDRH3 имеют цветовую кодировку на основе эффектов мутации положения с заменой на аланин, как это показано. Этот анализ дал следующую консенсусную последовательность: DXPFXLXYYYYXX. Когда выделенные жирным шрифтом остатки в консенсусной последовательности мутировали с заменой на аланин, происходила полная потеря связывания, следовательно, данные остатки требуются для связывания mAb1 с CD137. Когда выделенные курсивом остатки в консенсусной последовательности мутировали с заменой

на аланин, антитело по-прежнему могло связываться с CD137, но с более слабой аффинностью, указывая на то, что данные остатки отчасти играли роль в связывании, но не являлись абсолютно необходимыми. Когда остатки в положениях, обозначенных X в консенсусной последовательности, мутировали с замеченой на аланин, то изменения аффинности связывания практически отсутствовали. Таким образом, эти остатки допускали мутации и не были критическими для связывающего взаимодействия.

Пример 5. Картирование эпитопа с помощью сканирования насыщающим мутагенезом и сравнения гомологов.

Функциональное картирование эпитопа CD137 путем сканирования библиотеки насыщающего мутагенеза и сравнения гомологии проводили с целью идентификации остатков, играющих важную роль для связывания антитела с CD137. Создали комбинаторные библиотеки мутантов CD137 с единичными точечными мутациями во всех положениях остатков для каждой возможной аминокислотной замены за исключением цистеина, и проводили тестирование их способности связываться с mAb1, mAb4 и mAb5. Библиотеку, состоящую из генов, кодирующих каждый точечный мутант CD137, синтезировали у коммерческого поставщика и клонировали в вектор экспрессии дисплея на основе клеток млекопитающего. Дисплей на основе клеток млекопитающего использовали для презентирования библиотеки вариантов внеклеточных доменов CD137 человека, при этом каждый вариант имел по меньшей мере одну точечную мутацию относительно дикого типа CD137 человека.

Библиотеку клеток, демонстрирующих варианты CD137, окрашивали перекрывающимися антителами (i) mAb4 и mAb1 или (ii) mAb4 и mAb5. Популяции клеток со сниженным связыванием с одним антителом, но не с другими, обогащали с помощью FACS. Каждую популяцию секвенировали с помощью секвенирования Illumina с целью идентификации мутаций в положениях, которые специфически нарушали связывание с каждым антителом, но не влияли на правильный фолдинг CD137 или связывание с перекрывающимся антителом.

В случае mAb1 K114 идентифицировали как наиболее важный остаток, играющий важную роль для связывания с CD137, с 34% происходящих в этом положении мутаций от всех наблюдаемых мутаций и всех наблюдаемых аминокислотных замен. E111, T113 и P135 также важны для связывания с 10% мутаций, наблюдаемых в каждом из этих положений. Кроме того, N126 и I132 выявляли в популяции, которая характеризовалась частичным снижением связывания для mAb1. На фиг. 3А показаны остатки, составляющие эпитоп для mAb1, mAb4 и mAb5. mAb4 и mAb5 имели эпитопы связывания, которые отличались от эпитопа для mAb1. В случае mAb4 N42 был наиболее важным остатком с 50% всех мутаций, наблюдаемых в этом положении, за которым следовали R41 и D38. В случае mAb5 I132 был наиболее важным с 32% всех мутаций, наблюдаемых в этом положении, за которым следовали N126, G96, K114 и L95.

Точечные мутанты, выделенные при скрининге библиотеки, экспрессировали в виде растворимых белков и тестировали на связывание с mAb1. Все 4 мутации, протестированные в K114 (R, E, N, T), устраняли связывание с mAb1. Мутации в T113 и P135 также нарушали связывание. 1/2 точечных мутантов по E111, 1/3 мутантов по N126 и 1/4 мутантов по I132 не демонстрировали связывания. Аналогично 3/3 мутантов по N42 не связывались с mAb4, а 3/4 мутантов по I132 не связывались с mAb5.

Кроме того, гомологи CD137 тестировали на их связывание с mAb1. mAb1 способно связываться с CD137 мыши, но не с CD137 крысы, что показано на фиг. 3В. Чтобы определить, имело ли место различие в остатках, составляющих эпитоп для mAb1, между CD137 мыши и CD137 крысы аминокислотные последовательности гомологов CD137 человека, яванского макака, крысы и мыши выравнивали с целью сравнения. Все аминокислотные остатки, составляющие эпитоп mAb1, присутствуют у человека, яванского макака и мыши, но не у крысы. Лизин 114 (K114) в последовательности CD137 человека, а также соответствующий лизин в последовательностях CD137 яванского макака и мыши представляет собой глутаминовую кислоту (E) в последовательности CD137 крысы, что дополнительно указывает на то, что K114 в последовательности CD137 человека является по меньшей мере одним из ключевых остатков связывания для mAb1.

На фиг. 3С и 3D показана кристаллическая структура CD137 человека, связанного с CD137L (Bitra A et al., J Biol Chem 2018, 293 (26): 9958-9969), где остатки E111, T113, K114 и P135 показаны в виде сфер. Видно, что данные остатки расположены вдали от домена, связывающего лиганд CD137 (CD137L), показанный серым цветом.

Пример 6. Влияние антител к CD137 на регуляторы иммунитета и CD8⁺ Т-клетки у мышей.

Три антитела к CD137, полученные в примере 1, mAb1, mAb2 и mAb3, дополнительно анализировали на предмет их эффективности. Эти антитела характеризовались перекрестной реактивностью с мышиными и содержали константные участки человеческого изотипа IgG4, содержащие мутацию S228P для предотвращения перетасовки Fab. Моноклональное антитело 3H3, которое, как известно, стимулирует передачу сигналов CD137 мыши *in vivo* и вызывает противоопухолевый иммунитет (Melego et al. (1997) Nature Medicine 3(6):682-685; Uno et al. (2006) Nature Medicine 12(6):693-696), использовали в качестве препарата сравнения (BioXcell, кат. № BE0239; номер партии 5926/1115). Примечательно, что антитело 3H3 обладает свойствами, подобными свойствам урелумаба (Bristol-Myers Squibb; номер CAS: 934823-49-1), полностью человеческого антитела-агониста на основе IgG4-S228P, которое целенаправленно воздействует на внеклеточный домен CD137, но не блокирует связывание лиганда. Кроме того,

крысиный IgG4 использовали в качестве изотипического контроля (BioXcell, кат. № BE0089; номер партии 5533/5679-316J1). Разведения получали в PBS с достижением требуемой дозы в расчете на мышь, как указано, в объеме инъекции 100 мкл.

Антитела (100 мкг) вводили интраперитонеально в дни 0, 3, 6 дни самкам мышей Balb/c без опухолей и селезенку отбирали в день 9. Уровни экспрессии PD-1 и TIGIT на CD8⁺CD44⁺ Т-клетках измеряли с помощью проточной цитометрии. В частности, суспензии одиночных клеток из селезенки получали путем механического разрушения и пропускания через сетчатый фильтр для клеток 40 мкм. Эритроциты лизировали с помощью буфера АСК. Суспензии клеток окрашивали следующими антителами: CD45 (клон 30-F11, eBioscience), CD8 (клон 53-6.7, BD Biosciences), CD4 (клон RM-45, BD Biosciences), CD44 (клон IM7, eBioscience), PD-1 (RMP1-30, eBioscience) и TIGIT (GIGD7, eBioscience). Получение данных осуществляли с помощью проточного цитометра MACSQuant Analyzer (Miltenyi), и данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo, версия 10.

Антитело 3НЗ вызывало существенное повышение экспрессии как PD-1, так и TIGIT, тогда как только антитело mAb1 повышало экспрессию по сравнению с mAb2 и mAb3 (фиг. 4А и 4В). Кроме того, разрастание CD8⁺ Т-клеток оценивали путем анализа процентного содержания CD45⁺ клеток селезенки или количества CD8⁺ Т-клеток из расчета на селезенку. Аналогично антитело 3НЗ вызывало наибольшую степень разрастания CD8⁺ Т-клеток, при этом mAb1 давало наивысшие уровни размножения CD8⁺ Т-клеток по сравнению с mAb2 и mAb3 (фиг. 4С). Соответственно, mAb1 выбрали для дальнейшего тестирования.

Пример 7. Эффективность антител к CD137 у мышей с опухолями.

Учитывая способность mAb1 повышать разрастание CD8⁺ Т-клеток, как показано в примере 6, mAb1 дополнительно анализировали в отношении противоопухолевой активности с использованием подкожной модели сингенного рака толстой кишки. В частности, клетки опухоли СТ26 (пассаж 3) поддерживали в асептических условиях в среде DMEM (Gibco, кат. № 11965-092), содержащей 10% инактивированной при температуре 56°C FBS (Gibco, 10438-034), 1 мМ пирувата натрия (Gibco, кат. № 11360-070), 1X NEAA (Gibco, кат. № 11140-050) и 1X витаминный раствор MEM (Gibco, кат. № 11120-052). Клетки поддерживали при 37°C и 5% CO₂. По достижении 50-70% слияния клетки пассажировали в соотношении 1:10 в общей сложности в течение двух пассажей перед имплантацией *in vivo*. Клетки собирали и подсчитывали с использованием гемацитометра (Hausser Scientific Bright-Line, № 1492).

Самок мышей Balb/c приобрели в Charles River Laboratories, и к началу исследования их возраст составлял девять недель. Клетки опухоли СТ26 (1×10⁵ клеток на мышь в 0,1 мл PBS) вводили подкожно в правый бок каждой мыши, и объем опухоли рассчитывали два раза в неделю (длина*(ширина²)/2) с использованием штангенциркуля. В день 7 после инокуляции опухоли животных сортировали на группы по восемь и начинали лечение Массу тела регистрировали три раза в неделю на протяжении всего исследования.

mAb1 вводили в трех разных дозах (100, 50 или 25 мкг/мышь), 3НЗ в двух разных дозах (50 или 10 мкг/мышь) и антитело изотипического контроля в дозе 50 мкг/мышь. Всем мышам вводили внутрибрюшинно дозу в дни 0, 3, 6 и 9.

Разрастание CD8⁺ Т-клеток в опухолях подтвердили *in vivo* для антител mAb1 и 3НЗ (данные не представлены). Объемы отдельных опухолей показаны на фиг. 5А, а средние объемы опухолей показаны на фиг. 5В. Обработка с использованием mAb1 приводила к подавлению роста опухоли по сравнению с контрольной группой при всех трех дозах. Кроме того, обработка с использованием mAb1 привела к полной регрессии у 6 из 8 мышей при уровне дозы 25 мкг, у 5 из 8 мышей при уровне дозы 50 мкг и у 3 из 8 мышей при уровне дозы 100 мкг.

Общая выживаемость в каждой группе обработки показана на фиг. 5С. Высокая противоопухолевая активность mAb1 в отношении опухолей СТ26 проявлялась в виде повышения общей выживаемости. Долгосрочную выживаемость (>60 дней) наблюдали у 80% мышей при уровне дозы 25 мкг, у 62% мышей при уровне дозы 50 мкг и у 38% мышей при уровне дозы 100 мкг.

Мышей без пальпируемой опухоли в день 70 считали излеченными и повторно подвергали воздействию посредством подкожной инъекции клеток СТ26 в противоположный бок. В частности, мышам с эрадикацией опухолей снова вводили 1×10⁵ клеток СТ26 в левый бок, а объем опухоли рассчитывали два раза в неделю (длина*(ширина²)/2) с использованием штангенциркуля. Пяти неиммунизированным (наивным) мышам делали инъекцию таким же способом, как и соответственно контрольным. Результаты эксперимента с повторным воздействием показаны на фиг. 5D. Через двадцать два дня после подкожной инъекции клеток СТ26 ни у одной из мышей с повторным воздействием опухоль не образовалась. В отличие от этого, у всех наивных мышей, которым вводили те же самые клетки, образовались опухоли. Следовательно, все мыши, которых считали излеченными, отторгли опухоли СТ26, что свидетельствует о способности mAb1 индуцировать долговременную защитную память.

Пример 8. Эффективность антител к CD137 с созревшей аффинностью у мышей с опухолями.

Моноклональные антитела с созревшей аффинностью, полученные в примере 4, анализировали в отношении противоопухолевой активности с использованием той же подкожной модели сингенного рака

толстой кишки (СТ26), которая, по сути, описана в примере 7. В частности, 6 клонов с созревшей аффинностью (mAb7-mAb12) получили с константными участками IgG4 и тестировали соответствующим образом. Последовательности переменных участков тяжелой цепи и легкой цепи представлены на приведенной ниже диаграмме вместе с их значениями K_D для CD137 мыши (определенными с помощью ForteBio Octet, описанного в примере 2) и CD137 человека (определенными с помощью Catterra, описанного в примере 4).

Антитело	V _H -цепь	V _L -цепь	Связывание с CD137 мыши,	Связывание с CD137 человека,
			K_D (нМ)	K_D (нМ)
mAb7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 6	1,2	6,8
mAb8	SEQ ID NO: 101	SEQ ID NO: 6	72	3,2
mAb9	SEQ ID NO: 103	SEQ ID NO: 6	6,9	41,4
mAb10	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 6	8,4	20
mAb11	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 28	4,8	4,1
mAb12	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 105	25,8	12,1

Исходное mAb1, антитело 3НЗ (данные не показаны) и изотипическое антитело IgG4 использовали в качестве контролей. Всем мышам вводили 50 мкг mAb/мышь внутривенно в дни 0, 3, 7 и 10. Селезенку и печень собирали в день 13 после начала терапии.

Объемы отдельных опухолей показаны на фиг. 6А и средние объемы опухолей показаны на фиг. 6В. В соответствии с результатами из примера 7 обработка исходным mAb1 приводила к уменьшению объема опухоли. Кроме того, введение всех клонов с созревшей аффинностью, полученных из mAb1 (mAb7-mAb12), мышам с опухолью, приводило к подавлению роста опухоли по сравнению с мышами, обработанными изотипическим контрольным антителом.

Пример 9. Влияние антител к CD137 на Т-клетки у мышей с опухолями.

Чтобы определить влияние антител к CD137 (т.е. 3НЗ и mAb1) на уровень Т-клеток у мышей с опухолями, мышам Balb/c с опухолями СТ26, описанными в примере 7, внутривенно вводили антитела в дни 0 и 3 и ткани отбирали в день 7. mAb1 вводили в трех разных дозах (100, 50 или 25 мкг/мышь), 3НЗ в двух разных дозах (50 или 10 мкг/мышь), а изотипическое контрольное антитело в дозе 50 мкг/мышь.

Суспензии отдельных клеток из селезенки получали, как описано в примере 6, и суспензии опухолевых клеток получали путем ферментативного и механического расщепления с использованием набора для разделения опухолей (Miltenyi, кат. № 130-096-730). Суспензии клеток обрабатывали полной средой для инактивации ферментов, а затем пропускали через сетчатый фильтр для клеток 40 мкм. Эритроциты лизировали с помощью буфера АСК. Клетки окрашивали антителами к CD45, CD8 и CD4 и анализировали так, как это описано в примере 6.

На фиг. 7 показано количество CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в виде процентной доли от CD45⁺ клеток, обнаруженных в селезенке и опухоли. Эти результаты показали, что mAb1 приводит к избирательному размножению опухоль-инфильтрирующих CD8⁺ Т-клеток по сравнению с CD8⁺ Т-клетками селезенки.

Пример 10. Влияние истощения CD4⁺, CD8⁺ или NK-лимфоцитов на противоопухолевую эффективность антител к CD137 *in vivo*.

Чтобы оценить механизм действия антител к CD137, мышам Balb/c с опухолями СТ26, описанным в примере 7, внутривенно вводили mAb1 по отдельности или в комбинации с антителом к CD4 (GK1.5), антителом к CD8 (YTS169.4) или антителом к асиало-GM1 (целенаправленно воздействующим на NK-клетки) для истощения этих специфических субпопуляций лимфоцитов у животных. Мышам, обработанным только антителом mAb1, вводили 150 мкг антитела в дни 6, 9, 12, 19 и 26. Мышам, обработанным с 150 мкг mAb1 в комбинации с 500 мкг антитела к CD4, антитела к CD8 или 50 мкг антитела к асиало-GM1, вводили в дни -1, 0, 5, 10, 15 и 20. Эффективное истощение подтверждали в анализе FACS (данные не показаны).

Объемы отдельных опухолей показаны на фиг. 8. В соответствии с результатами из примера 7 обработка исходным mAb1 приводила к уменьшению объема опухоли. Кроме того, введение mAb1 в комбинации с антителами к CD4, CD8 или асиало-GM1, истощающими лимфоциты, снижало противоопухолевую активность антитела mAb1. Данные результаты указывают на взаимодействие между врожденным и адаптивным иммунитетом для противоопухолевой эффективности антител к CD137, описанных в данном документе.

Пример 11. Противоопухолевая эффективность антител к CD137 на разных моделях опухолей.

Чтобы определить, обладает ли антитело к CD137 противоопухолевой эффективностью на разных моделях опухолей, mAb8 вводили мышам с опухолями СТ26 (рак толстой кишки; как описано выше),

опухолями EMT-6 (рак молочной железы), опухолями A20 (В-клеточная лимфома) или опухолями MC38 (рак толстой кишки).

Для всех моделей опухолей мышей-самок приобрели в Charles River Laboratories, и к началу исследования их возраст составлял 7-9 недель. Для каждого типа опухоли использовали подходящую сингенную линию мышей (Balb/c для CT26, EMT-6 и A20; C57BL/6 для MC38). Клетки опухоли EMT6 (5×10^4) клеток на мышь в 0,05 мл PBS вводили в жировой слой правой молочной железы каждой мыши. Клетки опухоли CT26 (1×10^5 клеток на мышь), клетки опухоли A20 (5×10^6 клеток на мышь) и клетки опухоли MC38 (5×10^5 клеток на мышь) вводили подкожно в правый бок каждой мыши, и объем опухоли рассчитывали два раза в неделю ($\text{длина} \times (\text{ширина}^2) / 2$) с использованием штангенциркуля. После достижения размера опухолей 50-100 мм мышей рандомизировали в группы получения mAb8 или изотипического контроля (день 0). Мыши с ортоптическими опухолями EMT6 получали 12,5 мкг в дни 0, 3, 6 и 9. Мыши с опухолями A20 (200 мкг/мышь) и MC38 (12,5 мкг/мышь) получали 5 доз один раз в неделю. Все мыши получали дозу внутривнутрибрюшинно.

Как показано на фиг. 9, mAb8 было эффективным на всех четырех протестированных моделях опухолей, что указывает на широкий диапазон эффективности для разных типов рака. Обработка с mAb8 приводила к регрессии опухоли у 8/8 мышей с опухолями CT26, 3/8 EMT6, 5/8 A20 и замедляла рост опухоли у большинства оставшихся мышей с EMT6, A20 и MC38.

Пример 12. Влияние дозы антител к CD137.

Чтобы дополнительно охарактеризовать противоопухолевую эффективность антител к CD137, провели исследование доз с использованием той же подкожной модели сингенного рака толстой кишки (CT26), которая, по сути, описана в примере 7. В частности, исходные антитела mAb1 и антитела с созревшей аффинностью mAb8 и mAb10 вводили внутривнутрибрюшинно в дозах 150 мкг (высокая доза) или 20 мкг (низкая доза) на мышь в дни 0, 3, 6 и 9 по 8 мышей на группу обработки. Одной группе мышей (n=8) вводили изотипический контроль IgG4 в дозе 150 мкг.

Объемы отдельных опухолей, средний объем опухолей и процент выживаемости мышей, получавших 150 мкг, показаны на фиг. 10А, фиг. 10В и фиг. 10С соответственно. Объемы отдельных опухолей, средний объем опухолей и процент выживаемости мышей, получавших 20 мкг, показаны на фиг. 11А, фиг. 11В и фиг. 11С соответственно. Эти результаты показали, что обработка исходным mAb1 и антителами с созревшей аффинностью mAb8 и mAb10 приводила к уменьшению объема опухоли и увеличению выживаемости мыши как при высоких, так и при низких дозах.

В отдельном исследовании доз с использованием модели опухоли CT26 тестировали дополнительные дозы исходного mAb1. В частности, mAb1 вводили внутривнутрибрюшинно в следующих дозах: 12,5 мкг, 25 мкг, 50 мкг, 100 мкг и 200 мкг. На фиг. 12 показаны результаты исследования доз, указывающие на эффективность в широком диапазоне доз. Обработка с использованием mAb1 приводила к регрессии опухоли у по меньшей мере 3/8 мышей на каждом уровне дозы с оптимальным диапазоном доз (50-100 мкг/мышь), приводящим к эрадикации опухолей у 7/8 мышей.

Пример 13. Влияние связывания Fc-рецептора на противоопухолевую эффективность антител к CD137.

Для определения вклада связывания Fc-рецептора в противоопухолевую активность антител к CD137 получили агликозилированные версии mAb1 на основе IgG1 и IgG4. Опухоли CT26 формировали у мышей так, как это описано в примере 7. Мыши получали 150 мкг любого из (a) изотипического контроля; (b) mAb1 в виде IgG4; (c) агликозилированного mAb1 в виде IgG4 или (d) агликозилированного mAb1 в виде IgG1.

Как показано на фиг. 13А и 13В, агликозилированные изотипы IgG4 и IgG1 исходного антитела mAb1 характеризовались пониженным влиянием на объем опухоли по сравнению с mAb1. Однако эффективность устранялась не полностью. Соответственно, эти результаты показали, что хотя противоопухолевая эффективность mAb1 и не является полностью зависимой от Fc, она повышается за счет связывания с Fc-рецептором.

Пример 14. Межвидовая аффинность антител к CD137.

Антитела к CD137 дополнительно тестировали на их связывание с CD137 от нескольких видов. В частности, mAb1, mAb8 и mAb10 анализировали на предмет связывания с CD137 человека, мыши, яванского макака и собаки. Эксперименты по определению кинетических характеристик проводили на Octet HTX (ForteBio) в буфере для кинетического анализа (1x PBS, pH 7,4, 0,1 мг/мл BSA и 0,002% Tween 20). Fc-, мышинный IgG2a- или гис-меченный CD137 (человека, мыши, яванского макака или собаки) загружали на 5 минут на предварительно гидратированные биосенсоры, АНС, АМС или NTA соответственно. Затем сенсоры погружали в Fab (0, 5, 12, 12,8, 32, 80, 200 и 500 нМ) на 5 минут для ассоциации, затем на 15 минут для диссоциации. Результаты анализировали с помощью ForteBio Data Analysis 9.0, а затем глобально аппроксимировали к модели связывания 1:1 для определения кажущейся K_D . K_D для связывания CD137 человека и мыши подтвердили с использованием антигенов из разных источников (ACRO Biosystems, Sino Biological и внутренних). Результаты показаны в табл. 2 ниже.

Таблица 2
Межвидовая аффинность

Виды	mAb1	mAb8	mAb10
CD137			
<i>Человек</i>	50-70 нМ	3-5 нМ	0,9 нМ
<i>Мышь</i>	300-500 нМ	50-90 нМ	10-30 нМ
<i>Яванский макак</i>	30-100 нМ	3-7 нМ	1,8 нМ
<i>Собака</i>	Неудовлетворительное соответствие	Неудовлетворительное соответствие	Неудовлетворительное соответствие

Пример 15. Влияние размера опухоли на противоопухолевую эффективность антител к CD137.

Чтобы дополнительно охарактеризовать противоопухолевую эффективность антител к CD137, осуществляли оценку противоопухолевой эффективности в отношении крупных опухолей. Опухолям CT26 позволяли вырасти до приблизительно 500 мм³ до лечения. Исходное антитело mAb1 и антитела с созревшей аффинностью mAb8 и mAb10 вводили в дозе 150 мкг/мышь (n=6 мышей/группа лечения) в дни 0, 3, 6 и 9 после формирования опухоли. Изотипическое контрольное антитело IgG4 использовали в качестве препарата сравнения.

На фиг. 14A-14C показано, что исходное mAb1, а также mAb8 и mAb10 с созревшей аффинностью уменьшали объем опухоли (фиг. 14A-14B) и повышали выживаемость мышей (фиг. 14C) относительно изотипического контроля. mAb8 давало значительно большую противоопухолевую эффективность по сравнению с mAb1 и mAb10. Провели отдельное исследование для сравнения эффективности mAb8 и 3H3 в отношении крупных опухолей с использованием той же схемы исследования за исключением того, что 25 мкг антител вводили в дни 0, 7 и 14. На фиг. 14D представлены результаты, показывающие, что у 3H3 отсутствовала эффективность в отношении крупных опухолей, тогда как mAb8 индуцировало регрессию опухоли.

Как описано в примере 14, mAb8 характеризуется аффинностью к CD137 мыши, которая сравнима с аффинностью mAb1 к CD137 человека. Хотя настоящее изобретение не связано какими-либо конкретными теориями или механизмом действия, полагают, что антитела-агонисты к CD137 с промежуточной аффинностью могут быть даже более применимыми в лечении рака.

Мышей без пальпируемой опухоли в день 70 считали излеченными и повторно подвергали воздействию посредством подкожной инъекции клеток CT26 в противоположный бок. В частности, мышам с эрадикацией опухолей снова вводили 1×10^5 клеток CT26 в левый бок, а объем опухоли рассчитывали два раза в неделю (длина*(ширина²)/2) с использованием штангенциркуля. Пяти неиммунизированным (наивным) мышам делали инъекцию таким же способом, как и соответственно контрольным. Результаты эксперимента с повторным воздействием показаны на фиг. 15. Через восемьдесят дней после подкожной инъекции клеток CT26 ни у одной из мышей с повторной имплантацией опухоль не образовалась. В отличие от этого, у всех наивных мышей, которым вводили те же самые клетки, образовались опухоли. Следовательно, все мыши, которых считали излеченными, отторгли опухоли CT26, что свидетельствует о способности mAb1 индуцировать долговременный защитный иммунный ответ памяти.

Пример 16. Токсичность антител к CD137 у мышей с опухолями.

Чтобы определить влияние антител к CD137 (т.е. 3H3 и mAb1) на уровень внутрипеченочных Т-клеток у мышей с опухолями, проводили анализ у мышей из примера 7. Лимфоциты печени собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии. В частности, суспензии отдельных клеток из печени получали с использованием набора для диссоциации печени (Miltenyi, кат. № 130-105-807) и мягкого диссоциатора MACS (Miltenyi). Суспензии клеток обрабатывали полной средой для инактивации ферментов, а затем пропускали через сетчатый фильтр для клеток 40 мкм. Эритроциты лизировали с помощью буфера АСК. Клетки окрашивали антителами к CD45, CD8 и CD4 и анализировали так, как это описано в примере 3.

На фиг. 16A и 16B показано количество CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в виде процентной доли от CD45⁺ клеток, выявленных в печени обработанных мышей. Результаты показали, что mAb1 не индуцирует инфльтрацию внутрипеченочными Т-клетками, демонстрируя более низкую токсичность по сравнению с антителом 3H3.

Пример 17. Токсичность антител к CD137 с созревшей аффинностью у мышей с опухолями.

Чтобы оценить связанные с токсичностью эффекты, опосредованные антителами к CD137 (т.е. 3H3, mAb1 и mAb7-mAb12), клеточную композицию из селезенки и печени мышей с опухолями из примера 8 анализировали после введения антител.

Внутрипеченочные (печень) и внутриселезеночные (селезенка) Т-клетки у мышей с опухолями из примера 8 собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии. Клетки CD45⁺ из печени и се-

лезенки оценивали в отношении экспрессии CD3⁺, CD4⁺ или CD8⁺ после введения антител к CD137 или изотипического контрольного антитела, как это указано. Результаты показаны на фиг. 17А (селезеночные) и 17В (печеночные). Результаты показали, что введение исходного mAb1, а также антител с созревшей аффинностью (mAb7-mAb12) практически не влияло на процентную долю внутрипеченочных или внутриселезеночных Т-клеток по сравнению с введением изотипического контрольного антитела. В отличие от этого, введение антитела 3НЗ приводило к повышению уровня Т-клеток как в селезенке, так и в печени по сравнению с изотипическим контрольным антителом, в частности CD3⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток.

Кроме того, CD45⁺CD8⁺ Т-клетки и CD45⁺CD4⁺ Т-клетки из печени и селезенки обработанных мышей оценивали в отношении экспрессии коингибиторных рецепторов TIGIT, PD-1 или LAG-3 в качестве индикаторов активации или истощения Т-клеток после введения антител к CD137 или изотипическим контрольным антителам. Уровни экспрессии TIGIT, PD-1 и LAG-3 на CD8⁺ Т-клетках и CD4⁺ Т-клетках измеряли с помощью проточной цитометрии, как описано в предыдущих примерах. На фиг. 18А-18В и 19А-19В показано, что введение антитела 3НЗ вызывало значительное увеличение экспрессии данных коингибиторных рецепторов как в CD8⁺ Т-клетках, так и в CD4⁺ Т-клетках, тогда как введение исходного mAb1 или антител с созревшей аффинностью mAb7-mAb12 приводило к экспрессии TIGIT, PD-1 или LAG-3 в той же степени, что и после введения изотипического контрольного антитела. Данные результаты показали, что антитела с созревшей аффинностью не индуцируют системную активацию CD8⁺ Т-клеток или CD4⁺ Т-клеток.

В совокупности данные результаты показывают, что исходное mAb1 и антитела с созревшей аффинностью mAb7-mAb12 демонстрируют более низкий потенциал токсичности *in vivo* по сравнению с препаратом сравнения - антителом 3НЗ. Отсутствие системной активации и размножения Т-клеток, особенно в печени, после обработки с использованием mAb1 и антителами с созревшей аффинностью mAb7-mAb12 может привести к снижению вероятности возникновения гепатотоксичности (трансамината) у пациентов.

Пример 18. Токсичность нескольких доз антител к CD137 у мышей с опухолями.

Чтобы подтвердить отсутствие токсичности, индуцируемой mAb1, провели исследование токсичности при введении повторных доз. В частности, мышам вводили антитела к CD137 mAb1, mAb8 или 3НЗ еженедельно в течение 4 недель. mAb1 и mAb8 вводили в дозе 10, 20, 40 или 80 мг/кг, тогда как 3НЗ вводили в дозе 10 или 80 мг/кг. В день 35 уровни аланинаминотрансаминазы (ALT) в плазме крови определяли с использованием флуориметрического анализа активности (Sigma, кат. № MAK052), CD8⁺ Т-клетки в печени определяли с помощью проточной цитометрии (как это описано выше), и концентрацию TNF α в плазме крови определяли с помощью электрохемилюминесцентного анализа (Meso Scale Discovery, нестандартный набор) в соответствии с инструкциями производителя.

На фиг. 20А показаны низкие уровни CD8⁺ Т-клеток в печени мышей, которым вводили mAb1 и mAb8 при всех 4 дозах, тогда как 3НЗ индуцировало высокие уровни CD8⁺ Т-клеток как при низкой (10 мг/кг), так и при высокой (80 мг/кг) дозах. На фиг. 20В показаны низкие уровни активности ALT в плазме крови мышей, которым вводили mAb1 и mAb8 при всех 4 дозах, тогда как 3НЗ индуцировало высокие уровни ALT при дозе 80 мг/кг. На фиг. 20С показаны низкие уровни TNF α в плазме крови мышей, которым вводили mAb1 и mAb8 как при низкой (10 мг/кг), так и при высокой (80 мг/кг) дозах, тогда как 3НЗ индуцировало высокие уровни TNF α как при низкой (10 мг/кг), так и при высокой (80 мг/кг) дозах.

Кроме того, получали срезы печени обработанных мышей, которые получали 80 мг/кг антител-агонистов к CD137, и окрашивали с помощью Г+Э. От каждого животного половину доли печени заливали ОСТ и замораживали свежей в жидком азоте. Получение срезов и окрашивание Г+Э проводили в лаборатории гистопатологии (Mass Histology Service, Inc) в соответствии со стандартными процедурами. На фиг. 21 представлены результаты, которые показывают воспалительные очаги в центральной доли у мышей, которые получали 3НЗ (см. стрелки), но не mAb1 или mAb1 с созревшей аффинностью.

Пример 19. Иммунное перепрограммирование с помощью антител к CD137.

Для определения роли антител к CD137 на иммунных клетках в микроокружении опухоли использовали модель опухоли CT26. В частности, опухоли CT26 формировали так, как это описано в примере 7. mAb8 вводили мышам в дни 0, 3, 6 и 9 в дозе 25 мкг. Опухоли анализировали в день 11, как это описано в примере 16.

Общую инфильтрацию иммунными клетками в микроокружение опухоли определяли путем измерения количества живых клеток CD45⁺. На фиг. 22А показано, что mAb8 значительно повышало инфильтрацию иммунными клетками микроокружения опухоли.

Уровень клеток Treg в микроокружении опухоли определяли путем измерения количества CD25⁺FOXP-3⁺CD4⁺ лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль. На фиг. 22В показано, что mAb8 значительно снижало уровень Treg в микроокружении опухоли.

Влияние mAb8 на истощение Т-клеток определяли путем измерения уровня экспрессии PD-1⁺TIGIT⁺ на CD8⁺ или CD4⁺ лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль (TIL). На фиг. 22С показаны результаты для CD8⁺ TIL, где количество PD-1⁺TIGIT⁺ клеток в микроокружении опухоли уменьшалось при введе-

нии mAb8. Сопоставимые результаты получили для CD4⁺ TIL (данные не показаны). Данные результаты показывают, что mAb8 защищает от истощения Т-клеток и/или вызывает его регрессию.

Кроме того, проанализировали влияние mAb8 на опухолеассоциированные макрофаги. В частности, измеряли F4/80⁺CD11b⁺CD45⁺ клетки и выявили снижение опухолеассоциированных макрофагов при обработке с mAb8.

В отдельном исследовании оценивали влияние антител к CD137 (т.е. mAb1 и 3H3) на периферические иммунные клетки. В частности, селезенку от мышей с опухолями CT26, получавших mAb1 или 3H3 в дни 0 и 3 в дозе 150 мкг, анализировали в день 7. На фиг. 23 показано, что антитело к CD137 3H3 индуцировало экспрессию TIGIT и PD-1 в CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетках, а также повышение количества CD8⁺CD25⁺ и CD4⁺Foxp3⁺ клеток. Кроме того, 3H3 индуцировало как CD8⁺, так и CD4⁺ эффекторные клетки памяти. В отличие от этого, антитело к CD137 mAb1 значимо не индуцировало CD8⁺TIGIT⁺PD-1⁺, CD8⁺CD25⁺ и CD4⁺Foxp3⁺ Т-клетки. Кроме того, mAb1 не индуцировало CD8⁺ или CD4⁺ эффекторные клетки памяти.

В целом эти результаты показывают, что антитела к CD137 mAb1 и mAb8 индуцируют кардинальное перепрограммирование иммунитета в микроокружении опухоли и оказывают меньшее влияние, если оно вообще имеет место, на периферические иммунные клетки.

Пример 20. Повышение активации мышинных Т-клеток антителами к CD137.

Агонистическую активность антител к CD137 дополнительно анализировали путем оценки стимуляции продуцирования IL-2 в анализе стимуляции с мышинным овальбумином. В 96-луночном планшете высевали подобные дендритным клетки JAWS-II при 10 клеток/луночка и инкубировали их в течение ночи в присутствии мышинового IFN γ (10 нг/мл). Клетки инкубировали с 2 мкг/мл пептида OVA/A2 в течение 2 часов при 37°C с последующей инкубацией с 10⁵ CD8⁺ Т-клеток, выделенных из селезенки мышей OT-I, которые экспрессируют OVA. Антитела добавляли одновременно. В качестве препаратов сравнения использовали атезолизумаб (антитело к PD-L1) и мышинное антитело к PD-1 (RMP1-14) наряду с изотипическим контрольным IgG4. Концентрацию IL-2 определяли при помощи Meso Scale Discovery (MSD).

На фиг. 24 показано, что mAb8 и mAb10 значимо повышали продуцирование IL-2.

В дополнение к измерению продуцирования IL-2 процентные доли CD25⁺CD8⁺Т-клеток и TIGIT⁺CD8⁺ Т-клеток анализировали с использованием того же анализа стимуляции мышинным овальбумином. Антитело 3H3 включили в качестве препарата сравнения. На фиг. 25А и 25В показано, что mAb8 и mAb10 повышали экспрессию CD25, маркера активации, и предотвращали индуцирование TIGIT, маркера истощения. В отличие от этого, 3H3 повышало экспрессию TIGIT.

Пример 21. Влияние антител к CD137 на индуцирование цитокинов.

Чтобы определить влияние антител к CD137 на индуцирование цитокинов Т-клетками, использовали связанные с планшетами антитела. В качестве препаратов сравнения использовали три антитела: mAb4, соответствующее урелумабу (Bristol-Myers Squibb; номер CAS: 934823-49-1), полностью человеческое антитело-агонист IgG4-S228P, которое целенаправленно воздействует на внеклеточный домен CD137, но не блокирует связывание лиганда; mAb5, соответствующее утомилумабу (Pfizer; номер CAS: 1417318-27-4), полностью человеческое антитело-агонист IgG2-S228P, которое целенаправленно воздействует на внеклеточный домен CD137 и блокирует связывание лиганда; и mAb6, полностью человеческое антитело-агонист IgG4-S228P, выбранное из той же библиотеки, что и mAb1, и целенаправленно воздействующее на внеклеточный домен CD137. Антитело mAb6 не блокирует связывание лиганда.

Человеческие CD3⁺ Т-клетки выделяли путем отрицательного отбора и добавляли в планшеты, связанные с антителами к CD137 и 1 мкг/мл антитела к CD3. Антитела к CD137 добавляли в концентрации 1 нМ, 10 нМ, 50 нМ или 100 нМ. Антитела накрывали на ночь при 4°C.

Через 72 часа после добавления Т-клеток уровни IL-2, IFN γ , TNF α и IL-13 оценивали с помощью наборов Luminex (Luminex Corporation, Остин, Техас), следуя инструкциям производителя. Растворимое антитело к CD28 (2 мкг/мл) использовали в качестве контроля активации Т-клеток, и исходный уровень активации задавали с использованием антитела к CD3, связанного с планшетом. На фиг. 26 показана кратность изменения уровня каждого из цитокинов, поскольку она связана с исходным уровнем активации. mAb4 (урелумаб) показало наивысший уровень индукции каждого цитокина, при этом mAb1 показало более низкий уровень индукции, но выше по сравнению с mAb5 (утомилумаб) и mAb6. Эти результаты показывают, что mAb1 выступает в качестве агониста CD137 в меньшей степени, чем mAb4 (урелумаб) при одинаковых концентрациях.

Пример 22. Индуцирование интерферона-гамма (IFN γ) антителами к CD137.

Для дополнительной оценки агонистической активности антител к CD137 анализировали продуцирование IFN γ в реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR). mAb2, mAb4 (урелумаб), mAb5 (утомилумаб) и китруда, гуманизованное антитело, которое блокирует PD-1 (Merck) и, как известно, индуцирует продуцирование IFN γ , использовали в качестве препаратов сравнения.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из лейкопаков (NemaCare, Ван Нюйс, Калифорния), полученных от трех независимых доноров-людей (D985, D7603 и D5004). Общие Т-клетки обогащали из PBMC путем отрицательного отбора с использованием иммуномагнитного разделе-

ния клеток (EasySep™, Stemcell Technologies, Ванкувер, Британская Колумбия). Моноциты выделяли из PBMC с использованием иммуномагнитного разделения клеток (EasySep™, Stemcell Technologies, Ванкувер, Британская Колумбия). Т-клетки ресуспендировали в полной среде RPMI при концентрации 1×10^6 клеток/мл и моноциты доводили до 5×10^5 клеток/мл соответственно. В 96-луночный планшет высевали 100 мкл среды, содержащей Т-клетки, при плотности 1×10^5 клеток/луночка с последующим добавлением 100 мкл суспензии клеток моноцитов (Е:Т при соотношении 2:1). Затем добавляли 50 мкл среды, содержащей разные разведения антител к CD137. Планшеты инкубировали при 37°C в инкубаторе с CO₂ в течение пяти дней. По завершению периода инкубации собирали супернатанты культур и анализировали уровни IFN γ с помощью анализа MSD (Mesoscale Diagnostics, Роквилл, Мэриленд). На фиг. 27А-27С показана концентрация IFN γ в пг/мл при конечных концентрациях тестируемых антител, как указано. Данные результаты показали, что mAb1 выступает в качестве агониста CD137 в меньшей степени, чем mAb4 (урелумаб), но в той же степени, что и mAb5 (утомилумаб) при одинаковых концентрациях.

В отдельном исследовании измеряли индукцию IFN γ с использованием клеток CHO, сконструированных для экспрессии CD32 (FC γ RIIb) (клетки CHO-CD32). В частности, клетки CHO-CD32 совместно культивировали с Т-клетками человека в присутствии растворимых антител к CD3 и к CD137 mAb1, mAb8, mAb4 и mAb5.

Замороженные PBMC оттаивали и оставляли на ночь в среде для Т-клеток (TCM) в увлажненном инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C. На следующий день CD3+ Т-клетки выделяли с помощью набора для выделения необработанных CD3 Т-клеток (Stemcell, № 17951) перед смешиванием с клетками CHO (Gibco, № A29127), трансдуцированными для экспрессии человеческого CD32 (CHO-CD32), 250 нг/мл антитела к CD3 (клон ОКТ3) и антитела к CD137 или контрольного антитела. 100000 Т-клеток смешивали с 50000 клеток CHO-CD32. После инкубирования при 37°C в течение 3 дней супернатанты собирали для анализа секретируемого интерферона-гамма (IFN γ) с помощью MesoScale Discovery (MSD).

На фиг. 28 представлены результаты, показывающие, что mAb4 индуцировало IFN γ до наиболее высоких уровней и при низких дозах. В отличие от этого, mAb5 практически не индуцировало продуцирование IFN γ . Следует отметить, что mAb1 и mAb8 обеспечивали дозозависимый ответ и индуцировали продуцирование IFN γ между уровнями, индуцированными mAb4 и mAb5. В целом данные результаты показывают, что mAb4 проявляет активность сверхагониста, mAb5 обладает более слабой активностью, а mAb1 и mAb8 обладают промежуточной активностью по сравнению с mAb4 и mAb5.

Пример 23. Влияние антител к CD137 на клетки Treg.

Чтобы дополнительно охарактеризовать механизм действия антител к CD137, определяли влияние антител на клетки Treg. Treg человека выделяли с использованием набора для выделения CD4⁺CD127^{low}CD25⁺ регуляторных Т-клеток человека EasySep™ (Stemcell Technologies, кат. № 18063), и их размножали в течение 13 дней с активатором ImmunoCult anti-CD3/28 (Stemcell, № 10971) в полной среде для Т-клеток с 10% FBS. В частности, клетки CHO-CD32, описанные в примере 21, совместно культивировали с размноженными клетками Treg человека, которые метили фиолетовым красителем Cell-trace (Thermo Fisher, кат. № C34557), в присутствии растворимого антитела к CD3 (клон ОКТ3) и антител к CD137 mAb1, mAb8, mAb4, mAb5 и изотипического контроля. Пролиферацию клеток Treg определяли в день 4.

На фиг. 29 представлены результаты, показывающие, что mAb4 сильно индуцировало пролиферацию Treg даже при низких концентрациях. В отличие от этого, mAb5 характеризовалось очень слабым влиянием на пролиферацию Treg. Следует отметить, что mAb1 и mAb8 показали умеренное повышение пролиферации Treg. В целом данные результаты подтверждают, что mAb4 проявляет активность сверхагониста, mAb5 обладает слабой активностью, а mAb1 и mAb8 обладают промежуточной активностью.

Пример 24. Влияние антител к CD137 на внутриклеточную передачу сигналов.

Для дополнительной оценки различий между антителами-агонистами к CD137 оценивали внутриклеточную передачу сигналов *in vitro*. В частности, Т-клетки CCL-119 (ATCC; кат. № ATCC CCL-119), трансфицированные лентивирусной конструкцией с NF κ B (Qiagen; кат. № CLS-013L-1) или SRF (Qiagen; кат. № CLS-010L-1), стимулировали с использованием 250 нг/мл связанного с планшетом антитела к CD3 (клон ОКТ3) в сочетании с разными концентрациями связанных с планшетом mAb1, mAb8, mAb4, mAb5 и изотипического контроля. После стимуляции в течение 16 часов в среде RPMI без добавок клетки лизировали в люциферазном буфере (Promega; кат. № E263B), и результаты в относительных световых единицах (RLU) получали на для микропланшет-ридера BioTek Synergy H1 (кат. № 11-120-533). Необработанные данные RLU затем экспортировали в Microsoft Excel и рассчитали кратность индуцирования путем разделения RLU в условиях стимуляции на контрольные без стимуляции.

На фиг. 30 представлены результаты, показывающие минимальную активность NF κ B и SRF для mAb4 и mAb5 по сравнению с mAb1 и его вариантом с созревшей аффинностью mAb8. В целом данные результаты показывают, что mAb1 индуцирует внутриклеточную передачу сигналов иначе, чем mAb4 и mAb5.

Пример 25. Влияние антител к CD137 на активацию и дифференцировку макрофагов.

Ранее было показано, что гепатотоксичность, индуцированная антителом-агонистом к mCD137 3H3,

была связана с размножением макрофагов и CD8⁺ Т-клеток в печени, а также с повышением уровня цитокинов и активности АЛТ в сыворотке крови. Кроме того, антитело 3НЗ было охарактеризовано свойствами, подобными урелумабу. Как описано в данном документе, mAb1 не индуцирует гепатотоксичность. Соответственно, антитела-агонисты к CD137 анализировали в отношении их влияния на активацию макрофагов *in vitro*.

В частности, мышинные макрофаги, полученные из костного мозга, получили от самок мышей C57BL/6 возрастом 10 недель (Charles River Laboratories). Бедренную и большеберцовую кости отделяли от мышц мышей и костный мозг вымывали с помощью PBS в конические пробирки объемом 15 мл на льду. Клетки центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 минут и отбрасывали супернатант. Осадок клеток разрушали и добавляли культуральную среду (RPMI, 20% FBS, 50 мкг/мл М-CSF (Shenandoah Biotechnology, Inc.; кат. № 200-08-100) и пенициллин/стрептомицин). Клетки фильтровали на 40-микронном сетчатом фильтре и высевали в необработанные чашки Петри для культур тканей. Через 3 дня в каждую чашку Петри добавляли 10 мл среды. В день 7 культивирования среду удаляли и клетки дважды промывали PBS (10 мл). Буфер MACS (PBS, 2 мкМ EDTA и 0,5% FBS) добавляли в каждую чашку и инкубировали при 37°C в течение 10 минут. Клетки собирали из чашек Петри и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 минут. Затем эти полученные из костного мозга макрофаги стимулировали агонистом TLR9 CpG в присутствии 50 нм антител к CD137 mAb1, 3НЗ или LOB12.3 (мышино-специфическое антитело-агонист к CD137). Продуцирование IL-6, TNF α и IL-27 полученными из костного мозга мышинными макрофагами оценивали в супернатантах культур через 48 часов с использованием электрохемилюминесцентного анализа (Meso Scale Discovery, набор по индивидуальному заказу) в соответствии с инструкциями производителя. На фиг. 31 представлены результаты, которые показывают, что mAb1 не индуцировало секрецию макрофагами провоспалительных цитокинов, тогда как антитела 3НЗ и LOB12.3 индуцировали.

Человеческие макрофаги моноцитарного происхождения получали с помощью магнитного разделения CD14⁺ клеток с использованием микрогранул с антителом к CD14 (Miltenyi Biotech, кат. № 130-050-201) и созревания в течение 7 дней в присутствии 50 нг/мл m-CSF. Затем человеческие макрофаги моноцитарного происхождения стимулировали с использованием 10 нг/мл LPS в присутствии 5 нм антител к CD137 mAb1, mAb4 или mAb5. Продуцирование TNF α оценивали через 48 часов с использованием электрохемилюминесцентного анализа (Meso Scale Discovery, набор по индивидуальному заказу) в соответствии с инструкциями производителя. На фиг. 32 представлены результаты, которые показывают, что mAb4 и mAb5 индуцировали активацию макрофагов в значительно большей степени, чем mAb1.

Кроме того, моноциты THP1 подвергали дифференцировке в макрофаги путем инкубации с 2 мкМ форбол-12-миристин-13-ацетата (PMA; Sigma; P1585) в течение ночи. Затем макрофаги культивировали в присутствии 50 нм антител к CD137 mAb1, mAb4 или mAb5, и экспрессию CD64 измеряли через 48 часов с помощью проточной цитометрии (APC-антитело к CD64 человека, клон 10.1; BioLegend; кат. № 305013). На фиг. 33 представлены результаты, которые показывают, что mAb4 и mAb5 индуцировали дифференцировку макрофагов в большей степени, чем mAb1.

Хотя настоящее изобретение не связано какими-либо конкретными теорией или механизмом действия, в целом эти результаты указывают на то, что mAb1 лишено гепатотоксичности из-за сниженного потенциала активации макрофагов.

Пример 26. Размножение CD8⁺ Т-клеток человека *in vivo* с помощью антител-агонистов к CD137.

Чтобы проверить влияние антител-агонистов к CD137 на клетки человека *in vivo*, человеческие PBMC (7×10^6) внутривенно вводили мышам NSG с нарушенной иммунной реакцией (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ; Jackson Laboratory; кат. № 005557). Мышей рандомизировали в группы по 8 и они получали антитела к CD137 (200 мкг/мышь) или контроль со средой-носителем в дни 0, 7 и 14. Периферическую кровь от каждой мыши отбирали в дни 10, 20 и 29 для определения человеческого CD45⁺ (FITC-антитело к CD45 человека, клон HI30; BioLegend; кат. № 304038), CD8⁺ (Alexa Fluor® 647-антитело к CD8 α человека, клон HIT8 α ; BioLegend; кат. № 300918) и CD4⁺ (APC-Cy7-антитело к CD4 человека, клон RPA-T4; Bd; кат. № 557871) трансплантата с использованием проточной цитометрии.

На фиг. 34А-34С показано общее повышение количества клеток hCD45⁺ и системное сверхразмножение CD8⁺ Т-клеток человека у мышей, которые получали mAb4, за счет CD4⁺ Т-клеток человека. Следует отметить, что mAb1 не индуцировало чрезмерную активацию Т-клеток человека. Пониженный потенциал mAb1 к активации человеческих Т-клеток на периферии может способствовать снижению потенциальной токсичности.

Таблица 3
Таблица комбинации антител

V _H	V _L	CDR V _H			CDR V _L		
		CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3

046914

4	6	48	56	68	69	78	89
4	28	48	56	68	70	79	90
4	30	48	56	68	71	80	91
4	32	48	56	68	72	81	92
4	34	48	56	68	73	82	91
4	36	48	56	68	74	83	93
4	38	48	56	68	75	84	91
4	40	48	56	68	74	85	94
4	42	48	56	68	76	86	95
4	44	48	56	68	77	87	93
4	46	48	56	68	69	88	90
4	105	48	56	68	109	110	92
8	6	49	57	68	69	78	89
10	6	49	58	68	69	78	89
12	6	49	59	68	69	78	89
14	6	49	60	68	69	78	89
16	6	50	61	68	69	78	89
18	6	50	58	68	69	78	89
20	6	51	62	68	69	78	89
22	6	52	63	68	69	78	89
24	6	50	64	68	69	78	89
26	6	50	65	68	69	78	89
101	6	51	108	68	69	78	89
103	6	107	56	68	69	78	89
8	28	49	57	68	70	79	90
8	30	49	57	68	71	80	91
8	32	49	57	68	72	81	92
8	34	49	57	68	73	82	91
8	36	49	57	68	74	83	93
8	38	49	57	68	75	84	91
8	40	49	57	68	74	85	94
8	42	49	57	68	76	86	95
8	44	49	57	68	77	87	93
8	46	49	57	68	69	88	90

046914

8	105	49	57	68	109	110	92
10	28	49	58	68	70	79	90
10	30	49	58	68	71	80	91
10	32	49	58	68	72	81	92
10	34	49	58	68	73	82	91
10	36	49	58	68	74	83	93
10	38	49	58	68	75	84	91
10	40	49	58	68	74	85	94
10	42	49	58	68	76	86	95
10	44	49	58	68	77	87	93
10	46	49	58	68	69	88	90
10	105	49	58	68	109	110	92
12	28	49	59	68	70	79	90
12	30	49	59	68	71	80	91
12	32	49	59	68	72	81	92
12	34	49	59	68	73	82	91
12	36	49	59	68	74	83	93
12	38	49	59	68	75	84	91
12	40	49	59	68	74	85	94
12	42	49	59	68	76	86	95
12	44	49	59	68	77	87	93
12	46	49	59	68	69	88	90
12	105	49	59	68	109	110	92
14	28	49	60	68	70	79	90
14	30	49	60	68	71	80	91
14	32	49	60	68	72	81	92
14	34	49	60	68	73	82	91
14	36	49	60	68	74	83	93
14	38	49	60	68	75	84	91
14	40	49	60	68	74	85	94
14	42	49	60	68	76	86	95
14	44	49	60	68	77	87	93
14	46	49	60	68	69	88	90
14	105	49	60	68	109	110	92

046914

16	28	50	61	68	70	79	90
16	30	50	61	68	71	80	91
16	32	50	61	68	72	81	92
16	34	50	61	68	73	82	91
16	36	50	61	68	74	83	93
16	38	50	61	68	75	84	91
16	40	50	61	68	74	85	94
16	42	50	61	68	76	86	95
16	44	50	61	68	77	87	93
16	46	50	61	68	69	88	90
16	105	50	61	68	109	110	92
18	28	50	58	68	70	79	90
18	30	50	58	68	71	80	91
18	32	50	58	68	72	81	92
18	34	50	58	68	73	82	91
18	36	50	58	68	74	83	93
18	38	50	58	68	75	84	91
18	40	50	58	68	74	85	94
18	42	50	58	68	76	86	95
18	44	50	58	68	77	87	93
18	46	50	58	68	69	88	90
18	105	50	58	68	109	110	92
20	28	51	62	68	70	79	90
20	30	51	62	68	71	80	91
20	32	51	62	68	72	81	92
20	34	51	62	68	73	82	91
20	36	51	62	68	74	83	93
20	38	51	62	68	75	84	91
20	40	51	62	68	74	85	94
20	42	51	62	68	76	86	95
20	44	51	62	68	77	87	93
20	46	51	62	68	69	88	90
20	105	51	62	68	109	110	92
22	28	52	63	68	70	79	90

046914

22	30	52	63	68	71	80	91
22	32	52	63	68	72	81	92
22	34	52	63	68	73	82	91
22	36	52	63	68	74	83	93
22	38	52	63	68	75	84	91
22	40	52	63	68	74	85	94
22	42	52	63	68	76	86	95
22	44	52	63	68	77	87	93
22	46	52	63	68	69	88	90
22	105	52	63	68	109	110	92
24	28	50	64	68	70	79	90
24	30	50	64	68	71	80	91
24	32	50	64	68	72	81	92
24	34	50	64	68	73	82	91
24	36	50	64	68	74	83	93
24	38	50	64	68	75	84	91
24	40	50	64	68	74	85	94
24	42	50	64	68	76	86	95
24	44	50	64	68	77	87	93
24	46	50	64	68	69	88	90
24	105	50	64	68	109	110	92
26	28	50	65	68	70	79	90
26	30	50	65	68	71	80	91
26	32	50	65	68	72	81	92
26	34	50	65	68	73	82	91
26	36	50	65	68	74	83	93
26	38	50	65	68	75	84	91
26	40	50	65	68	74	85	94
26	42	50	65	68	76	86	95
26	44	50	65	68	77	87	93
26	46	50	65	68	69	88	90
26	105	50	65	68	109	110	92
101	28	51	108	68	70	79	90
101	30	51	108	68	71	80	91

101	32	51	108	68	72	81	92
101	34	51	108	68	73	82	91
101	36	51	108	68	74	83	93
101	38	51	108	68	75	84	91
101	40	51	108	68	74	85	94
101	42	51	108	68	76	86	95
101	44	51	108	68	77	87	93
101	46	51	108	68	69	88	90
101	105	51	108	68	109	110	92
103	28	107	56	68	70	79	90
103	30	107	56	68	71	80	91
103	32	107	56	68	72	81	92
103	34	107	56	68	73	82	91
103	36	107	56	68	74	83	93
103	38	107	56	68	75	84	91
103	40	107	56	68	74	85	94
103	42	107	56	68	76	86	95
103	44	107	56	68	77	87	93
103	46	107	56	68	69	88	90
103	105	107	56	68	109	110	92

Таблица 4

Перечень последовательностей

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	IgG1 человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK

2	Мутантный IgG4 человека (S228P/C-концевое усечение К)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP <u>P</u> CPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLG
3	CD137 человека (номер доступа NP_001552)	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNN RNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTS NAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKCKDC CFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCG PSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFL LFFLTLRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
4	Аминокислотная последовательность V _{H1}	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLR AEDTAVYYCAKDSPFLDDYYYYYYMDVW GKGTTVTVSS
5	Последовательность нуклеиновой кислоты V _{H1}	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCA GCCAGGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGG ATTCACTTTTAGTTCGTATGCAATGTCGTGGGTTGCGCA GGCGCCCGGTAAGGGTCTGGAGTGGGTGAGTGCTATTT CCGGCTCTGGCGGATCTACCTATTACGCCGACTCTGTGA AAGGTCGTTTTACCATAAGCCGCGACAATTCTAAGAAT ACTTTATATCTTCAAATGAATTCGCTGCGGGCAGAAGAC ACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAGGACTCACTTTTCTA TTAGACGACTACTACTACTACTACTACATGGACGTATGG GGCAAGGGTACAACCTGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC
6	Аминокислотная последовательность V _{L1}	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPED FATYYCQQGHLFPITFGGGTKVEIK

7	Последовательность нуклеиновой кислоты V _{L1}	GATATTCAGATGACACAGAGCCCGTCATCAGTAAGTGC AAGCGTCGGAGATCGGGTTACAATAACATGTCGTGCCT CGCAAGGAATTTCTCCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGA AACCTGGCAAAGCCCCAAATTAATAATTTATGCCGCA AGCTCTCTGCAATCGGGTGTTCCTTCGCGGTTTTCTGGC TCTGGAAGTGGCACCGACTTCACGCTTACTATCTCTAGC CTTCAGCCGGAGGATTTTGCTACCTACTACTGCCAACAA GGCCATTTATCCCTATTACCTTTGGGGGCGGTACAAAA GTCGAGATCAAGCGTACG
8	Аминокислотная последовательность V _{H2}	EVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNYYAMSWVRQ APGKGLEWVSAIDGSDNTTYADSVKGRFTISRDNKNTL YMQNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLDDYDDYDDYMDVW GKGTITVTVSS
9	Последовательность нуклеиновой кислоты V _{H2}	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCA GCCAGGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGG ATTCACCTTTAACTATTACGCAATGTCTTGGGTTTCGCCA GGCGCCCGGTAAGGGTCTGGAGTGGGTGTCTGCAATCG ATGGTTCTGGTGATAACAATACTTACGCCGACTCTGTGA AAGGTCGTTTTACCATAAGCCGCGACAATTCTAAGAAT ACTTTATATCTTCAAATGAATTCGCTGCGGGCAGAAGAC ACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAGGACTCACCTTTTCTA TTAGACGACTACTACTACTACTACTACATGGACGTATGG GGCAAGGGTACAATACTGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC
10	Аминокислотная последовательность V _{H3}	EVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNYYAMSWVRQ APGKGLEWVAASISGSDGTYADSVKGRFTISRDNKNTL YMQNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLDDYDDYDDYMDVW GKGTITVTVSS
11	Последовательность нуклеиновой кислоты V _{H3}	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCA GCCAGGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGG ATTCACCTTTAACTATTACGCAATGTCTTGGGTTTCGCCA GGCGCCCGGTAAGGGTCTGGAGTGGGTGGCAGCAATCT CTGGTTCTGGTGATGGTACTTACTACGCCGACTCTGTGA AAGGTCGTTTTACCATAAGCCGCGACAATTCTAAGAAT ACTTTATATCTTCAAATGAATTCGCTGCGGGCAGAAGAC ACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAGGACTCACCTTTTCTA

		TTAGACGACTACTACTACTACTACTACATGGACGTATGG GGCAAGGGTACAACCTGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC
12	Аминокислотная последовательность V _{H4}	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNYYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGDSTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YMQMNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLDDDDYYYYYYMDVW GKGTITVTVSS
13	Последовательность нуклеиновой кислоты V _{H4}	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCA GCCAGGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGG ATTCACCTTTAACTATTACGCAATGTCTTGGGTTGCGCA GGCGCCCGGTAAGGGTCTGGAGTGGGTGTCTGCAATCT CTGGTCTGGTGATTCTACTTACTACGCCGACTCTGTGA AAGGTCGTTTTACCATAAGCCGCGACAATTCTAAGAAT ACTTTATATCTTCAAATGAATTCGCTGCGGGCAGAAGAC ACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAGGACTCACCTTTTCTA TTAGACGACTACTACTACTACTACTACATGGACGTATGG GGCAAGGGTACAACCTGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC
14	Аминокислотная последовательность V _{H5}	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNYYAMSWVRQ APGKGLEWVAISGGGDATYYADSVKGRFTISRDNKNTL LYMQMNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLDDDDYYYYYYMDVW GKGTITVTVSS
15	Последовательность нуклеиновой кислоты V _{H5}	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCA GCCAGGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGG ATTCACCTTTAACTATTACGCAATGTCTTGGGTTGCGCA GGCGCCCGGTAAGGGTCTGGAGTGGGTGGCAGCAATCT CTGGTGGTGGTGATGCAACTTACTACGCCGACTCTGTGA AAGGTCGTTTTACCATAAGCCGCGACAATTCTAAGAAT ACTTTATATCTTCAAATGAATTCGCTGCGGGCAGAAGAC ACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAGGACTCACCTTTTCTA TTAGACGACTACTACTACTACTACTACATGGACGTATGG GGCAAGGGTACAACCTGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC
16	Аминокислотная последовательность V _{H6}	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYGYAMSWVRQ APGKGLEWVSSISGSGDVYYADSVKGRFTISRDNKNTL YMQMNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLDDDDYYYYYYMDVW GKGTITVTVSS

17	Последовательность нуклеиновой кислоты V _{H6}	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCA GCCAGGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGG ATTCACCTTTTATGGTTACGCAATGTCTTGGGTTTCGCCA GGCGCCCGGTAAGGGTCTGGAGTGGGTGTCTTCTATCTC TGTTTCTGGTGATGTTACTTACTACGCCGACTCTGTGAA AGGTCGTTTTACCATAAGCCGCGACAATTCTAAGAATA CTTTATATCTTCAAATGAATTCGCTGCGGGCAGAAGACA CGGCCGTCTATTACTGCGCAAAGGACTCACCTTTTCTAT TAGACGACTACTACTACTACTACTACATGGACGTATGG GGCAAGGGTACAACCTGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC
18	Аминокислотная последовательность V _{H7}	EVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYGYAMSWVRQ APGKGLEWVVAISGSGDGYADSVKGRFTISRDNKNTL YMQNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLDDYYYYYYMDVW GKGTITVTVSS
19	Последовательность нуклеиновой кислоты V _{H7}	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCA GCCAGGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGG ATTCACCTTTTATGGTTACGCAATGTCTTGGGTTTCGCCA GGCGCCCGGTAAGGGTCTGGAGTGGGTGGCAGCAATCT CTGGTCTGGTGATGGTACTTACTACGCCGACTCTGTGA AAGGTCGTTTTACCATAAGCCGCGACAATTCTAAGAAT ACTTTATATCTTCAAATGAATTCGCTGCGGGCAGAAGAC ACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAGGACTCACCTTTTCTA TTAGACGACTACTACTACTACTACTACATGGACGTATGG GGCAAGGGTACAACCTGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC
20	Аминокислотная последовательность V _{H8}	EVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISFGESTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YMQNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLDDYYYYYYMDVW GKGTITVTVSS
21	Последовательность нуклеиновой кислоты V _{H8}	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCA GCCAGGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGG ATTCACCTTTAGAACTACGCAATGTCTTGGGTTTCGCCA GGCGCCCGGTAAGGGTCTGGAGTGGGTGTCTGCAATCT CTGGTTTTGGTGAATCTACTTACTACGCCGACTCTGTGA AAGGTCGTTTTACCATAAGCCGCGACAATTCTAAGAAT ACTTTATATCTTCAAATGAATTCGCTGCGGGCAGAAGAC

		ACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAGGACTCACCTTTTCTA TTAGACGACTACTACTACTACTACTACATGGACGTATGG GGCAAGGGTACAACCTGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC
22	Аминокислотная последовательность V _H 9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNYYAMNWVRQ APGKGLEWVAAISGSGGRYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLDDYYYYYYMDVW GKGTTVTVSS
23	Последовательность нуклеиновой кислоты V _H 9	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCA GCCAGGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGG ATTCACCTTTAACTATTACGCAATGAACTGGGTTTCGCCA GGCGCCCGGTAAGGGTCTGGAGTGGGTGGCAGCAATCT CTGGTTCTGGTGGTAGAACTTACTACGCCGACTCTGTGA AAGGTCGTTTTACCATAAGCCGCGACAATTCTAAGAAT ACTTTATATCTTCAAATGAATTCGCTGCGGGCAGAAGAC ACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAGGACTCACCTTTTCTA TTAGACGACTACTACTACTACTACTACATGGACGTATGG GGCAAGGGTACAACCTGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC
24	Аминокислотная последовательность V _H 10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYGYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGGNTSYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLDDYYYYYYMDVW GKGTTVTVSS
25	Последовательность нуклеиновой кислоты V _H 10	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCA GCCAGGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGG ATTCACCTTTTATGGTTACGCAATGTCTTGGGTTTCGCCA GGCGCCCGGTAAGGGTCTGGAGTGGGTGTCTGCAATCT CTGGTTCTGGTGGTAACACTTCTTACGCCGACTCTGTGA AAGGTCGTTTTACCATAAGCCGCGACAATTCTAAGAAT ACTTTATATCTTCAAATGAATTCGCTGCGGGCAGAAGAC ACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAGGACTCACCTTTTCTA TTAGACGACTACTACTACTACTACTACATGGACGTATGG GGCAAGGGTACAACCTGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC
26	Аминокислотная последовательность V _H 11	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYGYAMSWVRQ APGKGLEWVAAISGSGDSTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLDDYYYYYYMDVW GKGTTVTVSS

27	Последовательность нуклеиновой кислоты V _{H11}	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCA GCCAGGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGG ATTCACCTTTTATGGTTACGCAATGTCTTGGGTTGCGCA GGCGCCCGGTAAGGGTCTGGAGTGGGTGGCAGCAATCT CTGGTTCTGGTGATTCTACTTACTACGCCGACTCTGTGA AAGGTCGTTTTACCATAAGCCGCGACAATTCTAAGAAT ACTTTATATCTTCAAATGAATTCGCTGCGGGCAGAAGAC ACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAGGACTCACCTTTTCTA TTAGACGACTACTACTACTACTACATGGACGTATGG GGCAAGGGTACAACCTGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC
28	Аминокислотная последовательность V _{L2}	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQNIHNWLAWYQQKP GKAPKLLIYKASGLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDD FATYYCQQGDRFPLTFGGGTKVEIK
29	Последовательность нуклеиновой кислоты V _{L2}	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCA TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAG TCAGAAATATCATAACTGGTTGGCCTGGTATCAGCAAA AACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCG TCTGGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGATTCAGCGG CAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCA GCCTGCAACCTGATGATTTTGCAACTTACTACTGTCAAC AGGGTGACAGATTCCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACC AAGGTGGAGATCAAACGTACG
30	Аминокислотная последовательность V _{L3}	DIQMTQSPSILSASVGDRTITCRASQSISRWLAWYQQKPG KPPKLLIFKASALESGVPSRFSGSGYGTDFLTISNLQPEDF ATYFCQQGNSFPLTFGGGTKVDIK
31	Последовательность нуклеиновой кислоты V _{L3}	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCATCCTGTCTGCA TCTGTAGGAGACAGAGTCACTATCACTTGCCGGGCCAG TCAGAGTATCAGTAGGTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGA AGCCAGGGAAACCCCCTAAACTCCTGATCTTTAAGGCG TCTGCTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCGAGGTTTCAGCGG CAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCA ACCTGCAGCCTGAAGACTTTGCAACTTACTTCTGTCAAC AGGGTAATAGTTTCCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCA

		AAGTGGATATCAAACGTACG
32	Аминокислотная последовательность V _L 4	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQNIWLAWYQWKP GKAPKLLIYKASGLETGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPED FATYYCQQGNQFPLTFGQGTRLEIK
33	Последовательность нуклеиновой кислоты V _L 4	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCA TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAG TCAGAATATTGATATCTGGTTGGCCTGGTATCAGTGGAA ACCAGGGAAGGCCCTAAACTCCTGATCTATAAGGCGT CTGGTTTAGAACTGGGGTCCCTTCAAGGTTACAGCGGC AGTGGATCTGGGACAGAATTCCTACTCTACTATCAGCAG CCTGCAGCCAGAGGATTTTGCCTTACTATTGTCAACA GGGTAACCAGTTCCCGCTCACCTTCGGCCAAGGGACAC GACTGGAGATTAACGTACG
34	Аминокислотная последовательность V _L 5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIGRWLAWYQQKP GKAPKLLIFKASALEVGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQGNSFPLTFGGGTKVDIK
35	Последовательность нуклеиновой кислоты V _L 5	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCCTGTCTGCA TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAG TCAGAGTATCGGTAGGTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGA AACCAGGGAAGGCCCTAAACTCCTGATCTTTAAGGCG TCTGCTTTAGAAGTTGGGGTCCCATCAAGGTTACAGCGGC AGTGGGTCTGGGACAGATTTACTCTCACCATCAGCAG CCTGCAGCCTGAAGATTTTGCCTTACTATTGTCAACA GGGTAACAGTTTCCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCA AAGTGGATATCAAACGTACG
36	Аминокислотная последовательность V _L 6	DIQLTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASALQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQGDSFPLTFGGGTKVEIK

37	Последовательность нуклеиновой кислоты V _L 6	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCA TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAG TCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGA AACCAGGGAAAGCCCCTAAACTCCTGATCTATGCTGCA TCCGCTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGG CAGCGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAGCA GCCTGCAGCCCGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAAC AGGGTGACAGTTTCCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACC AAGGTGGAGATCAAACGTACG
38	Аминокислотная последовательность V _L 7	DIQMTQSPSTLSASVGDVTFSCRASQSINTWLAWYQQKP GKAPKLLIYKASALENGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPED FATYYCQQGNSFPLTFGGGKVEIK
39	Последовательность нуклеиновой кислоты V _L 7	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCA TCTGTAGGAGACACAGTCACCTTCAGTTGCCGGGCCAG TCAGAGTATTAACACCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAAA AGCCAGGGAAAGCCCCTAAACTCCTTATCTATAAGGCG TCTGCTTTAGAAAATGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGG CAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACAATCAGCA GCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAAC AGGGGAACAGTTTCCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACC AAGGTGGAGATCAAACGTACG
40	Аминокислотная последовательность V _L 8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPG KAPKLLIYKASALESGVPSRFSGGGSGTEFTLTISSLQPEDF ATYYCQQGHSFPLTFGGGKLEIK
41	Последовательность нуклеиновой кислоты V _L 8	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAG TCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGA AACCAGGGAAAGCCCCTAAACTCCTCATCTATAAGGCG TCTGCTTTAGAAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGG CGGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACCATCAGCA GCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAAC AGGGTCACAGTTTCCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCA AGCTGGAGATCAAACGTACG

42	Аминокислотная последовательность V _L 9	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIDWLAWYQQKPG KAPKLLIFKASALEGGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQGNSFPITFGQGTRLEIK
43	Последовательность нуклеиновой кислоты V _L 9	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAG TCAGAGTATTAGTACTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGA AGCCAGGTAAGCCCCTAAACTCCTGATCTTTAAGGCTT CTGCTTTAGAAGGTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGC AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG CCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACA GGGTAACAGTTTCCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACAC GACTGGAGATTAACGTACG
44	Аминокислотная последовательность V _L 10	DIQMTQSPATLSASVGDRVITICRASQSVDRWLAWYQQK PGKAPNLLIYEASALQGGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGDSFPLTFGGGTKVEIK
45	Последовательность нуклеиновой кислоты V _L 10	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGCA TCTGTTGGAGACAGGGTCACCATCACTTGCCGGGCCAG TCAGAGTGTGATAGGTGGTTGGCCTGGTACCAGCAGA AACCAGGGAAAGCCCCTAACCTCCTAATCTATGAGGCG TCTGCCTTACAAGGTGGGGTCCCGTCAAGGTTACGCGG CAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCA GCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAAC AGGGTGATAGTTTCCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCA AGGTGGAGATCAAACGTACG
46	Аминокислотная последовательность V _L 11	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASGLQNGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQGDRFPLTFGGGTKVEIK
47	Последовательность нуклеиновой кислоты V _L 11	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCA TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAG TCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGA AACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCA TCCGGTTTGAAAATGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGG

		CAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCA GCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAAC AGGGTGACAGGTTCCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACC AAGGTGGAGATCAAACGTACG
48	CDR1 V _H	FTFSSYAMS
49	CDR1.1 V _H	FTFNYYAMS
50	CDR1.2 V _H	FTFYGYAMS
51	CDR1.3 V _H	FTFRNYAMS
52	CDR1.4 V _H	FTFNYYAMN
53	CDR1.5 V _H	FTFNYYAMX _{aa1} , где X _{aa1} =S или N
54	CDR1.6 V _H	FTFX _{aa1} X _{aa2} YAMS, где X _{aa1} =S, N, Y, R; X _{aa2} =S, N, Y, G
55	CDR1.7 V _H	FTFX _{aa1} X _{aa2} YAMX _{aa3} , где X _{aa1} =S, N, Y, R; X _{aa2} =S, N, Y, G; X _{aa3} =S или N.
56	CDR2 V _H	SAISGSGGSTYY
57	CDR2.1 V _H	SAIDGSGDNNTY
58	CDR2.2 V _H	AAISGSGDGTYY
59	CDR2.3 V _H	SAISGSGDSTYY
60	CDR2.4 V _H	AAISGGGDATYY
61	CDR2.5 V _H	SSISGSGDVTTY
62	CDR2.6 V _H	SAISGFGESTYY
63	CDR2.7 V _H	AAISGSGGRTTY
64	CDR2.8 V _H	SAISGSGGNTSY
65	CDR2.9 V _H	AAISGSGDSTYY
66	CDR2.10 V _H	AAISGX _{aa1} GX _{aa2} X _{aa3} TYY, где X _{aa1} =S или G; X _{aa2} =D или G, X _{aa3} =S, R, G, A
67	CDR2.11 V _H	X _{aa1} X _{aa2} IX _{aa3} GX _{aa4} GX _{aa5} X _{aa6} TX _{aa7} Y
68	CDR3 V _H	AKDSPFLDDYYYYYYMD
69	CDR1 V _L	RASQGISSWLAW
70	CDR1.1 V _L	RASQNIHNWLAW
71	CDR1.2 V _L	RASQSISRWLAW
72	CDR1.3 V _L	RASQNIDIWLAW
73	CDR1.4 V _L	RASQSIGRWLAW
74	CDR1.5 V _L	RASQSISWLAW
75	CDR1.6 V _L	RASQSINTWLAW

76	CDR1.7 V _L	RASQSIDWLAW
77	CDR1.8 V _L	RASQSVDRWLAW
78	CDR2 V _L	YAASSLQS
79	CDR2.1 V _L	YKASGLES
80	CDR2.2 V _L	FKASALES
81	CDR2.3 V _L	YKASGLET
82	CDR2.4 V _L	FKASALEV
83	CDR2.5 V _L	YAASALQS
84	CDR2.6 V _L	YKASALEN
85	CDR2.7 V _L	YKASALES
86	CDR2.8 V _L	FKASALEG
87	CDR2.9 V _L	YEASALQG
88	CDR2.10 V _L	YAASGLQN
89	CDR3 V _L	QQGHLFPITF
90	CDR3.1 V _L	QQGDRFPLTF
91	CDR3.2 V _L	QQGNSFPLTF
92	CDR3.3 V _L	QQGNQFPLTF
93	CDR3.4 V _L	QQGDSFPLTF
94	CDR3.5 V _L	QQGHSFPLTF
95	CDR3.6 V _L	QQGNSFPITF
96	CDR3.7 V _L	QQGXaa ₁ Xaa ₂ FPXaa ₃ TF
97	CD137L человека ID в Uniprot - P41273	MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLLL LLAAACAVFLACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPD DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGV SLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEG SGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL GLFRVTPEIPAGLPSRSE
98	FLAG	DYKDDDDK
99	6-гистидин	HHHHHH
100	HA	YPYDVPDYA
101	Аминокислотн ая последователь	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSDTTYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLDDYYYYYYMDVW

	ность V _H 12	GKGTTVTVSS
102	Последовательность нуклеиновой кислоты V _H 12	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCA GCCAGGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGG ATTCACCTTTAGAACTACGCAATGTCTTGGGTTTCGCCA GGCGCCCGGTAAGGGTCTGGAGTGGGTGTCTGCAATCT CTGGTTCTGGTGATACTACTTACTACGCCGACTCTGTGA AAGGTCGTTTTACCATAAGCCGCGACAATTCTAAGAAT ACTTTATATCTTCAAATGAATTCGCTGCGGGCAGAAGAC ACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAGGACTCACCTTTTCTA TTAGACGACTACTACTACTACTACTACATGGACGTATGG GGCAAGGGTACAACCTGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC
103	Аминокислотная последовательность V _H 13	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YMQMNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLDDYYYYYYMDVW GKGTTVTVSS
104	Последовательность нуклеиновой кислоты V _H 13	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCA GCCAGGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGG ATTCACCTTTGGTTCTTACGCAATGTCTTGGGTTTCGCCA GGCGCCCGGTAAGGGTCTGGAGTGGGTGTCTGCAATCT CTGGTTCTGGTGGTTCTACTTACTACGCCGACTCTGTGA AAGGTCGTTTTACCATAAGCCGCGACAATTCTAAGAAT ACTTTATATCTTCAAATGAATTCGCTGCGGGCAGAAGAC ACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAGGACTCACCTTTTCTA TTAGACGACTACTACTACTACTACTACATGGACGTATGG GGCAAGGGTACAACCTGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC
105	Аминокислотная последовательность V _L 12	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGDWLAWYQQKP GKAPKLLIYKASGLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPED FATYYCQQGNQFPLTFGQGRLE
106	Последовательность нуклеиновой кислоты V _L 12	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA TCTGTAGGAGACAGAGTAACCATCACTTGCCGGGCAAG TCAGGATATTGGTACTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGA AGCCTGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCG TCTGGTTTACAAAGTGGGGTCCCATCAAGATTCAGTGGC

		AGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACTATCAGCAA CCTGCAGCCAGAGGATTTTGC GACTTACTATTGTCAACA GGGTAACCAGTTCCCGCTCACCTTCGGCCAAGGGACAC GACTGGAG
107	CDR1.8 V _H	FTFGWYAMS
108	CDR2.12 V _H	SAISGSGDTTY
109	CDR1.9 V _L	RASQDIGDWLAW
110	CDR2.11 V _L	YKASGLQS
111	CDR3.1 V _H	AKA <u>S</u> PFLDDYYYYYYMD
112	CDR3.2 V _H	AKD <u>A</u> PFLDDYYYYYYMD
113	CDR3.3 V _H	AKD <u>S</u> AFLDDYYYYYYMD
114	CDR3.4 V _H	AKD <u>S</u> P <u>A</u> LLDDYYYYYYMD
115	CDR3.5 V _H	AKD <u>S</u> P <u>F</u> ALDDYYYYYYMD
116	CDR3.6 V _H	AKD <u>S</u> P <u>F</u> L <u>A</u> DDYYYYYYMD
117	CDR3.7 V _H	AKD <u>S</u> P <u>F</u> LL <u>A</u> DYYYYYYMD
118	CDR3.8 V _H	AKD <u>S</u> P <u>F</u> LLD <u>A</u> YYYYYYMD
119	CDR3.9 V _H	AKD <u>S</u> P <u>F</u> LLDD <u>A</u> YYYYYYMD
120	CDR3.10 V _H	AKD <u>S</u> P <u>F</u> LLDDY <u>A</u> YYYYYYMD
121	CDR3.11 V _H	AKD <u>S</u> P <u>F</u> LLDDY <u>Y</u> AYYYYYYMD
122	CDR3.12 V _H	AKD <u>S</u> P <u>F</u> LLDDY <u>Y</u> <u>Y</u> AYYYYYYMD
123	CDR3.13 V _H	AKD <u>S</u> P <u>F</u> LLDDY <u>Y</u> <u>Y</u> <u>Y</u> AYYYYYYMD
124	CDR3.14 V _H	AKD <u>S</u> P <u>F</u> LLDDY <u>Y</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>Y</u> AYYYYYYMD
125	CDR3.15 V _H	AKD <u>S</u> P <u>F</u> LLDDY <u>Y</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>Y</u> A <u>D</u>
126	CDR3.16 V _H	DXXXXLXXXXYXYX
127	CDR3.17 V _H	DXPFXLDXXYYYYYX
128	CDR3.18 V _H	DX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ LX ₅ X ₆ X ₇ X ₈ YX ₉ YYX ₁₀
129	Тяжелая цепь mAb1	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLDDYYYYYYMDVW GKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEV

		QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLGLG
130	V1 тяжелой цепи mAb8	GTEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISGSGDTTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLDDY YYYYYYMDV WGKGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLG
131	V2 тяжелой цепи mAb8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGDTTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLDDY YYYYYYMDVW GKGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLGLG

132	Тяжелая цепь mAb10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYGYAMSWVRQ APGKGLEWVAAISGSGDSTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLDDYYYYYYMDVW GKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVP SSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCPPCPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLGLG
133	Легкая цепь mAb1, mAb8 и mAb10	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPED FATYYCQQGHLFPITFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которая специфически связывает CD137 человека, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленные SEQ ID NO: 48, 56 и 68 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные SEQ ID NO: 69, 78 и 89 соответственно.

2. Выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающая часть по п.1, где антитело или антигенсвязывающая часть проявляют, по меньшей мере, одно или более из следующих свойств, выбранных из группы, состоящей из следующего:

- (a) индуцируют или повышают димеризацию тримеров CD137;
- (b) индуцируют или повышают мультимеризацию тримеров CD137;
- (c) индуцируют или повышают активацию Т-клеток;
- (d) индуцируют или повышают цитотоксический Т-клеточный ответ;
- (e) индуцируют или повышают пролиферацию Т-клеток;
- (f) индуцируют или повышают продуцирование цитокинов и
- (g) любой комбинации свойств, приведенных в (a)-(f).

3. Выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающая часть по п.1 или 2, где антитело или антигенсвязывающая часть проявляют, по меньшей мере, одно или более из следующих свойств по сравнению с эталонным антителом, которое связывает CD137 человека, выбранных из группы, состоящей из следующего:

- (a) не индуцируют или не повышают внутрипеченочную активацию Т-клеток;
- (b) не индуцируют или не повышают внутрипеченочную пролиферацию Т-клеток;
- (c) не индуцируют или не повышают внутриселезеночную активацию Т-клеток;
- (d) не индуцируют или не повышают внутриселезеночную пролиферацию Т-клеток;
- (e) не индуцируют или не повышают активацию макрофагов;
- (f) не индуцируют или не повышают дифференцировку макрофагов;
- (g) не индуцируют повышение уровня или не повышают активность аланинаминотрансферазы (ALT) и
- (h) любой комбинации свойств, приведенных в (a)-(g).

4. Выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающая часть по п.3, где эталонным антителом является урелумаб.

5. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающую часть по любому из пп.1-4 и фармацевтически приемлемый носитель.

6. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую как легкую,

так и тяжелую цепи выделенного моноклонального антитела или антигенсвязывающей части по любому из пп.1-4.

7. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.6.

8. Клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии по п.7.

9. Способ обеспечения продуцирования моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, которые специфически связывают CD137 человека, при этом способ предусматривает поддержание клетки по п.8 в условиях, обеспечивающих возможность экспрессии моноклонального антитела или антигенсвязывающей части.

10. Способ индуцирования или повышения димеризации тримеров CD137 человека у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или антигенсвязывающей части по любому из пп.1-4 или фармацевтической композиции по п.5.

11. Способ индуцирования или повышения активации Т-клеток у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или антигенсвязывающей части по любому из пп.1-4 или фармацевтической композиции по п.5.

12. Способ по п.11, где активация Т-клеток осуществляется в микроокружении опухоли.

13. Способ индуцирования или повышения цитотоксического Т-клеточного ответа и/или пролиферации Т-клеток у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или антигенсвязывающей части по любому из пп.1-4 или фармацевтической композиции по п.5.

14. Способ по п.13, где цитотоксический Т-клеточный ответ осуществляется в микроокружении опухоли.

15. Способ индуцирования или повышения продуцирования цитокинов иммунной клеткой и/или индуцирования противоопухолевого иммунного ответа памяти у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или антигенсвязывающей части по любому из пп.1-4 или фармацевтической композиции по п.5.

16. Способ по п.15, где продуцируемый цитокин представляет собой IL-2, TNF α , IL-13, IFN γ или их комбинации.

17. Способ по п.15 или 16, где продуцирование цитокинов осуществляется в микроокружении опухоли.

18. Способ уменьшения или подавления роста опухоли, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или антигенсвязывающей части по любому из пп.1-4 или фармацевтической композиции по п.5.

19. Способ лечения рака у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества выделенного моноклонального антитела или антигенсвязывающей части по любому из пп.1-4 или фармацевтической композиции по п.5.

20. Способ по п.19, где инфильтрация иммунными клетками микроокружения опухоли повышается после введения выделенного моноклонального антитела или антигенсвязывающей части.

21. Способ по п.20, где иммунные клетки экспрессируют CD45.

22. Способ по любому из пп.19-21, где количество регуляторных Т-клеток (Treg) уменьшается в микроокружении опухоли после введения выделенного моноклонального антитела или антигенсвязывающей части.

23. Способ по п.22, где клетки Treg экспрессируют CD4, FOXP-3 и CD25.

24. Способ по любому из пп.19-23, где количество макрофагов уменьшается в микроокружении опухоли после введения выделенного моноклонального антитела или антигенсвязывающей части.

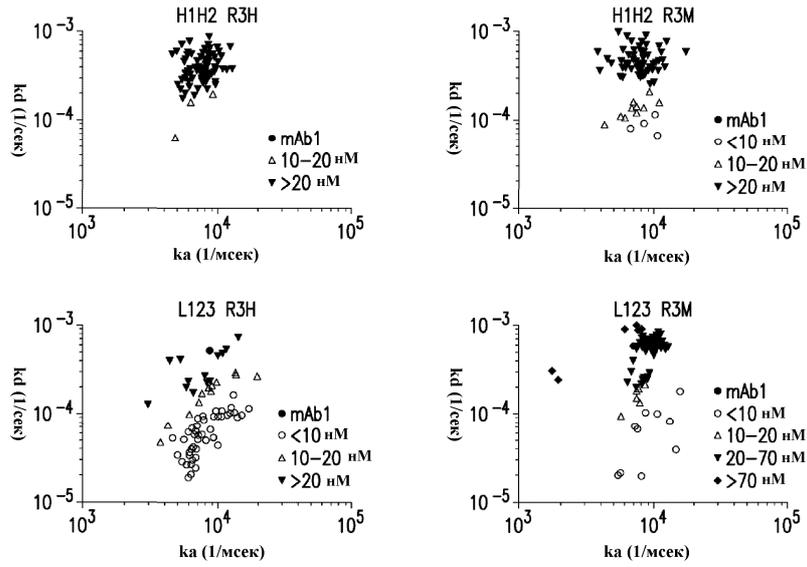
25. Способ по п.24, где макрофаги экспрессируют CD45 и CD11b.

26. Способ по любому из пп.19-25, где истощение Т-клеток уменьшается в микроокружении опухоли после введения выделенного моноклонального антитела или антигенсвязывающей части.

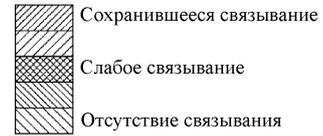
27. Способ по п.26, где уменьшение истощения Т-клеток предусматривает снижение экспрессии TIGIT, PD-1, LAG-3 или их комбинаций.

28. Способ по любому из пп.19-27, где рак выбран из группы, состоящей из меланомы, глиомы, рака почки, рака молочной железы, гемобластома и рака головы и шеи.

29. Способ по п.28, где гемобластома представляет собой В-клеточную лимфому.



Фиг. 1



Положение	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	100E	100F	100G	100H	100I
Аминокислота	D	S	P	F	L	L	D	D	Y	Y	Y	Y	Y	Y	M
huCD137															
mCD137															

Фиг. 2

LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC
 SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAEC
 DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCK
 DCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCG

mAb1

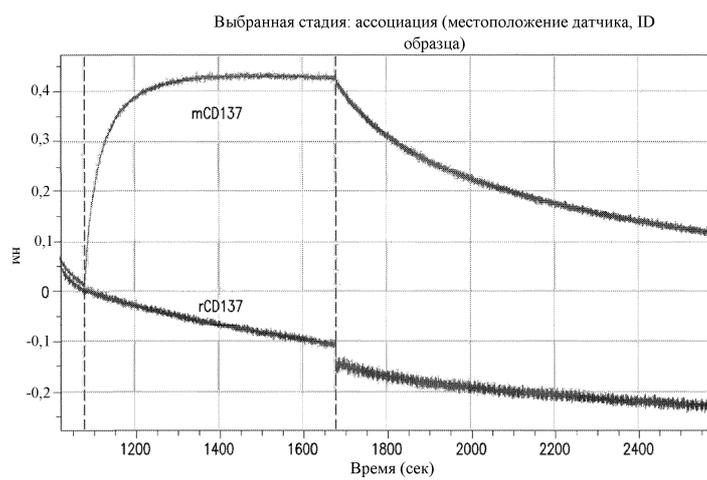
LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC
 SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAEC
 DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCK
 DCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCG

mAb4

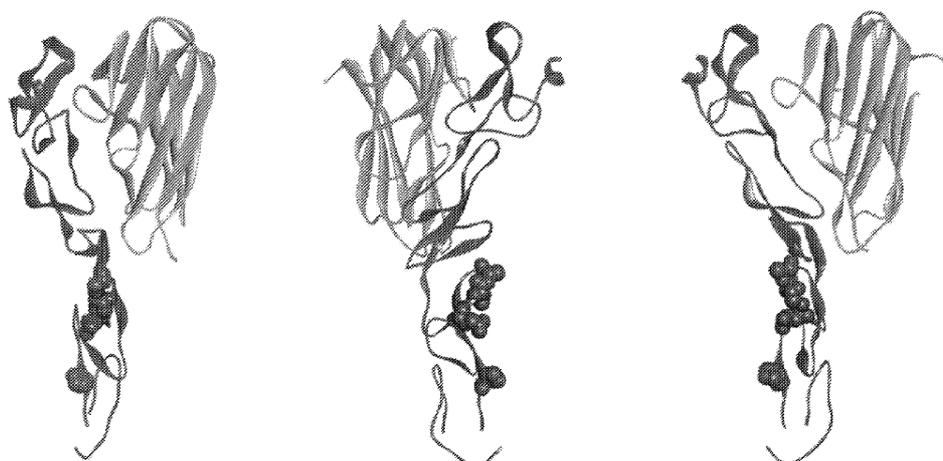
LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC
 SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAEC
 DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCK
 DCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCG

mAb5

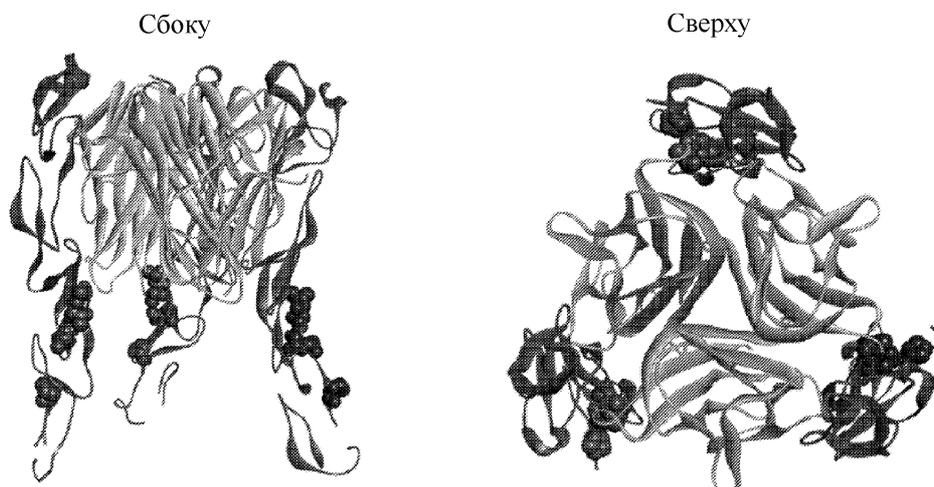
Фиг. 3А



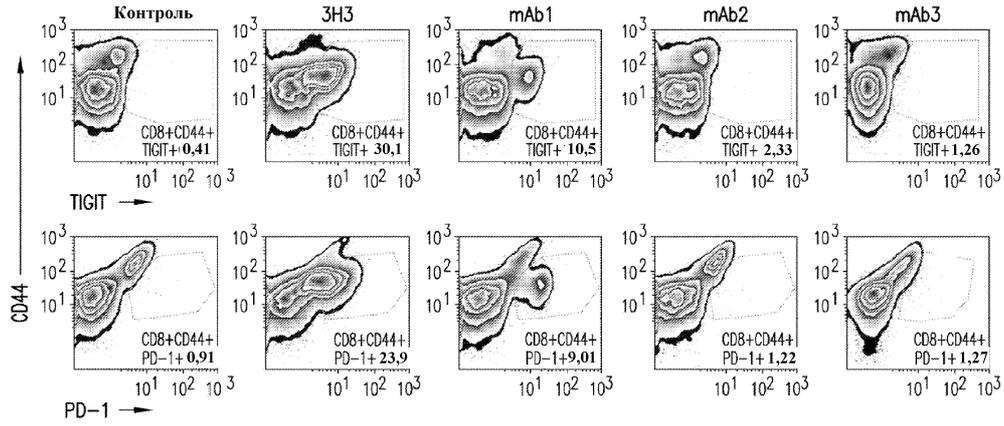
Фиг. 3В



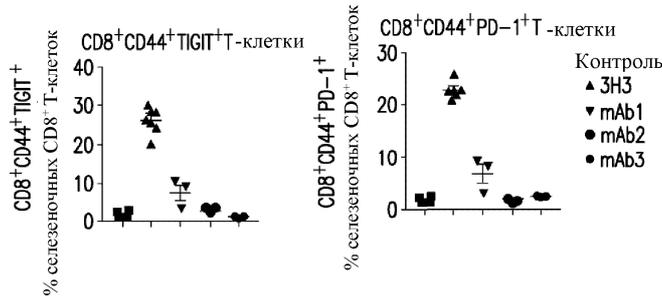
Фиг. 3С



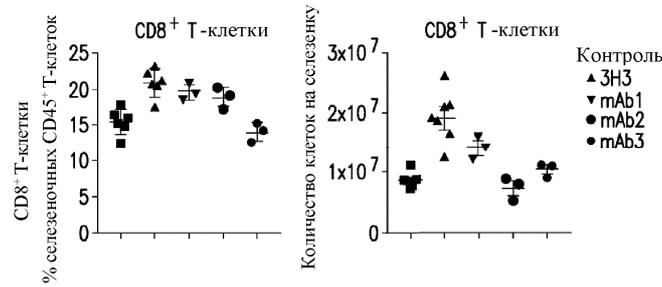
Фиг. 3D



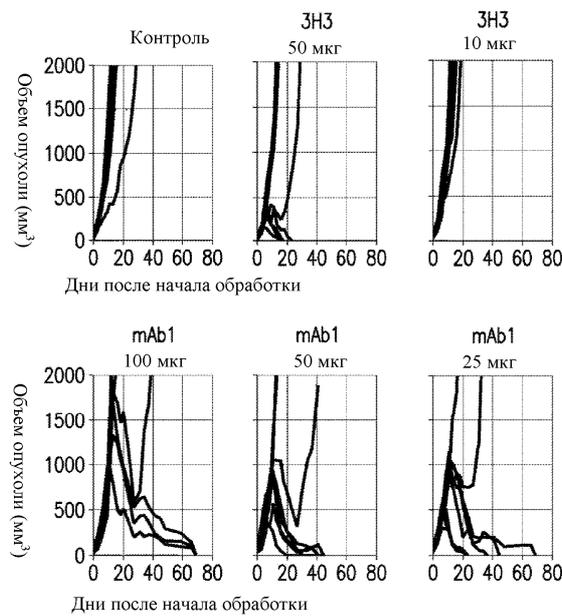
Фиг. 4А



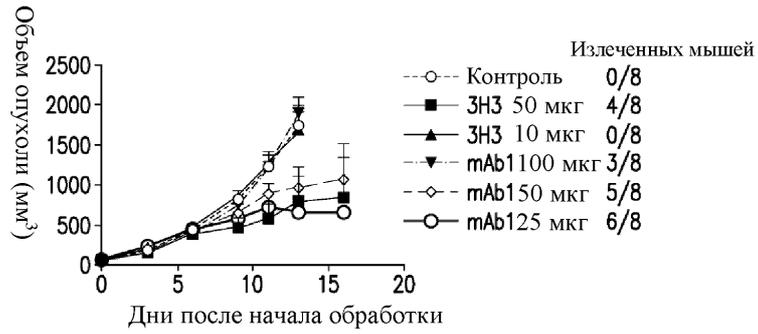
Фиг. 4В



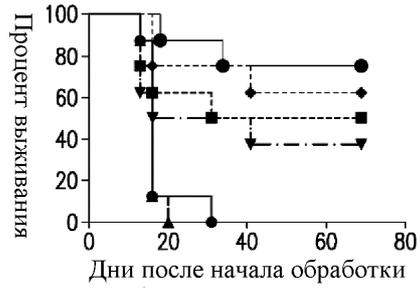
Фиг. 4С



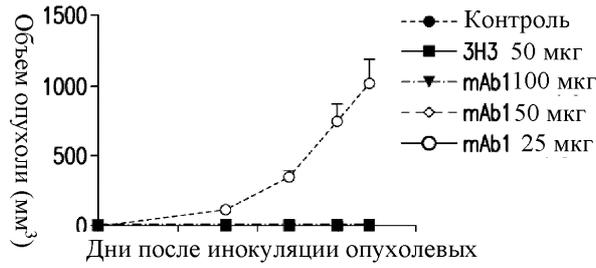
Фиг. 5А



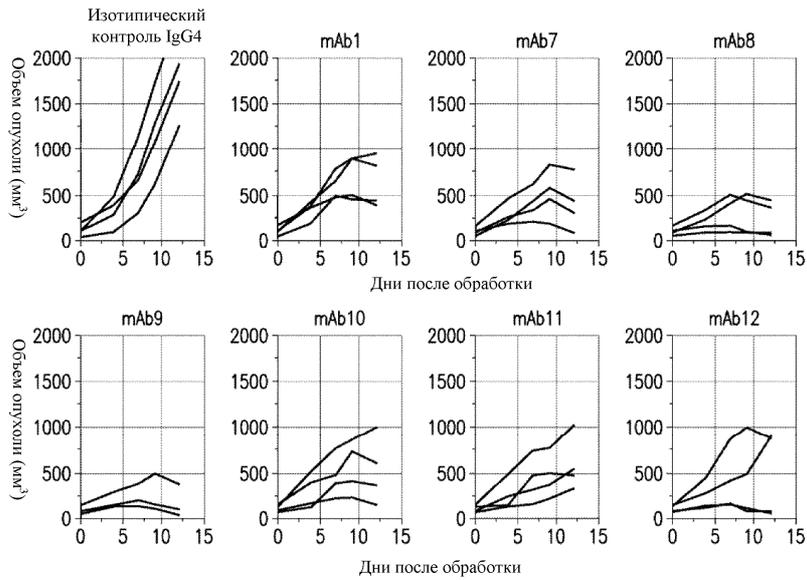
Фиг. 5B



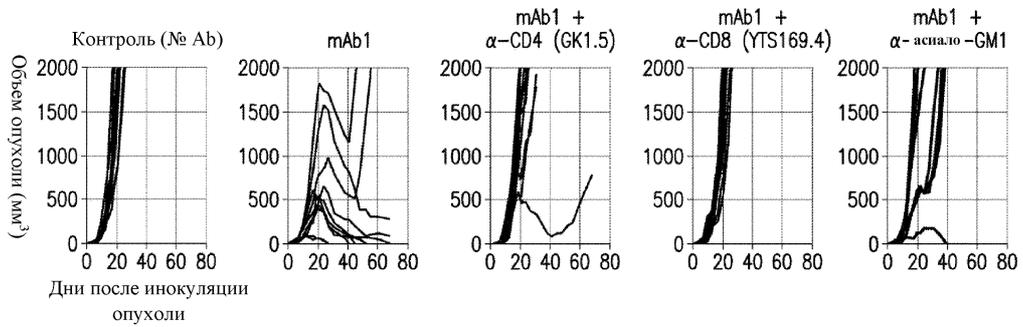
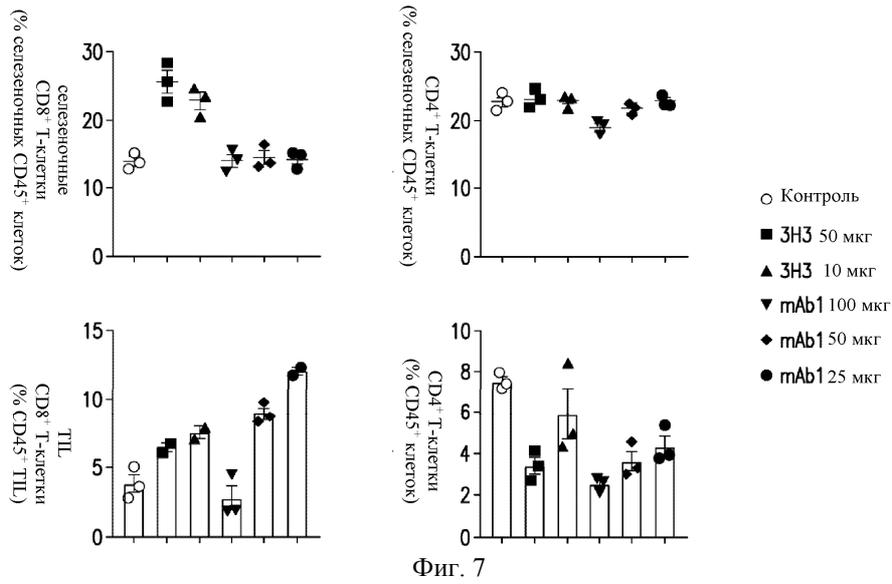
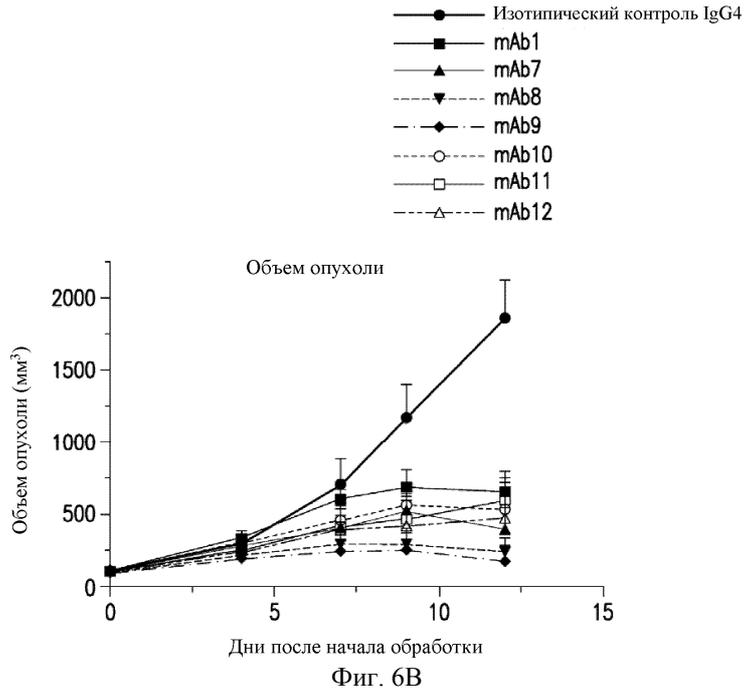
Фиг. 5C

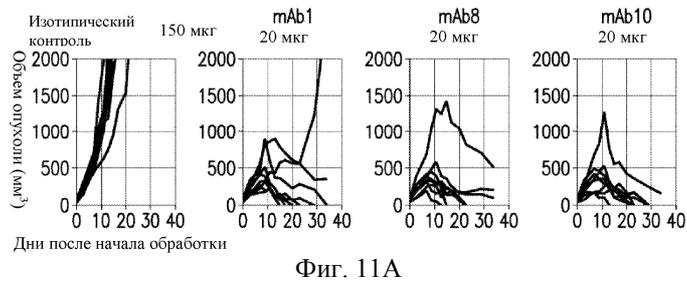
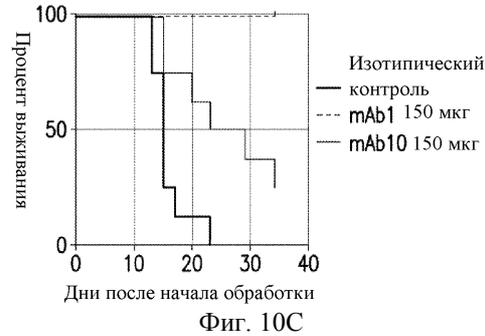
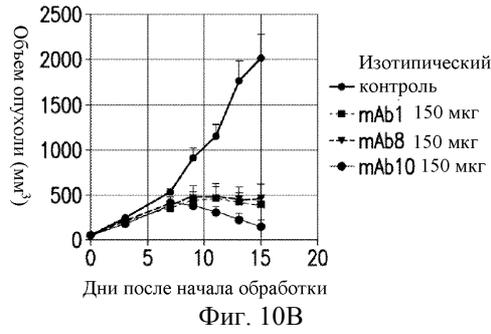
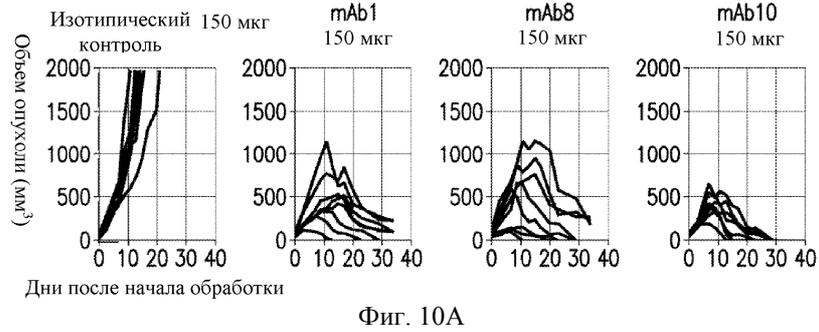
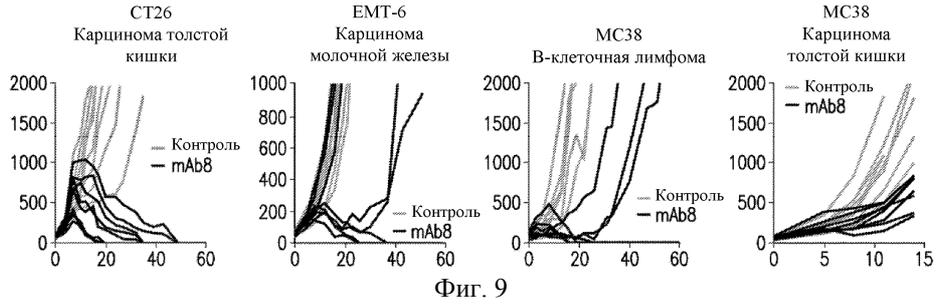


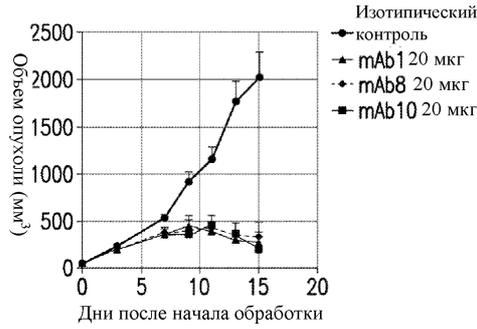
Фиг. 5D



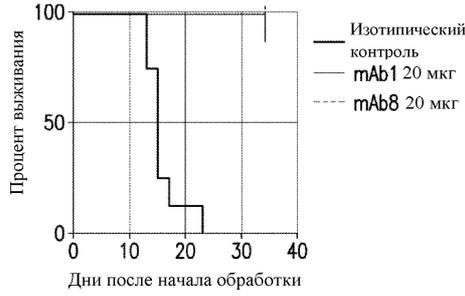
Фиг. 6A



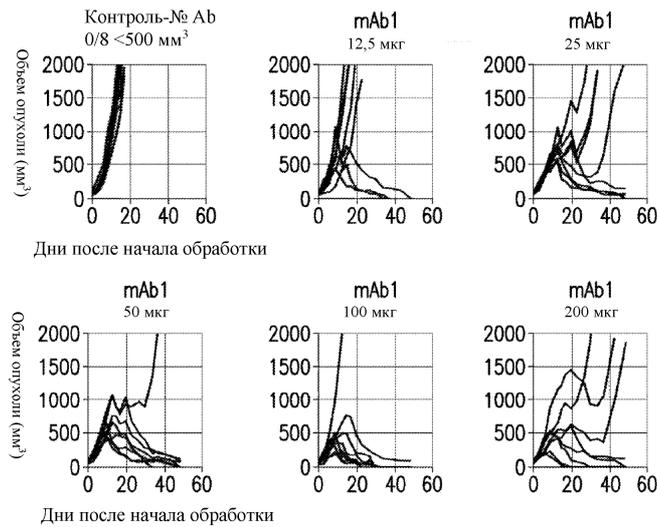




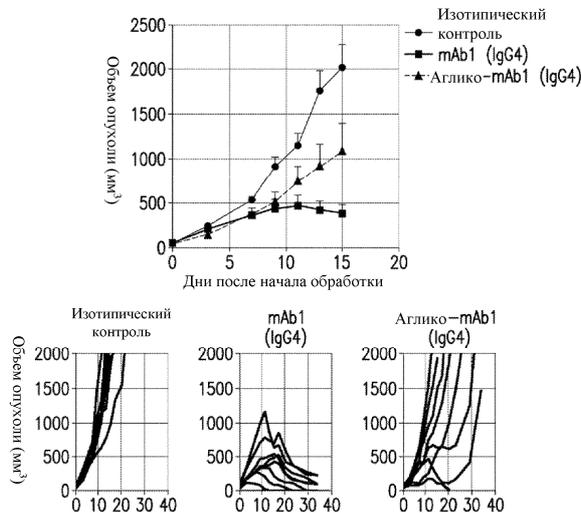
Фиг. 11В



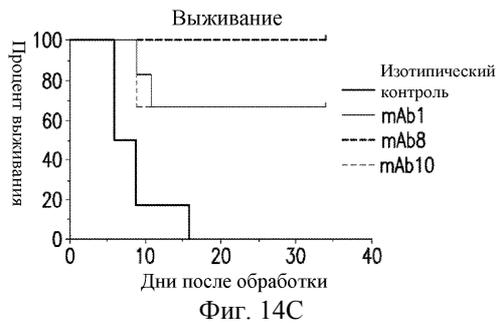
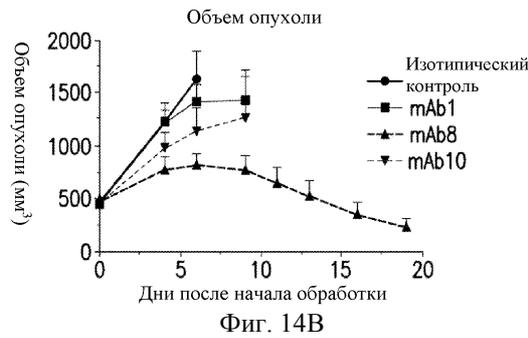
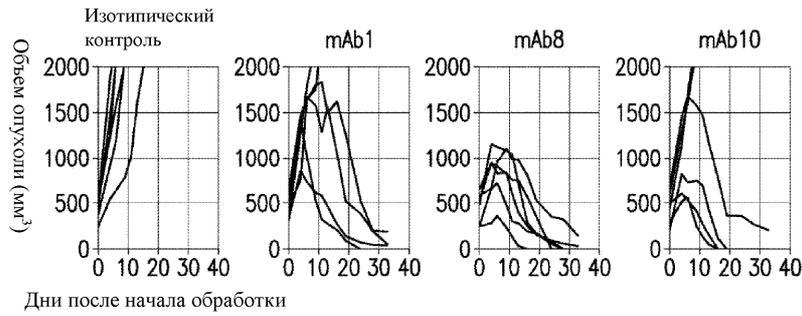
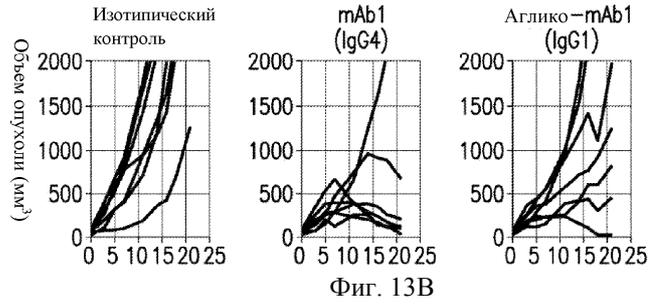
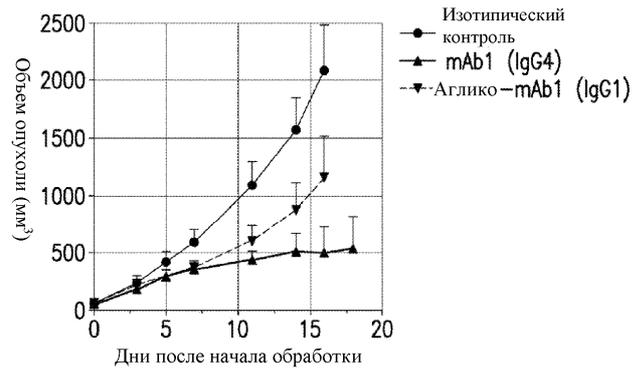
Фиг. 11С

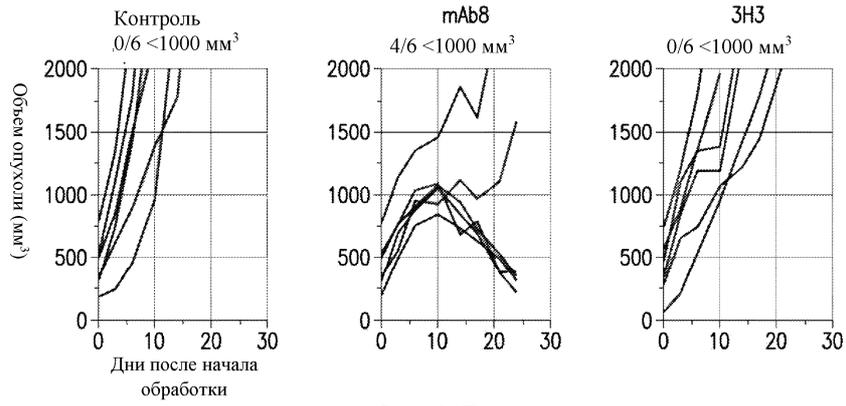


Фиг. 12

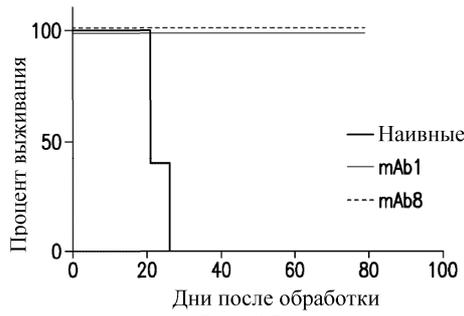


Фиг. 13А

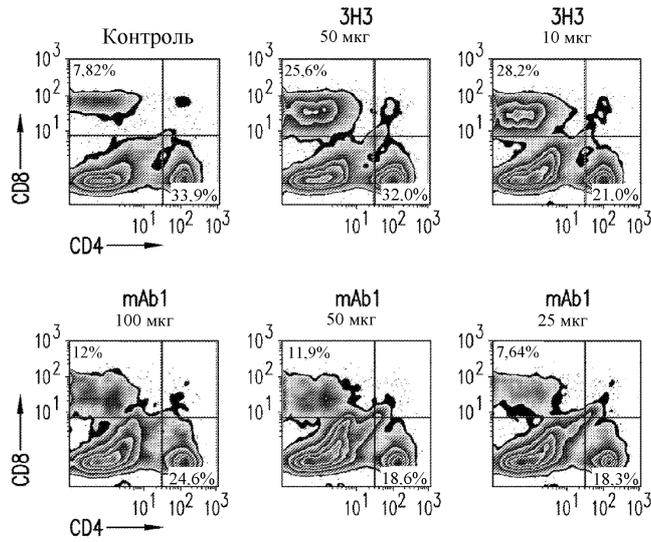




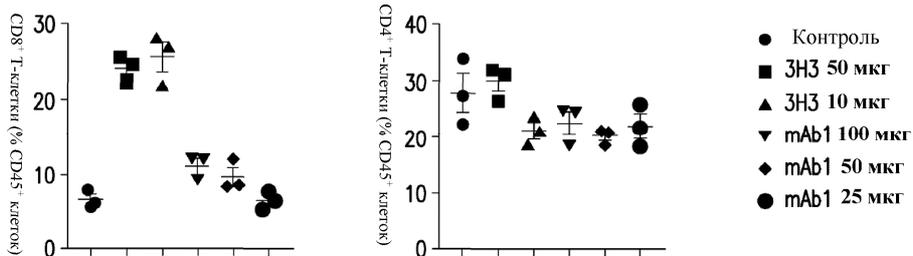
Фиг. 14D



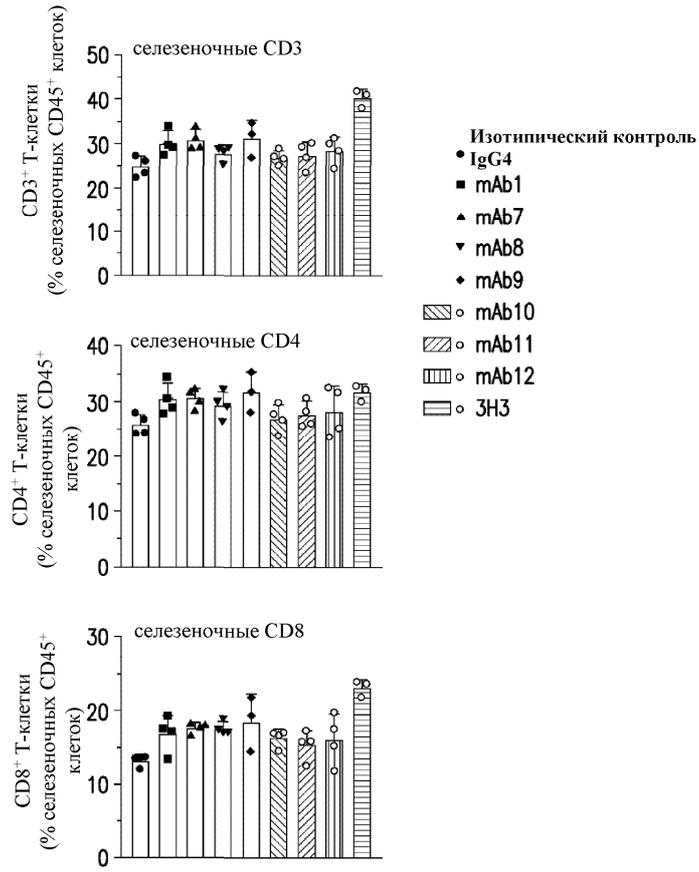
Фиг. 15



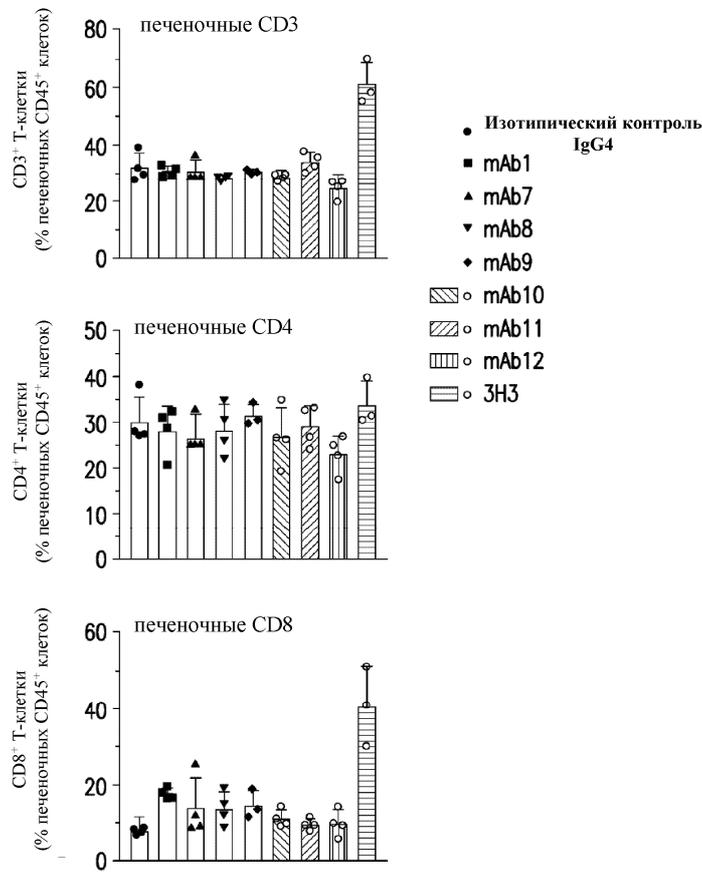
Фиг. 16A



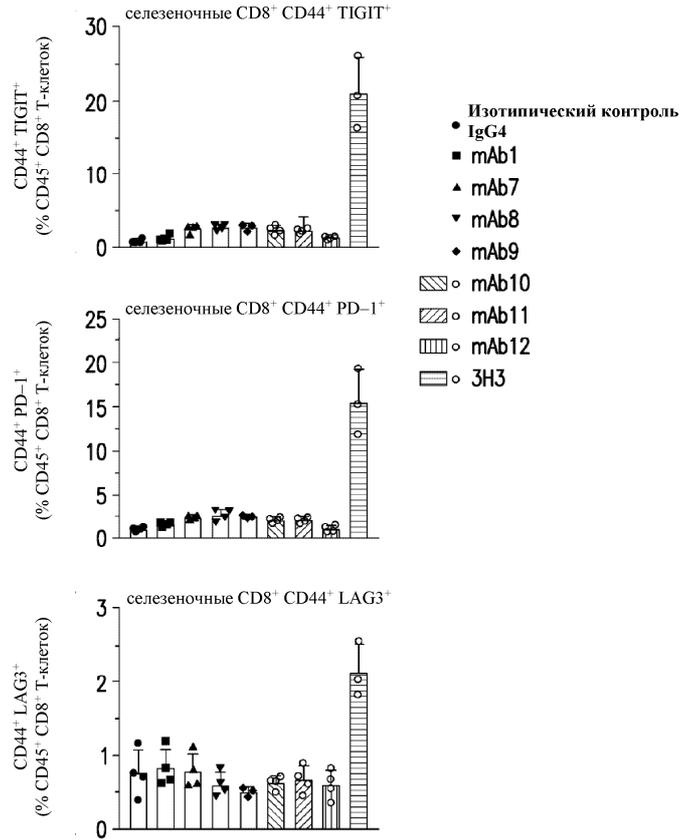
Фиг. 16B



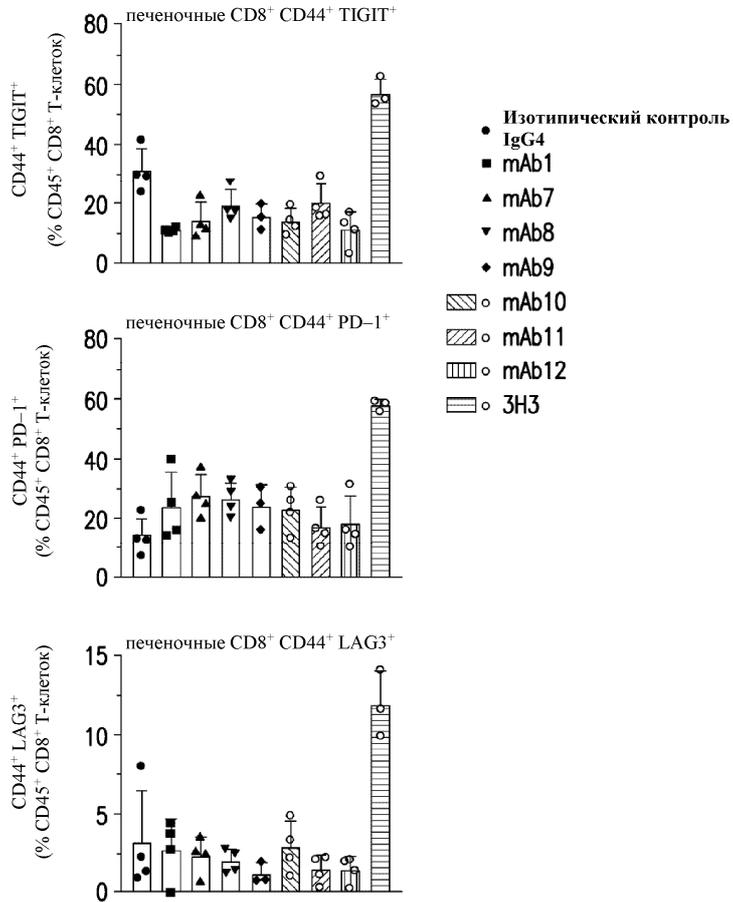
Фиг. 17А



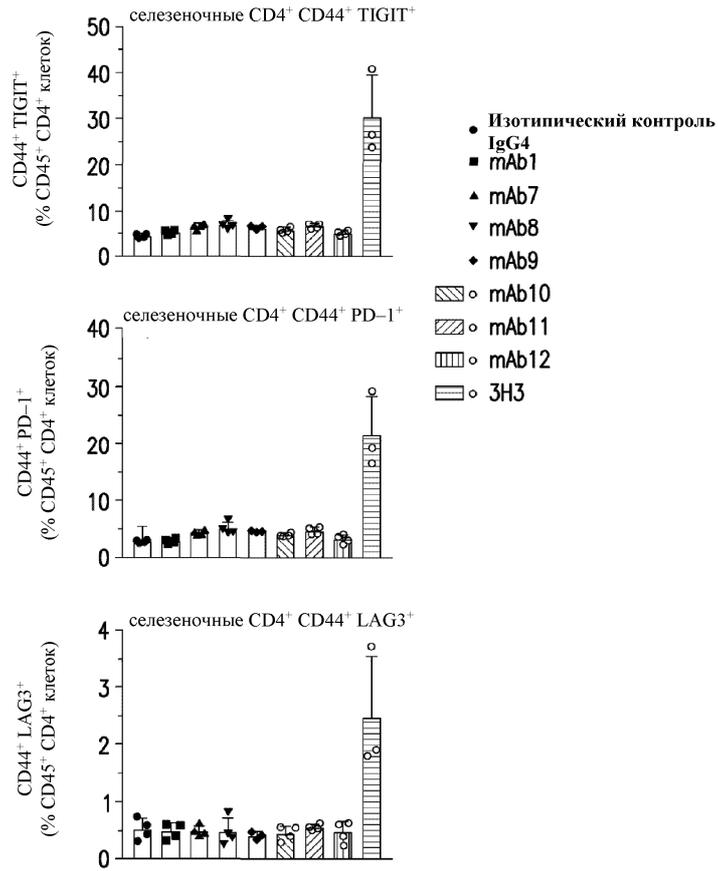
Фиг. 17В



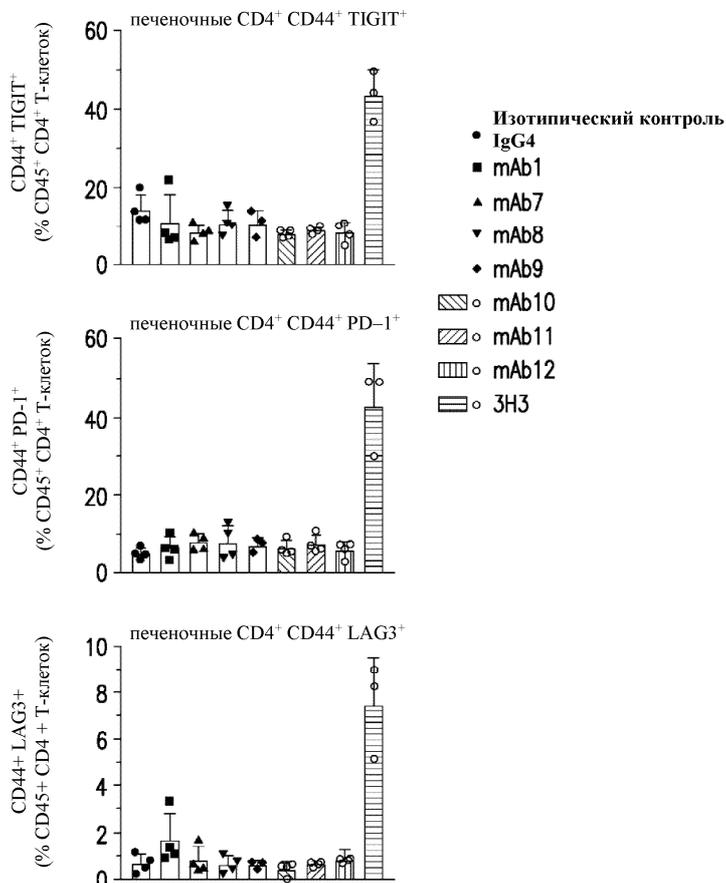
Фиг. 18А



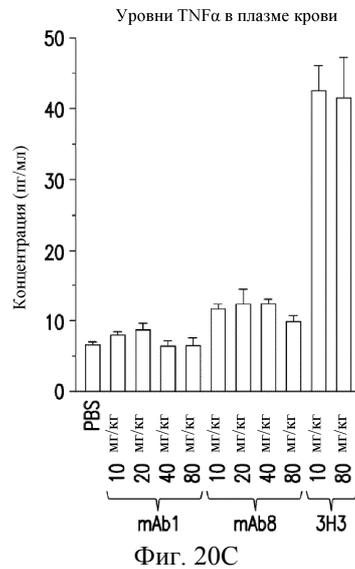
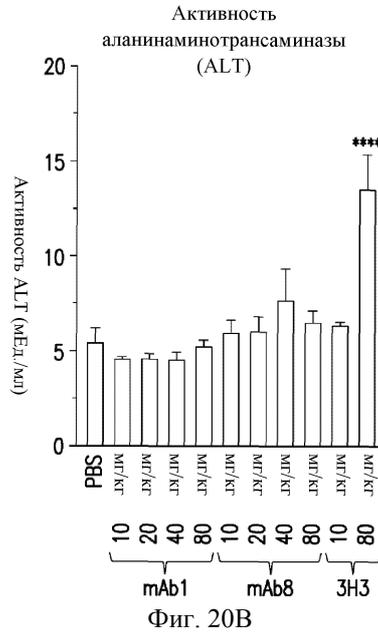
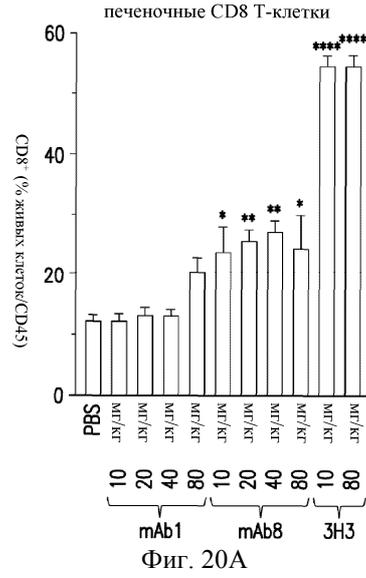
Фиг. 18В

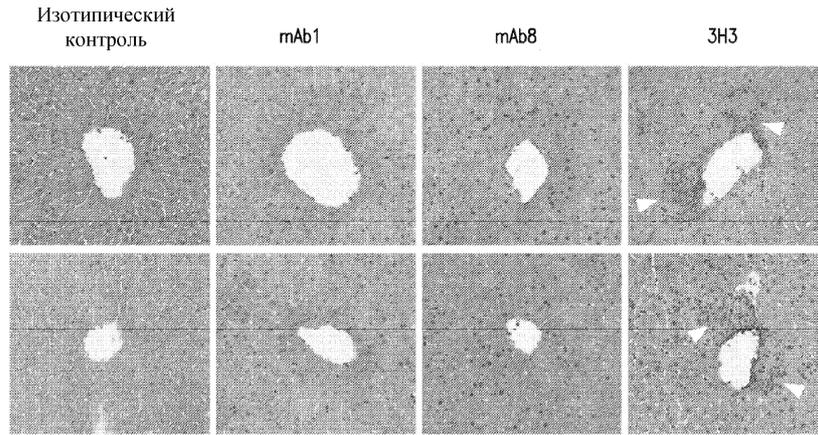


Фиг. 19А

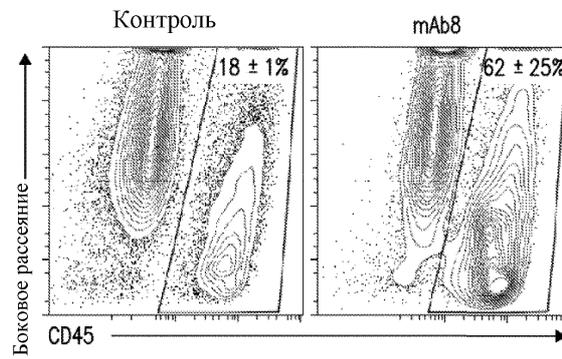


Фиг. 19В

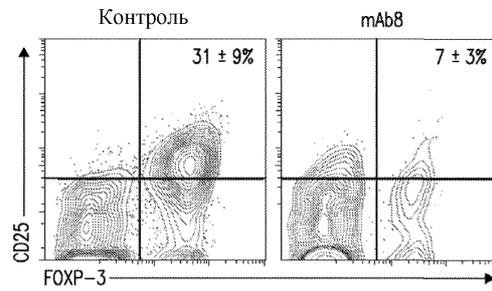




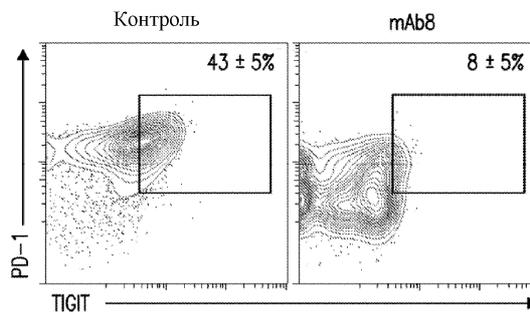
Фиг. 21



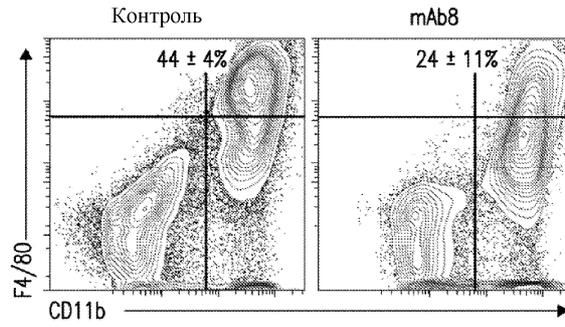
Фиг. 22А



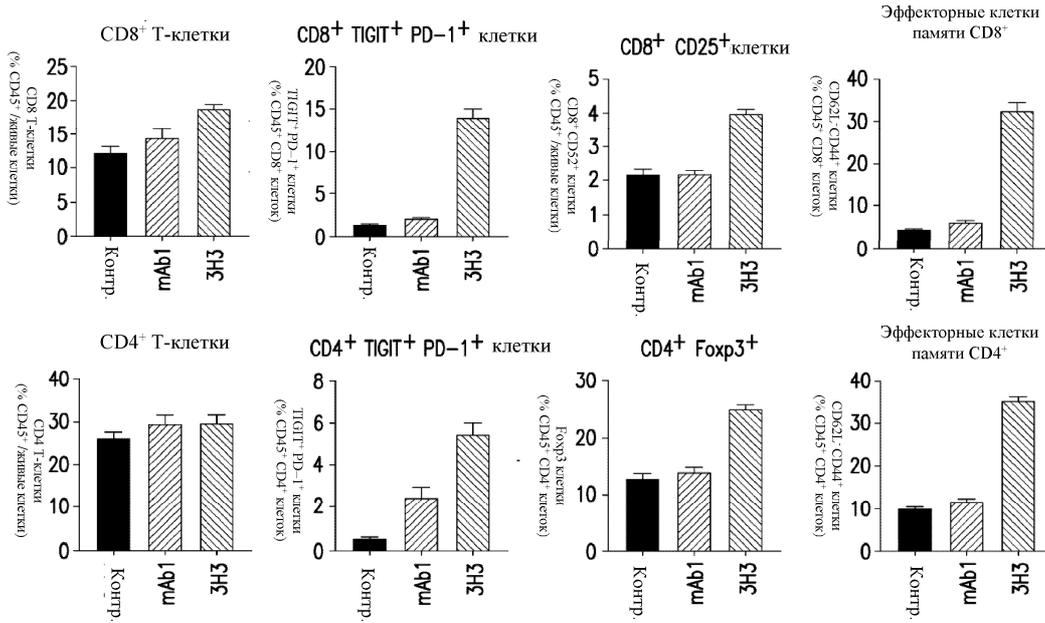
Фиг. 22В



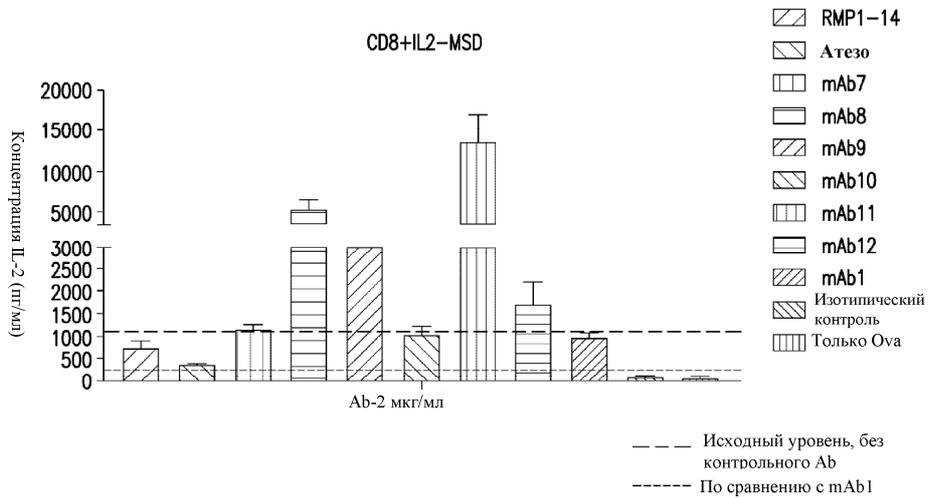
Фиг. 22С



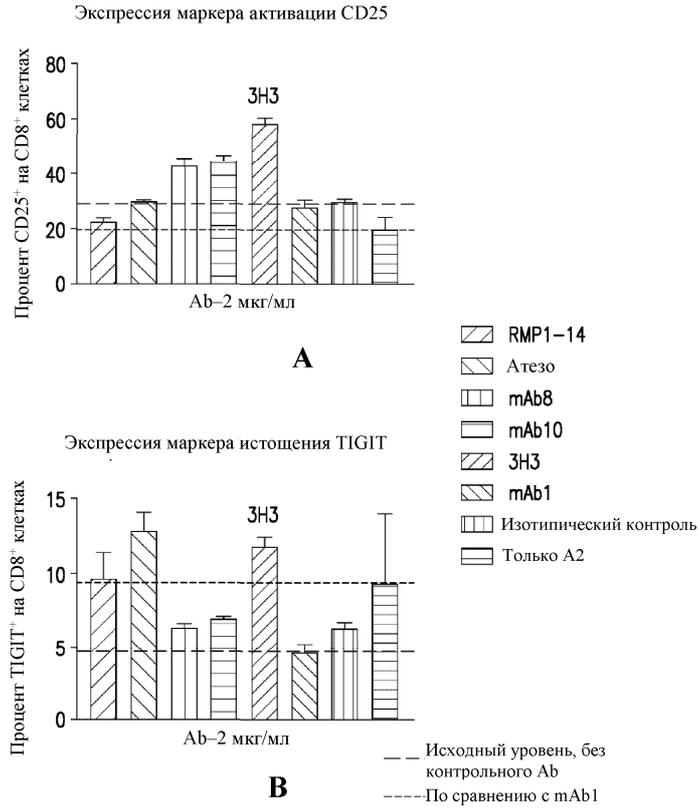
Фиг. 22D



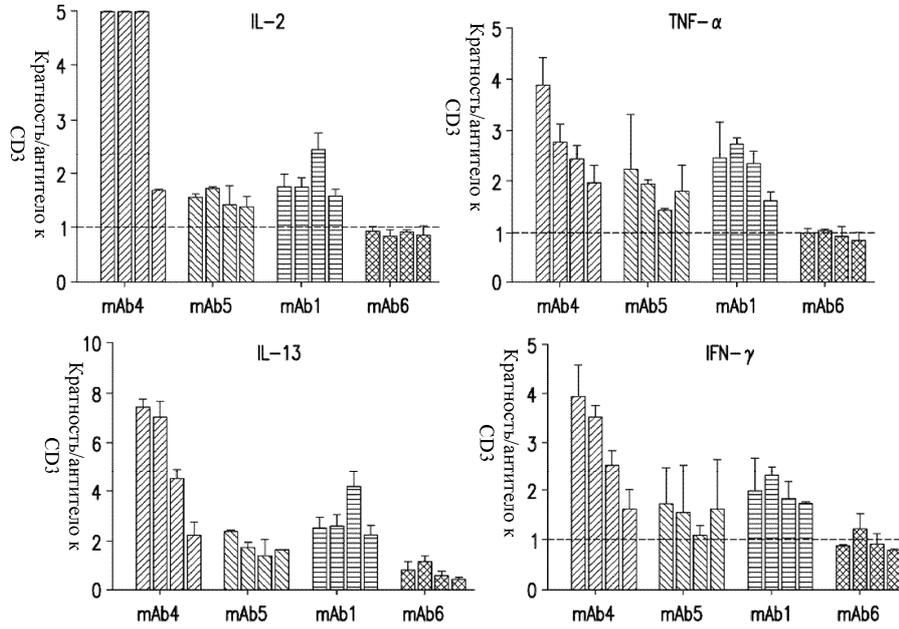
Фиг. 23



Фиг. 24

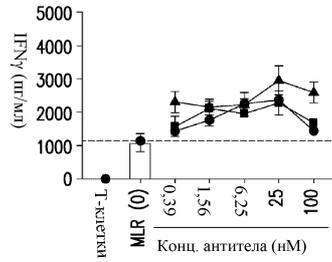
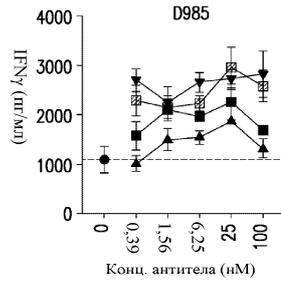


Фиг. 25А-В

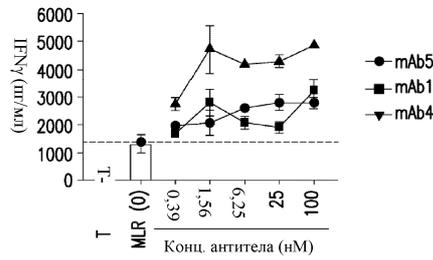
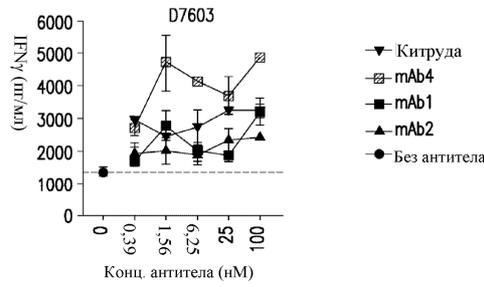


Фиг. 26

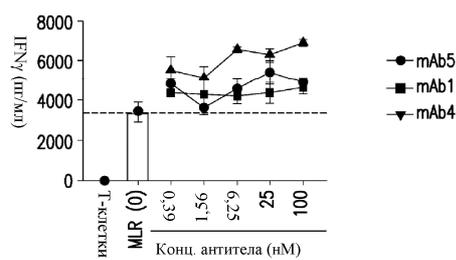
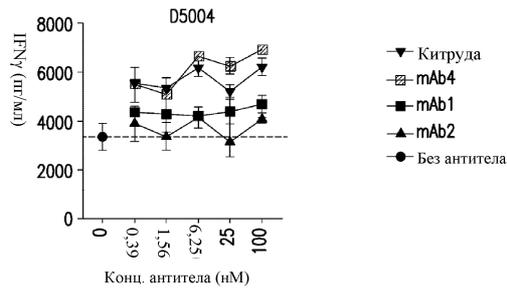
046914



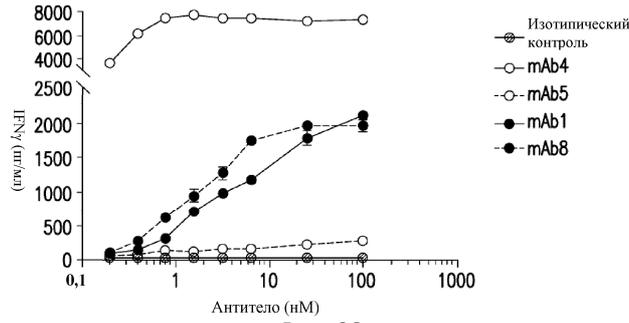
Фиг. 27А



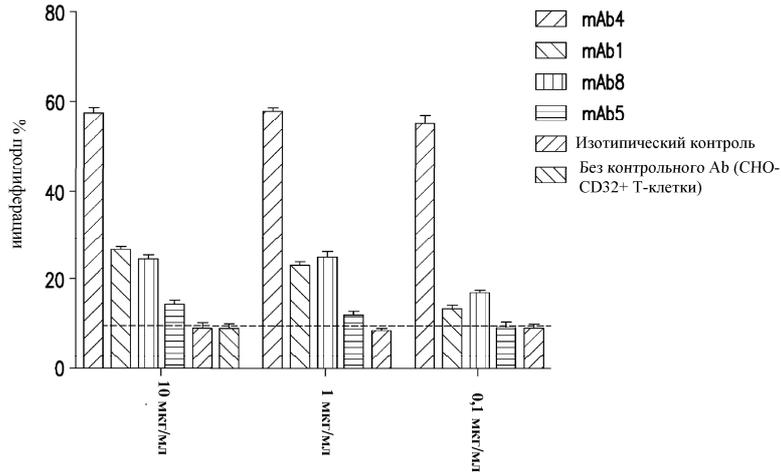
Фиг. 27В



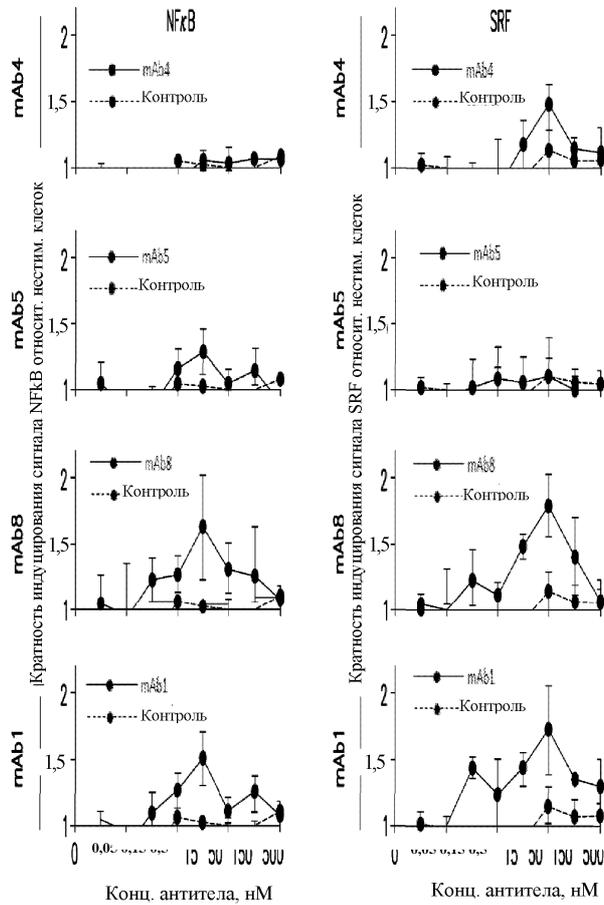
Фиг. 27С



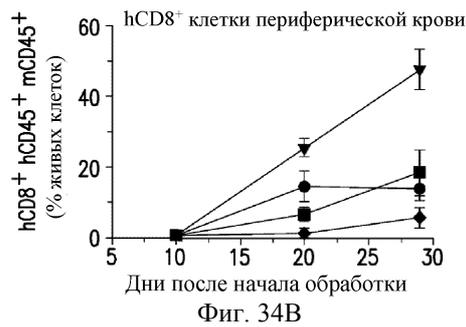
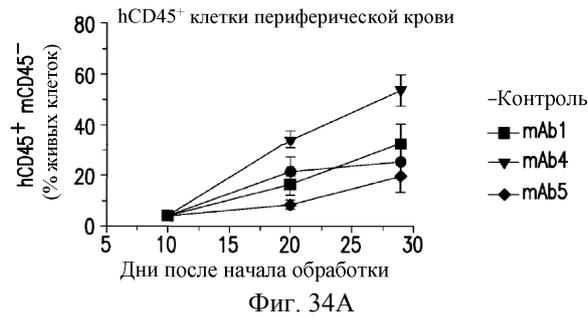
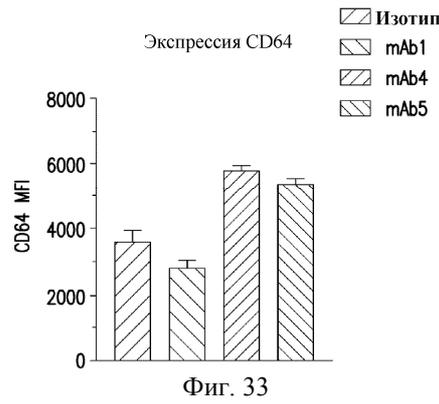
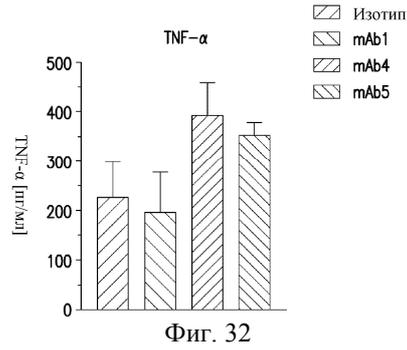
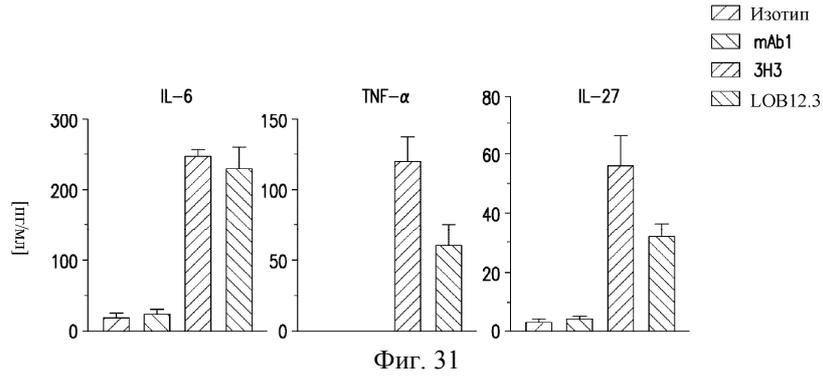
Фиг. 28

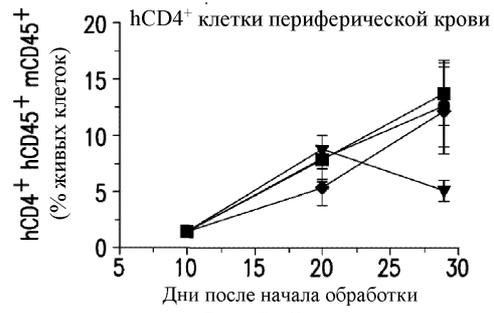


Фиг. 29



Фиг. 30





Фиг. 34С

