

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392756 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.07

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.04.01

(54) НОВЫЕ TNFR2-СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ

(31) 21166756.3

(32) 2021.04.01

(33) EP

(86) PCT/EP2022/058788

(87) WO 2022/207921 2022.10.06

(71) Заявитель:

ЮЛИУС-МАКСИМИЛИАНС-
УНИВЕРСИТЕТ ВЮРЦБУРГ (DE)

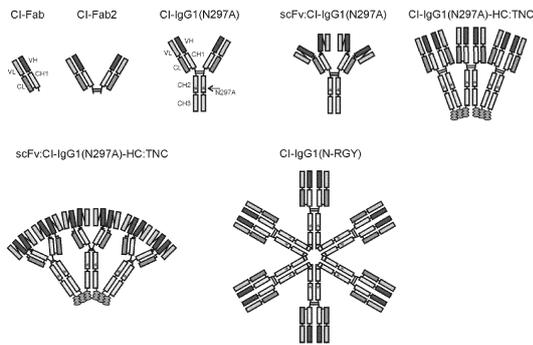
(72) Изобретатель:

Ваянт Харальд, Байльхак Андреас,
Медлер Юлиане, Штайнфатт Тим
(DE), Ромпай Люк Ван (BE)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к связывающей молекуле, которая специфически связывает TNFR2, но не TNFR1. Предпочтительно связывающая молекула представляет собой FcγR-независимый агонист TNFR2 и более предпочтительно имеет валентность по меньшей мере два для связывания TNFR2. Связывающие молекулы имеют множество применений, включая диагностические и терапевтические. Способность связывающих молекул модулировать иммунные реакции означает, что они являются особенно подходящими для лечения аутоиммунных заболеваний или воспалительных состояний.



A1

202392756

202392756

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579373EA/025

НОВЫЕ TNFR2-СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к связывающим молекулам, специфичным к TNFR2 (рецептор 2 фактора некроза опухоли, также известный как TNFRSF1B и CD120B). Связывающие молекулы обычно способны связываться с TNFR2 и запускать передачу сигналов TNFR2 независимо от связывания Fc γ R (Fc гамма-рецептор). Связывающие молекулы могут быть использованы для воздействия на клетки, экспрессирующие TNFR2. Настоящее изобретение также относится к применению связывающих молекул в способах лечения и диагностики, особенно при лечении таких состояний, как воспалительные заболевания и аутоиммунные заболевания.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

TNF α представляет собой цитокин с широким спектром ролей в воспалении, дифференцировке и гомеостазе тканей, который встречается в растворимой и трансмембранной формах. Он является ключевым медиатором воспаления, на который в клинике воздействуют реагентами, блокирующими TNF, для подавления нежелательных иммунных реакций при воспалительных и аутоиммунных состояниях. TNFR1 и TNFR2 представляют собой разные рецепторы фактора некроза опухоли-альфа (TNF α) с передачей сигналов через каждый из этих рецепторов, вызывающих разные эффекты. Передача сигналов через TNFR1 вызывает сильные и разнообразные провоспалительные эффекты, в то время как передача сигналов через TNFR2 имеет более широкий спектр эффектов, начиная от иммунной стимуляции до подавления иммунных ответов и регенерации тканей. Два рецептора также отличаются друг от друга клетками, на которых они экспрессируются. TNFR1 экспрессируется повсеместно, тогда как TNFR2 обнаруживают в более ограниченной группе клеток, в частности в подмножествах иммунных клеток, эндотелиальных клетках и нейронах. Иммунные клетки, экспрессирующие TNFR2, включают типы иммуносупрессорных клеток, такие как T-регуляторные клетки (Treg), B-регуляторные клетки (Breg) и MDSC (клетки-супрессоры миелоидного происхождения), а также другие типы клеток, такие как CD8⁺ T-клетки.

TNFR1 и TNFR2 имеют внеклеточный домен, содержащий четыре характерных богатых цистеином домена (CRD), трансмембранный сегмент и внутриклеточный домен. В отличие от TNFR1, TNFR2 не включает цитоплазматический домен смерти, но все же может играть роль в апоптозе, контролируя факторы, регулирующие клеточную смерть, такие как TRAF2 и cIAP. Молекулы TNFR2 способны связываться друг с другом, образуя димерные и тримерные комплексы TNFR2, которые могут связывать TNF α с высоким сродством, что приводит к образованию олигомеров тримерных комплексов TNF-TNFR2, способных передавать внутриклеточные сигналы. Хотя и TNFR1, и TNFR2 могут экспрессироваться на поверхности клеток одного и того же типа, они не образуют комплексов друг с другом. TNFR2 способен связывать как растворимый, так и

мембраносвязанный TNF α . Связывание мембранного TNF α способно эффективно активировать TNFR2, но с растворимым TNF α олигомеризация тримеров TNFR2 на основе лигандов, до гексамеров или комплексов более высокой размерности является неэффективной и, следовательно, не может вызывать эффективную активацию TNFR2. Считается, что не только TNF α , но и лимфотоксин-альфа (LT α) также действует как лиганд для TNFR2.

Предполагается, что когда TNFR2 активируется мембранным TNF α , внутриклеточные домены рецептора рекрутируют существующие цитоплазматические тримеры TRAF2, следствием чего является рекрутирование в комплексы TNFR2 E3-лигаз cIAP1 и cIAP2, что приводит к классической передаче сигналов NF κ B. Рекрутирование TRAF2 также связано с активацией альтернативного сигнального пути NF κ B. Также считается, что связывание мембранного TNF α с TNFR2 запускает передачу сигналов по пути PI3K/Akt, поддерживая выживаемость и усиливая пролиферацию, а также способствуя другим функциям, таким как клеточная адгезия и миграция. Мыши, нокаутные по TNFR2, более предрасположены к воспалительным заболеваниям и, хотя у них есть Treg-клетки, они менее реактивны. Также существуют природные полиморфизмы TNFR2, которые связаны с широким спектром аутоиммунных заболеваний.

Экспрессия TNFR2 на клетках Treg и его функция в этих клетках делают TNFR2 желательной мишенью для модуляции иммунной системы, особенно потому, что TNFR2 встречается в более ограниченном подмножестве клеток, чем TNFR1. Способность стимулировать Treg-клетки позволяет обеспечить возможность контролировать нежелательные иммунные реакции в широком диапазоне состояний, при которых их способность подавлять иммунные реакции может быть полезной, включая аллергию, аутоиммунитет, трансплантацию, реакцию «трансплантат против хозяина» (GVHD) и инфекционные заболевания. Для достижения желаемых функций мишенью могут быть не только помимо Treg-клетки, но и другие типы клеток, экспрессирующие TNFR2. По этой причине существует постоянная потребность в агентах, которые нацелены и активируют TNFR2.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к связывающим молекулам, способным связывать внеклеточный домен TNFR2. В предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению способна связывать TNFR2 и запускать передачу сигнала через рецептор, действуя как агонист. В следующем особенно предпочтительном варианте осуществления связывающие молекулы могут действовать как агонисты TNFR2 независимо от связывания Fc γ R. В особенно предпочтительном варианте осуществления связывающие молекулы по настоящему изобретению представляют собой антитела или фрагменты антител. В следующем особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения связывающие молекулы являются селективными, поскольку они специфически связываются с TNFR2,

но не с TNFR1.

Связывающие молекулы могут иметь множество применений: от диагностических до терапевтических. Поскольку связывающие молекулы обладают способностью модулировать иммунную систему, они особенно полезны при лечении аутоиммунных состояний и воспалительных состояний. Связывающие молекулы могут быть использованы для подавления иммунной системы благодаря их действию на Treg-клетки и поэтому особенно полезны при лечении таких состояний, включая, в частности, болезнь «трансплантат против хозяина» (GvHD).

Соответственно, в одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к связывающей молекуле, которая специфически связывается с TNFR2, но не с TNFR1, где связывающая молекула представляет собой FcγR-независимый агонист TNFR2 и имеет валентность связывания TNFR2, равную по меньшей мере двум. В особенно предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула имеет валентность по отношению к TNFR2, равную по меньшей мере четырем. В следующем особенно предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула имеет валентность по отношению к TNFR2, равную четырем. В особенно предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула имеет валентность по отношению к TNFR2, равную по меньшей мере шести. В следующем особенно предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула имеет валентность по отношению к TNFR2, равную шести.

В другом особенно предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один TNFR2-связывающий домен, который представляет собой VHH связывающий домен, специфичный к TNFR2. В другом особенно предпочтительном варианте осуществления все связывающие домены, специфичные к TNFR2, представляют собой VHH связывающие домены, специфичные к TNFR2. В следующем особенно предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула представляет собой шестивалентное антитело, содержащее шесть VHH связывающих доменов, специфичных к TNFR2.

Настоящее изобретение также относится к:

- Связывающей молекуле по изобретению для применения в качестве лекарственного средства.
- Связывающей молекуле по изобретению для применения в способе лечения или профилактики аутоиммунного расстройства или воспалительного расстройства.
- Способу лечения или профилактики аутоиммунного расстройства или воспалительного расстройства, включающему введение связывающей молекулы по настоящему изобретению субъекту, страдающему этим расстройством или имеющему риск его развития.
- Применению связывающей молекулы по изобретению для производства лекарственного средства для применения в способе лечения или профилактики аутоиммунного расстройства или воспалительного расстройства.

- Способу стимуляции клеточной пролиферации, включающему приведение в контакт клетки-мишени, экспрессирующей TNFR2, со связывающей молекулой по изобретению.
- Фармацевтической композиции, содержащей связывающую молекулу по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.
- Способу детектирования TNFR2, включающему приведение в контакт тестируемого образца со связывающей молекулой по изобретению и детектирование связывания связывающей молекулы с TNFR2, если таковой присутствует.
- Диагностическому способу, включающему введение субъекту связывающей молекулы по изобретению и детектирование связывания связывающей молекулы с TNFR2, если таковой присутствует.
- Связывающей молекуле по изобретению для применения в способе диагностики, где способ включает введение субъекту связывающей молекулы по изобретению и детектирование связывания связывающей молекулы с TNFR2.

Список последовательностей

Настоящая заявка включает список последовательностей, представленный в электронном виде, который является частью поданной заявки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

Фиг. 1. Номенклатура и схемы доменной архитектуры типичных вариантов анти-TNFR2 антител с N-концевыми организованными TNFR2-связывающими сайтами (домены Fab или scFv). CI=идентификатор клона родительского анти-TNFR2 антитела, например, мышинных антител C4, C19, C9, C40 и т.д. к человеческому TNFR2; N297A относится к соответствующей мутации в тяжелой цепи человеческого IgG1, которая снижает взаимодействие с FcγR; N-RGY относится к мутации N297A плюс мутациям, способствующим гексамеризации IgG1.

Фиг. 2. Вестерн-блот анализ вариантов анти-TNFR2 антитела C4 с N-концевыми однонаправленно ориентированными TNFR2-связывающими сайтами. Flag-меченные варианты указанных конструкций C4 (200 нг) анализировали с помощью вестерн-блоттинга с антителами к человеческому IgG и анти-Flag антителами.

Фиг. 3. TNFR2-опосредованное продуцирование IL8 в клетках HT1080-Bcl2-TNFR2 после обработки вариантами C4 с однонаправленно организованными N-концевыми TNFR2-связывающими сайтами. Клетки HT1080-Bcl2-TNFR2, стабильно экспрессирующие человеческий TNFR2, стимулировали супернатантами, содержащими указанные концентрации различных конструкций C4. На следующий день супернатанты собирали и анализировали с помощью ELISA на содержание IL8. Показанные данные получены в параллельных обработанных экспериментах, которые для лучшего разрешения представлены на трех диаграммах. Максимальный ответ, индуцированный высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF(143N/145R), в качестве положительного контроля, обозначен пунктирной линией.

Фиг. 4. TNFR2-опосредованная гибель Kym-1 клеток после обработки вариантами

C4 с однонаправленно ориентированными N-концевыми TNFR2-связывающими сайтами. Клетки Кум-1 стимулировали супернатантами, содержащими указанные концентрации различных конструкций C4. На следующий день жизнеспособность клеток определяли путем окрашивания кристаллическим фиолетовым. Высокоактивная олигомерная форма TNFR2-специфического мутанта TNF(143N/145R) (олиго TNF80) служила положительным контролем взаимодействия с TNFR2.

Фиг. 5. TNFR2-опосредованный процессинг p100 в клетках Кум-1 после обработки вариантами C4 с N-концевыми однонаправленно ориентированными TNFR2-связывающими сайтами. Клетки Кум-1 стимулировали в течение ночи супернатантами, содержащими указанные концентрации различных вариантов C4. Обработку проводили в присутствии 20 мкМ ZVAD для предотвращения TNFR2-индуцированной гибели клеток. В качестве положительного контроля использовали неамерный TNFR2-специфический мутант мышиного TNF (олиго TNF80), который эффективно активирует человеческий и мышиный TNFR2.

Фиг. 6. TNFR2-опосредованное продуцирование IL8 в клетках HT1080-Bcl2-TNFR2 после обработки вариантами C19, C27 и C40 с N-концевыми однонаправленно ориентированными TNFR2-связывающими сайтами. Клетки HT1080-Bcl2-TNFR2 стимулировали супернатантами, содержащими указанные концентрации различных конструкций. На следующий день супернатанты собирали и анализировали с помощью ELISA на содержание IL8. Максимальный ответ, индуцированный высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF(143N/145R), в качестве положительного контроля, обозначен пунктирной линией. Примечание: даже конструкции, полученные из антитела C27 с более низким сродством, показали значительную агонистическую активность (нижняя панель).

Фиг. 7. Номенклатура и схемы доменной архитектуры вариантов анти-TNFR2 антител с N-концевыми и C-концевыми организованными TNFR2-связывающими сайтами (домены Fab или scFv). CI=идентификатор клона, например, C4, C19 и т.д.; N297A относится к соответствующей мутации в тяжелой цепи человеческого IgG1, снижающей связывание FcγR.

Фиг. 8. Вестерн-блот анализ вариантов C4 со слитыми на N-конце и C-конце TNFR2-связывающими сайтами. Flag-меченные варианты указанных конструкций C4 (200 нг) анализировали с помощью вестерн-блоттинга с антителами к человеческому IgG и анти-Flag антителами. Примечание: тяжелая цепь C4-IgG1(N297A)-HC:scFvC4 не содержит метку Flag.

Фиг. 9. TNFR2-опосредованное продуцирование IL8 в клетках HT1080-Bcl2-TNFR2 после обработки конструкциями C4 с N-концевыми и C-концевыми TNFR2-связывающими сайтами. Клетки HT1080-Bcl2-TNFR2 стимулировали супернатантами, содержащими указанные концентрации различных конструкций C4. На следующий день супернатанты собирали и анализировали с помощью ELISA на содержание IL8. Представленные данные получены в параллельных обработанных экспериментах, которые

для лучшего разрешения показаны на трех диаграммах. Максимальный ответ, индуцированный положительным контролем (олиго TNF80; высокоактивная олигомерная форма TNFR2-специфического мутанта TNF (143N/145R)), обозначен пунктирной линией. Соответствующие конструкции только с N-концевыми связывающими сайтами анализировали параллельно для сравнения.

Фиг. 10. TNFR2-опосредованная гибель клеток в клетках Кум-1 после обработки конструкциями С4 с N-концевыми и C-концевыми организованными TNFR2-связывающими сайтами. Клетки Кум-1 стимулировали супернатантами, полученными из трансфицированных HEK293 клеток, содержащих указанные приблизительные концентрации различных конструкций С4. На следующий день определяли жизнеспособность клеток с помощью МТТ-анализа. В качестве положительного контроля использовали высокоактивную олигомерную форму TNFR2-специфического мутанта TNF (143N/145R).

Фиг. 11. Связывающие свойства TNFR2-специфических антител. (А) Равновесное связывание указанных GpL-слитых белков анти-TNFR2 антитела с клеткой, экспрессирующей человеческий TNFR2, при 37°C. (В) Клетки HeLa-TNFR2 предварительно обрабатывали указанными количествами анти-TNFR2 антител или оставляли необработанными. Добавляли 5 нг/мл GpL-TNF и через 1 час инкубации при 37°C измеряли связывание. Для получения значений неспецифического связывания анализировали связывание различных конструкций с нетрансфицированными клетками HeLa.

Фиг. 12. Конкуренция анти- α TNFR2 антител. Клетки HeLa-TNFR2 предварительно обрабатывали 3-10 мкг/мл указанных анти-TNFR2 антител или оставляли необработанными. Добавляли 50 нг/мл различных вариантов α TNFR2-IgG1(N297A)-LC:GpL, и через 1 час измеряли связывание.

Фиг. 13. Четырехвалентные TNFR2-связывающие молекулы mAb вызывают гораздо более сильную индукцию IL8, чем молекулы TNFR2, связанные обычным вариантом двухвалентного mAb. (А, В) TNFR2-негативные клетки HeLa и клетки HeLa-TNFR2 попарно стимулировали в течение 8 часов указанными концентрациями GpL-слитых белков би- и четырехвалентной версий TNFR2-специфического mAb С4 (см. схему на вставке). Затем супернатанты клеток HeLa-TNFR2 анализировали на TNFR2-индуцированное продуцирование IL8 (В), и повторно промытые клетки (HeLa и HeLa-TNFR2) анализировали на клеточно-ассоциированную активность GpL. Специфическое связывание с TNFR2, показанное на (А), вычисляли путем вычитания значений неспецифического связывания, полученных из клеток HeLa, из значений общего связывания, полученных из клеток HeLa-TNFR2. Следует обратить внимание на тот факт, что активность люциферазы нормализовали по соотношению количества репортерных доменов GpL к количеству TNFR2-связывающих доменов в двух вариантах моноклональных антител (1 против 0,5). (С) Продуцирование IL8, стимулированное вариантами mAb, непосредственно отражали на графике в виде функции их

специфического связывания. Последнее преобразовывали в «занятые рецепторы на клетку», исходя из количества клеток в анализе и измеренной удельной активности (RLU/молекула) конструкций GrL. Максимальное связывание двух конструкций, полученных из А, обозначено вертикальными пунктирными линиями. Пунктирные линии указывают на линейную регрессию продуцирования IL8 в зависимости от занятости рецепторов.

Фиг. 14. Связывание TNFR2-специфических антител с TNFR2 человека, мыши и яванского макака. Клетки HEK293 временно трансфицировали TNFR2 человека, мыши и яванского макака или пустым вектором. Затем при 37°C определяли равновесное связывание указанных GrL-слитых белков анти-TNFR2 антитела. Связывание с клетками, трансфицированными пустым вектором, определяли для получения значений неспецифического связывания.

Фиг. 15. Схема доменной архитектуры TNFR2 и указание внеклеточных доменов TNFR2, распознаваемых анти-TNFR2 антителами C4, C19, C27 и C40 и полученными из них четырехвалентными вариантами CI-IgG1(N297A)-HC:scFvCI. CI - идентификатор анти-TNFR2 клона; CRD, богатый цистеином домен.

Фиг. 16. Вестерн-блот анализ моно- и биспецифических TNFR2-специфических вариантов CI-IgG-HC:scFvCI. Flag-меченные варианты указанных конструкций антител (200 нг) анализировали с помощью вестерн-блоттинга с антителами к человеческому IgG (нижняя панель) и анти-Flag антителами (верхняя панель). Для сравнения включали обычные варианты IgG. Примечание: i) тяжелые цепи C4-IgG1(N297A), C4-IgG1(N297A)-HC:scFvC4 и C4-IgG1(N297A)-HC:scFvC19 не содержат Flag-метку, ii) обычный вариант C19 использовали в виде изоформы мышинового IgG1(D265A).

Фиг. 17. TNFR2-опосредованное продуцирование IL8 в клетках HT1080-Vcl2-TNFR2 после обработки моно- (верхний уровень) и бипаратопными (нижняя панель) TNFR2-специфическими вариантами CI-IgG-HC:scFvCI. Показан ответ, индуцированный 200 нг/мл олигомеризованного TNFR2-специфического варианта TNF с сильной агонистической активностью (пунктирная линия). Примечание: на верхней панели антитело C27, имеющее более низкое сродство, все еще проявляет некоторую агонистическую активность в четырехвалентной форме.

Фиг. 18. TNFR2-опосредованная гибель клеток в клетках Kym-1 после обработки моно- (верхний уровень) и биспецифическими (нижняя панель) TNFR2-специфическими вариантами CI-IgG-HC:scFvCI. Клетки Kym-1 стимулировали супернатантами, содержащими указанные приблизительные концентрации различных конструкций. На следующий день жизнеспособность клеток определяли путем окрашивания кристаллическим фиолетовым. Для сравнения параллельно анализировали обычные антитела (верхняя панель).

Фиг. 19. TNFR2-опосредованный процессинг p100 в клетках Kym-1 после обработки моно- (А) и биспецифическими (В) TNFR2-специфическими вариантами CI-IgG-HC:scFvCI. Клетки стимулировали в течение ночи супернатантами, содержащими

указанные приблизительные концентрации различных конструкций. Обработку проводили в присутствии 20 мкМ ZVAD для предотвращения TNFR2-индуцированной гибели клеток.

Фиг. 20. Очистка и функциональный анализ C4-IgG1(N297A)-HC:scFvC4, C4-IgG1(N297A)-LC:scFvC4 и C4-IgG1(N297A)-LC:scFvC4-HC:scFvC4. (A) Окрашенный серебром гель SDS-PAGE. (B) Гельфильтрационный анализ. (C) Индукция IL8 в клетках HT1080-Bcl2-TNFR2. (D) Индукция клеточной гибели в клетках Кум-1. (E) Индукция процессинга p100 в клетках Кум-1. Для предотвращения гибели клеток добавляли ZVAD.

Фиг. 21. Оценка *ex vivo* клеток Treg и Tcon после обработки четырехвалентными агонистами TNFR2. У доноров брали PBMC, культивировали, собирали, затем обрабатывали четырехвалентными антителами (моно- или биспецифическими; формат Fab-HC-scFv). Также оценивали необработанные клетки отрицательного контроля, а также положительного контроля, с агонистом TNFR2 Star2 (также называемым агонистом TNFR2 TNC-sc(mu)TNF(143N/145R) (олиго TNF80)), олигомеризованным высокоэффективным TNFR2-селективным вариантом TNF (Chopra et al., 2016). На верхней панели показан процент изменения в Treg, на нижней панели - в клетках Tcon.

Фиг. 22. Дозозависимое увеличение Treg у сингенных трансгенных мышей с FoxP3-люциферазой под действием человек-мышь перекрестно реактивного четырехвалентного агониста TNFR2 C19-IgG1(N297A)-HC:scFvC19. Трансгенным мышам FoxP3-Luc1 вводили 8 доз агониста TNFR2 (N=1), а затем ежедневно оценивали с помощью биолюминесцентной визуализации. Через четыре дня мышей умерщвляли, и анализировали клетки селезенки. На панели (A) показана временная шкала эксперимента. На панели (B) показаны результаты FACS-анализа спленоцитов.

Фиг. 23. Дозозависимое увеличение Treg у сингенных трансгенных мышей с FoxP3-люциферазой под действием человек-мышь перекрестно реактивного четырехвалентного агониста TNFR2 C19-IgG1(N297A)-HC:scFvC19. Трансгенным мышам с FoxP3-люциферазой вводили различные дозы C19-IgG1(N297A)-HC:scFvC19, а затем ежедневно оценивали с помощью биолюминесцентной визуализации. Через четыре дня мышей подвергали эвтаназии, и клетки селезенки анализировали с помощью проточной цитометрии.

Фиг. 24. Получение и анализ TNFR2-специфических конструкций TNF. Панель (A): Доменная архитектура молекул на основе TNF. TNF80 относится к TNFR2-специфическому мутанту растворимого TNF. Панель (B): мышинные растворимые конструкции на основе TNF80 очищали путем аффинной очистки анти-Flag антителами с помощью Flag-метки, содержащейся во всех конструкциях, и анализировали с помощью SDS-PAGE и окрашивания серебром. Панель (C): Гель-фильтрационный анализ очищенного белка, показанный на «B».

Фиг. 25. Агонистическая активность различных форматов растворимого мышинового TNF80. Панель (A): Клетки Кум-1 стимулировали указанными концентрациями различных вариантов muTNF80. На следующий день жизнеспособность клеток

определяли путем окрашивания кристаллическим фиолетовым. Панель (B): Клетки HT1080-Vcl2-TNFR2 стимулировали указанными концентрациями различных вариантов TNF80, показанных на фиг. 24. На следующий день супернатанты собирали и анализировали с помощью ELISA на содержание IL8. Представленные данные получены из четырех независимых экспериментов.

Фиг. 26. Размножение Treg *in vivo* с помощью Fc(DANA)-TNC-muTNF80. Мышам с люциферазой под контролем промотора Foxp3 вводили внутривенно однократную инъекцию указанного количества Fc(DANA)-TNC-muTNF80 и ежедневно анализировали с помощью биолюминесцентной визуализации (BLI) (верхняя панель). Изображения BLI в день 0 и день 4 представлены на средней панели. На нижней панели показан анализ проточной цитометрии на основе количественного определения частоты Treg в день 4.

Фиг. 27. Демонстрация селективного связывания связывающих молекул по изобретению с TNFR2, но не с TNFR1. Клетки HEK293 временно трансфицировали: (i) плазмидой, экспрессирующей TNFR2; (ii) экспрессионной плазмидой, кодирующей внеклеточный домен TNFR1 с якорным доменом GPI; или (iii) пустым вектором (ev). На следующий день к клеткам добавляли указанные связывающие молекулы, меченные GpL, в указанной концентрации. После инкубации в течение 1 часа при 37°C с последующими двумя промывками PBS определяли оставшуюся активность GpL, связанного с клетками. GpL-TNF служил положительным контролем связывания с обоими типами рецепторов TN.

Фиг. 28. Варианты IgG1(N297A)-HC:scFv, IgG1(N297A)-HC:TNC и IgG1(N-RGY) 005-B08 из WO 2020/089474 являются сильными агонистами TNFR2, согласно измеренному высвобождению IL-8. Максимальный ответ, индуцированный C4-IgG1(N297A)-HC:C4, в качестве положительного контроля, обозначен пунктирной линией.

Фиг. 29. Вариация длины линкера между тяжелой и легкой цепями в scFv и scFv, слитых с тяжелыми или легкими цепями вариантов C4-IgG1(Durv)-scFv:C4, не влияют на агонистическую активность TNFR2. (A) Доменная архитектура конструкций. «G4S» относится к линкерной последовательности GGGGS, и «Durv» обозначает последовательность константной области антитела дурвалумаб. (B) Гель-фильтрация очищенных C4-IgG1(Durv)-HC:scFvC4(G4S)4 и C4-IgG1(Durv)-LC:scFvC4(G4S)4. (C) Анализ высвобождения IL-8. Максимальный ответ, индуцированный высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF(143N/145R), в качестве положительного контроля, показан пунктирной линией.

Фиг. 30. Оптимизация последовательности не влияет на активность вариантов C4-IgG1(Durv)-HC/LC:scFvC4. (A) Гель-фильтрационный анализ очищенных вариантов C4-IgG1(Durv)-HC/LC:scFvC4. (B) Анализ высвобождения IL8 как меры активации TNFR2. Максимальный ответ, индуцированный высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF(143N/145R), в качестве положительного контроля, обозначен пунктирной линией.

Фиг. 31. Связывание TNFR2 с TNFR2-специфическими sdAb. Равновесное связывание указанных TNFR2-специфических конструкций VHH-Fc-GpL VHH с клетками, экспрессирующими человеческий TNFR2, при 37°C. Специфическое связывание получали путем вычитания значений неспецифического связывания (клетки HEk293) из трансфектантов, экспрессирующих человеческий TNFR2 (общее связывание).

Фиг. 32. Связывание TNFR2-специфических шестивалентных конструкций 3xVHH-Fc-GpL с человеческим и мышинным TNFR2. Равновесное связывание указанных TNFR2-специфических конструкций VHH 3xVHH-Fc-GpL с клетками, экспрессирующими человеческий TNFR2, при 37°C. Репортерный домен GpL клонировали на C-конце домена Fc. Светлые кружки=неспецифическое связывание; Светлые квадраты=общее связывание; Закрашенные кружки=специфическое связывание.

Фиг. 33. 3xVHH-Fc(DANA) варианты VHH:C18, VHH:C74, VHH:C188 и VHH:C238 блокируют связывание TNF α с TNFR2. Клетки HT1080-Bcl2-TNFR2 предварительно обрабатывали указанными количествами TNFR2-специфических конструкций VHH или CD40-специфической конструкции 3xVHH:CD40(V12t)-Fc(DANA), в качестве отрицательного контроля, или оставляли необработанными. Добавляли 5 нг/мл GpL-TNF, и через 1 час инкубации при 37°C измеряли связывание.

Фиг. 34. TNFR2-специфические VHH не связываются с TNFR1. Клетки HEk293 временно трансфицировали векторами экспрессии, кодирующими TNFR1 и TNFR2, а затем анализировали на связывание указанных белков. Связывание с клетками, трансфицированными пустым вектором, служило отрицательным контролем неспецифического связывания. TNF-GpL служил положительным контролем для успешного связывания TNFR1. Закрашенные кружки=общее связывание; x=неспецифическое связывание; светлые кружки=специфическое связывание.

Фиг. 35. VHH:C18, VHH:C188 и VHH:C238 связывают CRD4 TNFR2, а VHH:C74 связывает CRD3. (А) Черные 96-луночные планшеты покрывали белком G, а затем заполняли 3xVHH-Fc (DANA) версиями указанных TNFR2-специфических нанотел. После удаления несвязавшихся белков иммобилизованные конструкции антител анализировали на связывание с GpL-мечеными мутантами TNFR2(ed) с делециями, показанными в вестерн-блоттинге на правой панели. Наконец, количественно оценивали связывание этих слитых с GpL белков. (В) Клоны C188 и C4 конкурируют с TNF за связывание с человеческим TNFR2. Клетки HT1080-Bcl2-TNFR2 предварительно обрабатывали указанными количествами TNFR2-специфических конструкций VHH или CD20-специфическим mAb ритуксимабом, в качестве отрицательного контроля, или оставляли необработанными. Добавляли 5 нг/мл GpL-TNF, и через 1 час инкубации при 37°C измеряли связывание.

Фиг. 36. TNFR2-опосредованное высвобождение IL8 после обработки конструкциями на основе VHH с четырьмя только N-концевыми TNFR2-связывающими сайтами. Клетки HT1080-Bcl2-TNFR2 стимулировали супернатантами, содержащими указанные конструкции, и полученный супернатант анализировали на следующий день на

высвобождение IL-8. Максимальный ответ, индуцированный высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF TNF(143N/145R) (верхняя панель) или C4-IgG1(N297A)-HC:C4 (средняя и нижняя панели), служивших положительным контролем, обозначен пунктирной линией.

Фиг. 37. TNFR2-опосредованное высвобождение IL8 и гибель клеток Кум-1 после обработки конструкциями на основе VHH с шестью только N-концевыми TNFR2-связывающими сайтами. (A) Клетки HT1080-Bcl2-TNFR2 стимулировали указанными конструкциями и измеряли высвобождение IL-8 в кондиционированной среде. Максимальный ответ, индуцированный высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF(143N/145R), в качестве положительного контроля, обозначен пунктирной линией. (B) Клетки Кум-1 стимулировали различными шестивалентными вариантами, и на следующий день определяли жизнеспособность клеток с помощью МТТ-анализа. Максимальная гибель, индуцированная 200 нг/мл высокоактивной олигомерной формы TNFR2-специфического мутанта TNF (143N/145R), снова показана пунктирной линией.

Фиг. 38. Параллельное сравнение агонистической активности VHH:C188-Fc, 2xVHH:C188-Fc-GpL и 3xVHH:C188-Fc. (A, B) Очищенные белки анализировали с помощью SDS-PAGE (A) и гель-фильтрации (B). (C) Измерение высвобождения IL-8 как индикатора активации TNFR2. Максимальный ответ, индуцированный высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF(143N/145R), в качестве положительного контроля, обозначен пунктирной линией. (D) Анализ жизнеспособности клеток после стимуляции клеток Кум-1 различными вариантами VHH:C188. Максимальная гибель, индуцированная C4-IgG1(N297A)-HC:scFvC4, показана пунктирной линией.

Фиг. 39. Параллельное сравнение высвобождения IL8 и индуцирующей гибель клеток Кум-1 активности вариантов VHH-Fc-GpL, 2xVHH-Fc-GpL и 3xVHH-Fc-GpL C18 и C74. (A) Анализ высвобождения IL-8. Указаны максимальные ответы, индуцированные высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF(143N/145R).

Фиг. 40. Длина линкера между доменами VHH вариантов 3xVHH:C188-IgG1(Durv) не влияет на агонизм TNFR2. Длина линкера между доменами VHH вариантов 3xVHH:C188-IgG1(Durv) не влияет на агонизм TNFR2. (A) Доменная архитектура конструкций. (B) SDS-PAGE-анализ очищенных конструкций. (C) Гель-фильтрационный анализ. (D) Клетки HT1080-Bcl2-TNFR2 стимулировали супернатантами, содержащими указанные конструкции. На следующий день супернатанты анализировали с помощью ELISA на содержание IL8. Максимальный ответ, индуцированный высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF (143N/145R), обозначен пунктирной линией. Для сравнения включали исходную молекулу 3xVHH:C188-Fc(DANA).

Фиг. 41. Конструкции с различной доменной архитектурой с 4, 6 или 9 доменами VHH:C188 вызывают сильный агонизм TNFR2. (A) Доменная архитектура конструкций.

TNC относится к домену тримеризации тенасцина-С. (B) Анализ высвобождения IL-8. Максимальный ответ, индуцированный высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF (143N/145R), обозначен пунктирной линией.

Фиг. 42. Белок G усиливает агонистическую активность вариантов моноклонального анти-TNFR2 антитела С4 с оптимизированной последовательностью. (A) Вестерн-блот анализ с антителом к человеческому IgG1 супернатантов клеточной культуры клеток HEK293, временно трансфицированных экспрессионными плазмидами, кодирующими легкую и тяжелую цепи указанных вариантов антитела. (B) Клетки HT1080-TNFR2 подвергали заражению указанными концентрациями вариантов С4 в присутствии и в отсутствие 500 нг/мл белка G (PG). На следующий день клеточные супернатанты анализировали на продуцирование IL8 с помощью ELISA. Максимальный ответ, индуцированный высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF (143N/145R), обозначен пунктирной линией. Повышенная активность в присутствии белка G указывает на наличие латентного агонизма, который можно реализовать путем создания конструкций с соответствующей архитектурой домена.

Фиг. 43. Агонизм TNFR2 вариантов 3xVHH:C188-Fc(Durv) с оптимизированной последовательностью. (A) Вестерн-блот анализ с антителом к человеческому IgG1 супернатантов клеточных культур клеток HEK293, временно трансфицированных экспрессионными плазмидами, кодирующими указанные варианты 3xVHH:C188-Fc(Durv). (B) Клетки HT1080-TNFR2 подвергали заражению указанными концентрациями вариантов 3xVHH:C188-Fc(Durv) и родительской молекулы 3xVHH:C188-Fc(DANA). На следующий день клеточные супернатанты анализировали на продуцирование IL8 с помощью ELISA. Максимальный ответ, индуцированный высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF (143N/145R), обозначен пунктирной линией.

Фиг. 44. Агонисты TNFR2 способствуют увеличению количества FoxP3⁺ регуляторных Т-клеток (Treg) в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC). Кратность изменения частоты Treg в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) человека через 4 дня стимуляции указанным агонистом TNFR2 по сравнению с необработанным контролем того же донора. Образцы измеряли с помощью проточной цитометрии, и Treg определяли как CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺ Т-клетки. Количество индивидуальных доноров обозначено буквой n. Значимость проверяли с помощью одновыборочного t-критерия с гипотетическим значением 1, где *P=0,05, **P=0,01, ***P=0,001, ****P <0,0001.

Фиг. 45. Активация Treg антителом С4-IgG1(N297A)Hc-scFvC4. PBMC человека стимулировали в течение 4 дней 100 нг/мл С4-IgG1(N297A)Hc-scFvC4, и экспрессию маркеров, связанных с активностью Treg, измеряли с помощью проточной цитометрии. Показана кратность изменения экспрессии относительно необработанного контроля того же донора. Treg определяли как CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺ Т-клетки. Среднее значение ± стандартное отклонение, каждая точка представляет отдельного донора.

Фиг. 46. Активация Treg антителами 3xVННC188(G4S)1-Fc(Durv). PBMC человека стимулировали в течение 4 дней указанной концентрацией 3xVННC188(G4S)1-Fc(Durv), и экспрессию маркеров, связанных с активностью Treg, измеряли с помощью проточной цитометрии. Показана кратность изменения экспрессии относительно необработанного контроля того же донора. Treg определяли как $CD3^+CD4^+FoxP3^+$ Т-клетки. Среднее значение \pm стандартное отклонение, каждая точка представляет отдельного донора.

Фиг. 47. Агонисты TNFR2 увеличивают количество $CD4$ Т-клеток, экспрессирующих человеческий TNFR2 *in vitro*. Обогащенные $CD4$ Т-клетки, полученные от мышей с нокином человеческого TNFR2, стимулировали различными концентрациями (А) C4-C4 (C4-IgG1(N297A)-HC:scFvC4) или (В) 3xVНН:C188-Fc(DANA) с увеличением частоты Treg через 4 дня культивирования с соответствующими агонистами. Данные представлены в виде кратного увеличения $CD25^{\text{высокий}}FoxP3^{\text{высокий}} CD4$ Т-клеток по сравнению с необработанными (изотипический контроль) образцами. Данные проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

Фиг. 48. Удерживание Fc(DANA)-TNC-muTNF80 в сыворотке. Концентрации IL-8, измеренные с помощью ELISA в супернатантах клеточных культур HT1080-Bcl2-TNFR2, стимулированных различными разведениями сыворотки (выделенной из периферической крови в заданные моменты времени) мышей дикого типа, которым в 0 часов инъецировали 75 мкг Fc (DANA)-TNC-muTNF80 или изотипическое контрольное антитело. Временные точки на диаграмме относятся к дельта t от момента инъекции до момента сбора образцов крови. На оси абсцисс показано разведение этих образцов в анализе *in vitro* для определения агонистической активности TNFR2.

Фиг. 49. Агонист TNFR2 увеличивает количество Treg *in vivo* и активирует маркеры активации. (А) Частота Treg жизнеспособных клеток в селезенке мышей дикого типа, выделенных через четыре дня после стимуляции 75 мкг Fc(DANA)-TNC-muTNF80. (В) Кратность изменения указанных внеклеточных маркеров, определяемая в виде средней интенсивности флуоресценции Treg, нормализованной по образцам изотипических контрольных антител.

Фиг. 50. Агонист TNFR2 увеличивает Treg в селезенке *in vivo*. (А) Кратность изменения частоты Treg в жизнеспособных клетках в селезенке мышей, экспрессирующих huTNFR2, выделенных через четыре дня после стимуляции 300, 1000 мкг 3xVНН:C188-Fc(DANA) или 1000 мкг изотипического контрольного антитела. Кратность изменения вычисляли относительно изотипического контроля. Сравнение средних значений между группами обработки и изотипическим контролем выполняли с помощью непарного t-теста. * $p \leq 0,05$, ns=незначительно. (В) Кратность изменения частоты Treg ($Foxp3^+$) $CD4^+CD3^+$ Т-клеток в селезенке мышей, экспрессирующих huTNFR2, выделенных через четыре дня после стимуляции 40 мкг, 100 мкг или 250 мкг C4-IgG1(N297A)-HC:scFv:C4. Кратность изменения вычисляли относительно необработанного контроля. Сравнение средних значений между группами лечения и изотипическим контролем выполняли с

помощью непарного t-теста. * $p \leq 0,05$, ns=незначительно.

Фиг. 51. Агонисты TNFR2 повышают выживаемость после острой болезни «трансплантат против хозяина» (GvHD), индуцированной аллогенной трансплантацией гемопоэтических клеток (алло-НСТ). (А) Частота выживаемости после экспериментальной острой GvHD, вызванной алло-НСТ у мышей (FVB/N H-2q → C57BL/6 H-2b, модель большого несоответствия МНС). Статистическую значимость оценивали с помощью теста Log-Rank между C19-IgG1(N297A)-НС; scFvC19 и изотипическим контрольным антителом. * $p \leq 0,05$. (В) Оценка патологии образцов кишечника, выделенных на 6-й день после алло-НСТ, на основе инфильтратов иммунных клеток и повреждения крипт кишечника. (С) Выполненный на 6-й день анализ *ex vivo* относительного биолюминесцентного сигнала от аллогенных донорных Т-клеток в указанных органах, нормализованного по сигналу от мышей, обработанных изотипическим контрольным антителом.

Фиг. 52. C4-IgG1(N297A)-НС:scFvC4 увеличивает Treg из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) африканской зеленой мартышки (верветки) - кратность изменения и общее изменение частоты Treg в PBMC верветок через 5 дней стимуляции указанным C4-IgG1(N297A)-НС:scFvC4 по сравнению с необработанным контролем того же донора. Образцы измеряли с помощью проточной цитометрии, и Treg определяли как CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺ Т-клетки. Размножение тестировали на образце верветки, n=1.

Фиг. 53: Аминокислотная последовательность формата 3xVHH-Fc(durv) (шестивалентный) на основе исходного варианта 14 C188 и оптимизированной последовательности. Таким образом, на фигуре показаны полипептиды для предпочтительных шестивалентных связывающих молекул. Представленные CDR, общие наборы из трех CDR, вариабельные области и общие полипептиды представляют собой предпочтительные варианты осуществления, как и любые из них, как обсуждается далее в настоящем описании.

Фиг. 54: Аминокислотная последовательность формата C4-IgG1(Durv)-НС:scFvC4(G4S)4 (четыревалентный), основанного на родительском C4. Следовательно, на фигуре показаны полипептиды для предпочтительных четырехвалентных связывающих молекул. Показанные CDR, наборы из трех CDR легкой цепи, наборы из трех CDR тяжелой цепи, общие наборы из шести CDR, вариабельные области, пары вариабельных областей и полные полипептиды представляют собой предпочтительные варианты осуществления, как и любые из них, как обсуждается далее в настоящем описании.

Фиг. 55: Аминокислотная последовательность четырехвалентных C4var7-IgG1(Durv)-НС:scFvC4var7(G4S)4 и C4var16-IgG1(Durv)-LC:scFvC4var16(G4S)4 на основе оптимизированной последовательности варианта 7 и варианта 16, соответственно. Следовательно, на фигуре показаны полипептиды для предпочтительных четырехвалентных связывающих молекул. Показанные CDR, наборы из трех CDR легкой цепи, наборы из трех CDR тяжелой цепи, общие наборы из шести CDR, вариабельные области, пары вариабельных областей и полные полипептиды представляют собой

предпочтительные варианты осуществления, как и любые из них, как обсуждается далее в настоящем описании.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

TNFR2 и клетки-мишени TNFR2

Настоящее изобретение относится к связывающим молекулам, которые связывают TNFR2 и, в частности, которые связывают внеклеточный домен TNFR2. TNFR2 содержит характерный внеклеточный домен, трансмембранный сегмент и внутриклеточный домен. Внеклеточная область содержит четыре повторяющихся богатых цистеином домена (CRD). TNFR2, связанный связывающей молекулой по настоящему изобретению, обычно представляет собой TNFR2 млекопитающих. В особенно предпочтительном варианте осуществления TNFR2, связанный связывающей молекулой по настоящему изобретению, представляет собой человеческий TNFR2. Аминокислотная последовательность человеческого TNFR2 представлена как SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность человеческого TNFR2, представленная в SEQ ID NO: 1, подразделена на сигнальный пептид, содержащий аминокислоты с 1 по 22; внеклеточный домен с аминокислотами с 23 по 257 и трансмембранный участок с аминокислотами с 258 по 287. Связывающая молекула по настоящему изобретению обычно связывает внеклеточный домен TNFR2.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может связывать человеческий TNFR2, а также TNFR2 других видов, таких как TNFR2 мыши и/или TNFR2 обезьяны. В одном из вариантов осуществления она связывает TNFR2 человека, мыши и обезьяны. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула может связывать TNFR2 человека и яванского макака. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула может связывать TNFR2 человека и африканской зеленой мартышки. В другом варианте осуществления связывающая молекула может связывать TNFR2 человека, яванского макака и африканской зеленой мартышки. В другом варианте осуществления связывающая молекула может связывать TNFR2 человека и мыши. В другом варианте осуществления связывающая молекула может связывать TNFR2 человека, мыши и африканской зеленой мартышки. В другом варианте осуществления связывающая молекула может связывать TNFR2 человека, мыши и яванского макака. В другом варианте осуществления связывающая молекула может связывать TNFR2 человека, мыши, яванского макака и африканской зеленой мартышки. В другом варианте осуществления связывающая молекула будет связывать по меньшей мере эти виды TNFR2.

Связывающую молекулу по настоящему изобретению обычно используют для связывания с клеткой-мишенью, в частности клеткой-мишенью, экспрессирующей TNFR2. Клетка-мишень может представлять собой клетку любого типа, экспрессирующую TNFR2. В одном из вариантов осуществления клетка-мишень представляет собой иммунную клетку, эндотелиальную клетку, мезенхимальную стволовую клетку или нейрон. В особенно предпочтительном варианте осуществления

клетка-мишень представляет собой иммунную клетку. В особенно предпочтительном варианте осуществления клетка-мишень представляет собой Treg клетку. В одном из вариантов осуществления иммунные клетки, экспрессирующие TNFR2, выбирают из регуляторных Т-клеток (Treg), регуляторных В-клеток (Breg) и MDSC (клеток-супрессоров миелоидного происхождения). В одном из вариантов осуществления клетка-мишень может представлять собой Treg клетку, которая представляет собой регуляторную Foxp3⁺CD25⁺ Т-клетку.

Связывающие молекулы

Настоящее изобретение относится к связывающим молекулам, которые связывают TNFR2. В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет связываться с TNFR2 и стимулировать передачу сигнала через TNFR2. В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающие молекулы представляют собой агонистические антитела или слитые белки антител, или фрагменты антител, или слитые белки фрагментов антител к TNFR2, и таким образом активируют рецептор. В предпочтительном варианте осуществления связывающие молекулы представляют собой антитела, которые специфически связывают TNFR2, предпочтительно, они представляют собой антитела, которые специфически связывают TNFR2 и действуют в качестве его агонистов, не связываясь при этом с FcγR. В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет связывать TNFR2 в большей степени, чем TNFR1. Например, сила связывания TNFR2 по сравнению с TNFR1 может быть выше по меньшей мере в 10, 50, 100, 500, 1000 или более раз. В одном из вариантов осуществления сила связывания TNFR2 по сравнению с TNFR1 может быть выше по меньшей мере в 10000 или по меньшей мере в 100000 раз. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула вообще не связывает TNFR1. В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула и в частности антитело или фрагмент антитела или их слитые белки по настоящему изобретению специфически связываются с TNFR2, когда значение KD связывания ниже чем 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М. В одном из вариантов осуществления значение KD измеряют с использованием клеток, экспрессирующих TNFR2, например, трансфектантов HeLa, экспрессирующих TNFR2. В одном из предпочтительных вариантов осуществления значения KD определяют с помощью подхода, изложенного в статье Kums J, Nelke J, R uth B, Sch afer V, Siegmund D, Wajant H. MAbs. 2017 Apr; 9(3):506-520. Следовательно, в одном из вариантов осуществления для измерения значения KD связывающей молекулы используют продукт слияния связывающей молекулы с люциферазой Gaussia Princeps в качестве репортерного домена, как описано Kums et al., см. выше. В одном из вариантов осуществления для такого измерения можно использовать клеточные линии, экспрессирующие TNFR2, например, клетки HeLa или HEK293, которые стабильно экспрессируют TNFR2 на своей поверхности. Обычно связывающие молекулы по изобретению связываются с TNFR2 и запускают передачу сигналов TNFR2. В одном из вариантов осуществления предлагаемые

связывающие молекулы и в частности антитела являются агонистами TNFR2, но не являются агонистами TNFR1. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению связывается с TNFR2, но не связывается с каким-либо другим членом суперсемейства TNFR.

В особенно предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой антитело. Термин «антитело», используемый в настоящем описании, обычно относится к любому функциональному антителу или слитому белку антитела или фрагменту антитела, который способен специфически связываться с представляющим интерес антигеном, как в общих чертах описано в главе 7 Paul, W.E. (Ed.): *Fundamental Immunology* 2nd Ed. Raven Press, Ltd., New York 1989, которая включена в настоящее описание посредством ссылки, или как показано в «Периодической таблице антител» (<https://absoluteantibody.com/periodic-table-of-antibodies/>). В настоящем описании ссылка на антитело включает фрагменты антитела, если не указано иное. Антитело по настоящему изобретению обычно специфически связывает TNFR2. Ссылка на антитело включает все различные форматы антител, обсуждаемые в настоящем описании, включая антитела, которые не имеют встречающейся в природе четырехцепочечной структуры антитела, наблюдаемой у людей; например, в одном из предпочтительных вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению может представлять собой или может содержать одноцепочечное антитело. Антитело по настоящему изобретению также может содержать последовательности, не являющиеся антителами, такие как молекула на основе лиганда, которая связывает TNFR2. В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению может содержать полипептид(ы), который(ые) представляет(ют) собой продукт слияния последовательностей антител с последовательностями, не являющимися антителами, например, пептидом TNC и полипептидами TNF-альфа (в частности, TNFR2-специфическими мутантами, такими как TNF80 (или TNF(143N/145R)), как обсуждается в настоящем описании. В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула представляет собой антитело, которое не содержит каких-либо TNFR2-специфических связывающих сайтов, не являющихся антителами.

Любое из антител, представленных в настоящем описании, может дополнительно содержать одну или более молекул на основе лиганда и, в частности, такую молекулу на основе TNFR2-специфического лиганда. Например, в настоящей заявке описаны различные шестивалентные антитела, валентность молекулы которых может быть увеличена, и быть более шести, путем включения одной или более TNFR2-связывающих молекул на основе лиганда, таких как любой из указанных в настоящем описании молекул. В одном из вариантов осуществления любое из антител, представленных в настоящем описании, может дополнительно содержать по меньшей мере одну TNFR2-связывающую молекулу на основе лиганда, которая является либо частью полипептида, связанной с этим полипептидом, либо конъюгированной с ним. В одном из вариантов осуществления шестивалентная связывающая молекула, содержащая домены VHH, может

быть дополнительно модифицирована путем включения по меньшей мере одной связывающей молекулы на основе лиганда либо в виде части полипептида, связанной с этим полипептидом, либо конъюгированную с ним. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула содержит два полипептида, где каждый полипептид содержит три последовательно расположенных домена VHH, константную область тяжелой цепи, лишенную области CH1, с TNFR2-связывающей молекулой на основе лиганда, либо в виде части полипептида, связанной с этим полипептидом, либо конъюгированную с ним. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению модифицирована таким образом, что каждая тяжелая цепь содержит TNFR2-связывающую молекулу на основе лиганда либо в виде части полипептида, связанной с этим полипептидом, либо конъюгированную с ним. В одном из вариантов осуществления таким образом могут быть модифицированы легкие цепи связывающей молекулы. В предпочтительном варианте осуществления связывающие молекулы могут иметь молекулу на основе лиганда и TNFR2 в виде части полипептида, связанной с этим полипептидом, или конъюгированную с ним на С-концевой стороне полипептида. Настоящее изобретение также относится к различным четырехвалентным связывающим молекулам, и в таких связывающих молекулах вместо scFv или другого TNFR2-связывающего сайта на основе антитела в «южной» или «С-концевой» части связывающая молекула может иметь молекулы на основе лиганда. Так, например, в настоящем описании представлены различные варианты антигенсвязывающих сайтов C4 и C4, и настоящее изобретение относится к связывающим молекулам, где «северные» антигенсвязывающие сайты представляют собой антигенсвязывающие сайты C4 или вариантов C4, а «южные» антигенсвязывающие сайты представляют собой TNFR2-антигенсвязывающие молекулы на основе лиганда.

Антитело по изобретению также включает часть или фрагмент антитела. Например, антитело по настоящему изобретению может содержать только область Fc антитела, модифицированную таким образом, что она не связывается с рецепторами Fc и связывающими молекулами на основе лиганда, присоединенными к области Fc. В одном из вариантов осуществления молекулы на основе лиганда, присутствующие в антителе по настоящему изобретению, представляют собой лиганд на основе TNF для TNFR2, например, протомер TNF или его мутант. В одном из вариантов осуществления он представляет собой одноцепочечный вариант тримера TNF.

В контексте настоящего описания «валентность» связывающей молекулы означает количество связывающих сайтов, которые имеет связывающая молекула, при этом валентность для TNFR2 обозначает количество TNFR2-связывающих сайтов, которые имеет связывающая молекула. «Специфичность» связывающего сайта указывает на то, с чем этот сайт связывается, например, она может указывать, с какой молекулой-мишенью связывается связывающая молекула, но она также может указывать, в каком месте связывается связывающая молекула. Что касается антитела, специфичность антитела указывает, с какой мишенью связывается антитело. Специфичность также можно

использовать для указания, в каком месте на антигене происходит связывание, в терминах эпитопа, связанного с этой молекулой-мишенью. Связывающие молекулы могут иметь разную специфичность в том смысле, что они связываются с эпитопами на разных молекулах-мишенях (антигенах). Однако связывающие молекулы могут иметь разную специфичность в том смысле, что они связываются с разными эпитопами на одной и той же молекуле-мишени (антигене). Например, биспецифическая связывающая молекула может быть биспецифической в том смысле, что она может связываться с двумя разными молекулами-мишенями, но альтернативно она может быть биспецифической в том смысле, что может связываться с двумя разными эпитопами одной и той же молекулы-мишени и в частности TNFR2.

В одном из вариантов осуществления все связывающие сайты связывающей молекулы по настоящему изобретению будут связываться с одной и той же мишенью. В одном из вариантов осуществления, когда связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой антитело, может оказаться, что все антигенсвязывающие сайты антитела связываются с одним и тем же эпитопом TNFR2. В другом варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать по меньшей мере два разных мишень-связывающих сайта, каждый из которых связывается с отличным от другого сайтом-мишенью на TNFR2, например, каждый из них распознает свой, отличный от другого, эпитоп TNFR2. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой антитело, которое содержит по меньшей мере два антигенсвязывающих сайта, которые связываются с разными эпитопами TNFR2. В одном из вариантов осуществления по меньшей мере один из связывающих сайтов молекулы будет связываться с мишенью, отличной от TNFR2. Например, в одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может включать связывающий сайт, распознающий мишень другого типа клеток, с другой специфичностью. Например, другую специфичность можно использовать в качестве «хоминг» агента для объединения клетки-мишени, экспрессирующей TNFR2, с клеткой другого типа. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может включать по меньшей мере один связывающий сайт, который связывается с мишенью, изменяющей период полувыведения связывающей молекулы из сыворотки; например, в одном из вариантов осуществления она может связываться с сывороточным альбумином. В одном из вариантов осуществления только один из связывающих сайтов молекулы нацелен на что-то другое, отличное от TNFR2. В одном из вариантов осуществления таких сайтов может быть два.

Связывающая молекула по настоящему изобретению будет иметь валентность для TNFR2, равную по меньшей мере двум. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет иметь валентность для TNFR2, равную двум, трем, четырем, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати или двенадцати или, по меньшей мере, таким валентностям. В одном из предпочтительных

вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет иметь валентность, равную двум. В другом предпочтительном варианте осуществления она будет иметь валентность, равную трем. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению является трехспецифической. В другом предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет иметь валентность, равную по меньшей мере четырем. Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению является четырехвалентной. В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет иметь валентность, равную четырем. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет иметь валентность, равную по меньшей мере шести. В предпочтительном варианте осуществления она будет иметь валентность, равную шести. В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет иметь валентность, равную двенадцати. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению является полиспецифической, например, поскольку она имеет валентность, равную по меньшей мере двум, а предпочтительно по меньшей мере четырем. Особенно предпочтительным вариантом осуществления является четырехвалентное антитело. Еще одним особенно предпочтительным вариантом осуществления является шестивалентное антитело. Предпочтительным шестивалентным антителом является антитело, у которого TNFR2-связывающие сайты представляют собой однодоменные антитела (sdAb), специфичные к TNFR2. Особенно предпочтительным шестивалентным антителом является антитело, у которого TNFR2-связывающие сайты представляют собой связывающие домены VHH, специфичные к TNFR2. SdAb и VHH обсуждаются ниже.

Помимо «валентности», еще одним признаком связывающей молекулы по настоящему изобретению является ориентация/локализация ее связывающих сайтов. Нагляднее всего это видно на примере антител, показанных на фиг. 1 и 7. На фиг. 1 изображены антитела с (N-концевыми) однонаправленно ориентированными антигенсвязывающими сайтами, которые можно рассматривать исключительно как находящиеся в «северной» ориентации; например, в одном из вариантов осуществления можно считать, что такие связывающие молекулы имеют антигенсвязывающие сайты, которые связываются с TNFR2 в том месте, которое можно считать N-концевой частью тяжелой и легкой цепей обычного четырехцепочечного антитела, и они могут быть расположены в N-концевых частях полипептидов связывающих молекул. Ориентация связывающих сайтов также может быть определена путем упоминания связывающих сайтов в одинаковой ориентации как «параллельные» связывающие сайты, например, когда все связывающие сайты находятся на N-концевых участках цепей антитела, или все они находятся на C-концевой части цепей антитела, при этом связывающие сайты можно рассматривать как параллельные. Такие связывающие сайты также можно рассматривать как однонаправленно ориентированные. На фиг. 7 настоящей заявки изображены антитела

с двойными N- и C-концевыми антигенсвязывающими сайтами, которые можно рассматривать как находящиеся в ориентации «север» + «юг» или являющиеся «противоположно» ориентированными. В одном из вариантов осуществления такие связывающие сайты можно рассматривать как имеющие антигенсвязывающие сайты в более чем одной плоскости или более чем в одном направлении. В одном из вариантов осуществления конструкция по изобретению представляет собой конструкцию, в которой антигенсвязывающие сайты находятся исключительно в «северной» ориентации, поэтому антигенсвязывающие сайты являются N-концевыми. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой конструкцию «Север» с scFv, заменяющей переменные домены HC и LC, например (scFv-IgG(N297A) и scFv-IgG(N297A)-HC:TNC). В другом варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может иметь связывающие сайты как в «северной», так и в «южной» ориентациях, поэтому эффективно иметь антигенсвязывающие сайты как в N-концевом, так и в C-концевом положении.

В одном из вариантов осуществления обращенные на «север» или в сторону «N-конца» антигенсвязывающие сайты можно рассматривать как находящиеся в той же ориентации или плоскости, что и связывающий сайт обычной мономерной молекулы IgG, в частности, обращенные в сторону того, что обычно считается N-концевой частью переменных областей легкой и тяжелой цепей такой обычной молекулы IgG. В одном из вариантов осуществления обращенные на «юг» или в сторону «C-конца» антигенсвязывающие сайты можно рассматривать как находящиеся в направлении или плоскости, в которой обычная мономерная молекула IgG не имеет антигенсвязывающих сайтов. В одном из вариантов осуществления ориентация является противоположной ориентации состоящего из субдоменов (VH+VL) домена Fab в обычной мономерной молекуле IgG, которая таким образом имеет TNFR2-связывающий домен на C-конце домена Fc, направленном к клеткам, соседним антиген-экспрессирующей клетке. Такие связывающие сайты можно рассматривать как имеющие противоположную «нормальной» ориентации Fab-домена в антителе. Хотя гексамерная молекула IgG, изображенная на фиг. 1, имеет антигенсвязывающие сайты в верхней и нижней частях гексамера, считается, что она не имеет «северные» и «южные» или «противоположно» ориентированные антигенсвязывающие сайты, поскольку все антигенсвязывающие сайты находятся в том же формате, что и у обычной мономерной молекулы IgG, например, в том смысле, что эта молекула не имеет антигенсвязывающих сайтов в том месте, которое можно было бы считать C-концевой частью обычной мономерной молекулы IgG. В одном из предпочтительных вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению содержит антигенсвязывающие сайты на N-концах полипептидов, составляющих антитело. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может представлять собой антитело в том смысле, что она имеет антигенсвязывающие сайты как на N-конце, так и на C-конце полипептидных цепей антитела. В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления связывающая

молекула представляет собой четырехвалентное антитело с двумя N-концевыми («северными») и двумя C-концевыми («южными») TNFR2-связывающими сайтами. В предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой IgG с scFv на C-конце каждой легкой цепи. В следующем предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой IgG с scFv на C-конце каждой тяжелой цепи. В следующем предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой IgG с scFv на C-конце каждой тяжелой цепи и каждой легкой цепи, при этом такое антитело является шестивалентным.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления используемая связывающая молекула представляет собой мультимер, состоящий из отдельных субъединиц. Например, в одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой димер. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения димер представляет собой форму, состоящую из двух молекул scFv-Fab. В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой тример. В другом предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой гексамер. В одном из вариантов осуществления используемая связывающая молекула может представлять собой антитело. В одном из вариантов осуществления используемая связывающая молекула может представлять собой антитело, которое представляет собой гексамер слитого белка антитела. В одном из предпочтительных вариантов осуществления тяжелые цепи отдельных молекул IgG, составляющих гексамеры, содержат пептидный мотив RGY и, в частности, могут содержать этот мотив на C-конце. В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению содержит мутации мотива RGY в тяжелой цепи, которые представляют собой E345R/E430G/S440Y и, в частности, в хвосте Fc. Мотив RGY описан, например, в статье de Jong et al (2016) PLOS Biology |DOI:10.1371/journal.pbio.1002344, которая включена в настоящее описание во всей своей полноте в качестве ссылки, а также в частности в отношении мотива RGF и его использования для образования гексамеров.

Как правило, если связывающая молекула по настоящему изобретению содержит мультимер или сборку более мелких единиц, она по-прежнему будет считаться «связывающей молекулой» или «антителом» по настоящему изобретению, например, даже если она может содержать несколько субъединиц, каждое из которых можно рассматривать как являющееся антителом, таким как IgG и scFv. Так, например, «антитело» по настоящему изобретению может содержать фрагмент или фрагменты антитела как часть общего «антитела» по настоящему изобретению. Как обсуждается ниже, молекула может включать другие объекты, такие как лиганды для TNFR2, такие как TNF-альфа и в частности TNF80 и другие мутанты TNF, специфичные к TNFR2. Любой из специфических форматов, представленных в настоящем описании, может быть модифицирован путем дополнительного включения лиганда для TNF2.

Гексамеры антитела представляют собой один из вариантов осуществления настоящего изобретения. В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению будет содержать по меньшей мере модификацию E345 тяжелой цепи и в частности E345R. В другом варианте осуществления антитело по настоящему изобретению может содержать по меньшей мере модификацию E430 тяжелой цепи и в частности E430G. В другом варианте осуществления антитело по настоящему изобретению может содержать по меньшей мере модификацию S440 тяжелой цепи и в частности S440Y. В другом варианте осуществления антитело по настоящему изобретению может содержать по меньшей мере модификации E345 и E430 тяжелой цепи и в частности E345R и E430G. В предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению может содержать по меньшей мере модификации E345, E439 и S440 тяжелой цепи, в частности E345R, E439G и S440Y. В предпочтительном варианте осуществления антитело по изобретению будет содержать такие модификации и содержать гексамер, состоящий из единиц IgG. В следующем предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению подвергают целевой гексамеризации после того, как оно связалось с TNFR2.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать последовательности, вызывающие тримеризацию. Примеры таких последовательностей включают домены тримеризации из коллагена, лейциновой молнии, фибритина T4 и домены тримеризации членов семейства TRAF. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать такие последовательности тримеризации. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать или может представлять собой тример благодаря присутствию таких доменов. В одном из предпочтительных вариантов осуществления последовательность тримеризации может быть последовательностью тенасцина-С (TNC). Однако в любом из обсуждаемых в настоящем описании вариантов осуществления, где TNC относится к последовательности тримеризации, в общем случае может использоваться, например, любая из специфических последовательностей тримеризации, упомянутых в настоящем описании, а не только TNC, хотя в предпочтительном варианте осуществления используется TNC. В одном из предпочтительных вариантов осуществления используемая последовательность TNC происходит от куриного TNC. В другом предпочтительном варианте осуществления она происходит от TNC млекопитающих. В следующем предпочтительном варианте осуществления TNC представляет собой TNC человека. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению не содержит TNC.

В другом предпочтительном варианте осуществления домен тримеризации тенасцина-С (TNC) можно использовать для сборки отдельных антител или других субъединиц в мультимер. Следовательно, связывающая молекула и в частности антитело по настоящему изобретению могут содержать пептид домена тримеризации TNC, такой

как пептид, приведенный в SEQ ID NO: 2. Она может содержать вариант пептида TNC, например, один с пятью, четырьмя, тремя, двумя или одним изменением аминокислотной последовательности относительно SEQ ID NO:2, которая все еще способной приводить к образованию мультимеров. В одном из предпочтительных вариантов осуществления С-конец тяжелых цепей антитела содержит пептидную последовательность TNC или связан с ней. В одном из вариантов осуществления такой подход используется для получения тримера из отдельных TNFR2-связывающих фрагментов, таких как субъединицы антитела и/или лиганды. Любая из указанных в настоящем описании связывающих молекул, если не указано иное, может содержать пептид TNC в качестве средства, обеспечивающего ассоциацию отдельных единиц и в частности в качестве средства для образования мультимеров.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой Fc γ R-независимый агонист TNFR2. Например, в случае, когда связывающая молекула представляет собой антитело, в антителе может отсутствовать область Fc, и поэтому оно не будет связываться с Fc γ R этой области. Альтернативно, в другом варианте осуществления антитело может иметь область Fc, модифицированную таким образом, что она не способна связываться с Fc γ R. В настоящем описании обсуждаются различные модификации Fc, которые можно использовать для достижения этой цели.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой антитело, выбранное из антител IgG, IgM, IgA, IgE и IgD, или может содержать такое антитело. Она может содержать обсуждаемые в настоящем описании модификации Fc, которые делают ее независимой от гамма-рецептора Fc. В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула может представлять собой или содержать антитело IgG или содержит такое антитело. В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления она будет представлять собой антитело IgG1 или будет содержать такое антитело. Антитело может представлять собой антитело IgG2, IgG3 или IgG4 или может содержать такое антитело. В особенно предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению может содержать однодоменные антитела, например, однодоменные антитела VHH. В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению будет содержать по меньшей мере два таких dAb, в частности VHH.

В предпочтительном варианте осуществления предложенные связывающие молекулы специфически связываются с TNFR2, но не с TNFR1. В другом предпочтительном варианте осуществления предлагаемая связывающая молекула представляет собой Fc γ R-независимый агонист TNFR2. Связывающая молекула имеет валентность для связывания TNFR2, равную по меньшей мере двум.

В предпочтительном варианте осуществления связывающие сайты связывающей молекулы по настоящему изобретению могут быть выбраны из антигенсвязывающих

сайтов антитела и лигандов, которые связываются с TNFR2. В особенно предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой антитело или содержит по меньшей мере часть антитела. Как определено в настоящем описании, антитело включает различные форматы, которые включают антигенсвязывающие сайты, но не находится в формате природного антитела. Антитело не обязательно должно быть цельным антителом, например, антитело по настоящему изобретению может представлять собой или содержать фрагмент антитела, такой как фрагмент Fab2 антитела. Антитела по настоящему изобретению могут содержать фрагменты антител, например, в одном из предпочтительных вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению может содержать антигенсвязывающий сайт, обеспечиваемый фрагментом scFv или Fab в виде части антитела. Антитело по настоящему изобретению может представлять собой одноцепочечное антитело или содержать его.

Ссылка на антитело включает молекулы антитела, которые содержат, связаны или конъюгированы с фрагментами, которые сами не происходят из последовательностей на основе антитела. Так, например, ссылка на антитело в настоящем описании включает антитело, которое связано или конъюгировано с лигандом TNFR2 или модифицированной версией лиганда TNFR2. Примеры лигандов TNFR2, которые можно использовать или модифицировать для использования, включают TNF α и LT α , а также их варианты. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула и в частности антитело по настоящему изобретению могут содержать последовательности, вызывающие мультимеризацию. Примером одной из таких последовательностей является последовательность, которую может иметь тяжелая цепь антитела по настоящему изобретению, способная вызывать мультимеризацию, например, в результате включения мутаций RGY, вызывающих мультимеризацию. В одном из предпочтительных вариантов осуществления именно хвостовая часть Fc содержит модификации RGY, вызывающие гексамеризацию. В другом особенно предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению может содержать пептидную последовательность домена тримеризации тенасцина-С (TNC) на С-конце тяжелых цепей. Следовательно, в одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению, в частности антитело, может содержать пептидную последовательность тенасцина-С, представленную как SEQ ID NO: 2, или вариант пептида TNC, который все еще способен вызывать мультимеризацию. В другом варианте осуществления она может содержать последовательность TNC человека, которая вызывает тримеризацию. В другом варианте осуществления она может содержать домен тримеризации, такой как любой из специфических доменов, упомянутых в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления все связывающие сайты TNFR2-связывающей молекулы по настоящему изобретению могут быть антигенсвязывающими сайтами антитела. В другом варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт

антитела для TNFR2 и по меньшей мере один лиганд или производное лиганда, которое связывает TNFR2, другими словами, она может содержать смесь таких связывающих сайтов. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению содержит антитело, которое дополнительно содержит связывающие сайты на основе лиганда для TNFR2. В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула и, в частности антитело, по настоящему изобретению не содержит TNFR2-связывающих сайтов на основе лиганда. В вариантах осуществления, в которых связывающая молекула представляет собой антитело или содержит его, антигенсвязывающий сайт обычно содержит шесть CDR, а именно, три CDR переменной области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR2) и три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3). Однако, как обсуждается ниже, связывающие молекулы по настоящему изобретению могут содержать связывающие домены VHH и другие однодоменные связывающие агенты, в частности, для TNFR2. Такие домены VHH содержат три CDR: CDR1, CDR2 и CDR3. Настоящее изобретение относится к связывающей молекуле, содержащей связывающий сайт с любым из специфических наборов из шести или трех CDR, представленных в настоящем описании, в антигенсвязывающем сайте для TNFR2. В другом варианте осуществления связывающая молекула может содержать любую пару областей VH и VL, представленных в настоящем документе. В дополнительном варианте осуществления она может содержать связывающий сайт, содержащий или состоящий из любого из VHH, представленных в настоящем описании. Такие специфические последовательности приведены в таблицах настоящей заявки. Такие наборы CDR также представлены в настоящем описании со ссылкой на SEQ ID NO. Такие наборы CDR, пары доменов VL и VH или VHH можно использовать в любой из структур, представленных в настоящем описании, включая структуры, показанные на фигурах и используемые в примерах. Также могут быть использованы варианты последовательностей любой из специфических последовательностей, представленных в настоящем описании.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления антигенсвязывающие сайты антитела и связывающие сайты на основе лиганда находятся в разных ориентациях, например, они могут находиться в противоположных ориентациях, например, антигенсвязывающие сайты могут быть в «северной» ориентации, а связывающие сайты на основе лиганда в «южной» или «противоположной» ориентации. В другом варианте осуществления связывающая молекула может иметь антигенсвязывающие сайты антитела как в «северной», так и в «южной» ориентации, при этом связывающие сайты на основе лиганда могут находиться только в одной ориентации, например, исключительно в «южной» ориентации. «Север» и «юг» указывают в какой концевой части полипептидов присутствуют антигенсвязывающие сайты: N-концевой или C-концевой части. Так, например, в обычных антителах антигенсвязывающие сайты, обеспечиваемые переменными областями антитела, находятся в N-концевой части полипептидов тяжелой и легкой цепей. В отличие от этого, некоторые из представленных связывающих молекул

представляют собой антитела, у которых антигенсвязывающие сайты находятся на С-конце полипептида или в направлении к нему, например, когда scFv либо представляют собой С-концевую часть полипептидов легкой и тяжелой цепей, либо соединены с ними. Некоторые связывающие молекулы содержат как N-концевые, так и С-концевые антигенсвязывающие сайты.

В одном из вариантов осуществления изобретения используется антитело, содержащее связывающие сайты, ориентированные только на «север». На фиг. 1 настоящей заявки показаны иллюстративные примеры предпочтительных TNFR2-связывающих молекул, а также область Fab, которая имеет валентность, равную единице, и поэтому сама по себе не является связывающей молекулой по настоящему изобретению.

В форматах, показанных на фигурах, в частности на фиг. 1, 7, 24, 29, 40 и 41, структуры обозначены «СI» или «идентификатором клона», где упоминается исходная TNFR2-специфическая молекула IgG с идентификатором клона, указывающим, из какого клона, обсуждаемого в примерах, происходят CDR антигенсвязывающих сайтов IgG. Если в настоящем описании приводится ссылка на такие структуры без использования идентификатора клона, структура не ограничена ссылкой на специфический клон, поэтому не ограничена CDR, происходящими из конкретного клона, приведенного в примерах, и антигенсвязывающие сайты могут быть из любого подходящего анти-TNFR2 антитела. Так, например, ссылка на scFv-C4-IgG1(N297A) включает идентификатор клона (CI) для клона 4, но ссылка на scFv-IgG1(N297A) указывает на такой формат связывающей молекулы, но без ограничения антигенсвязывающего сайта последовательностями из конкретного клона. Для любого из форматов, указанных в настоящем описании в отношении специфического клона, может использоваться один из других антигенсвязывающих сайтов, представленных в настоящем описании, и может быть представлен формат, не ограниченный конкретным клоном. Для любой связывающей молекулы, содержащей антигенсвязывающие сайты, включающие переменные области тяжелой и легкой цепей, в предпочтительном варианте осуществления можно использовать CDR, наборы CDR, переменные области и пары переменных областей C4 и вариантов C4 (см. Таблицу 10).

В предпочтительных вариантах осуществления связывающую молекулу по настоящему изобретению выбирают из следующих:

- i. антитела Fab2, обе специфичности которого являются TNFR2-специфическими,
- ii. антитела IgG, которое содержит область Fc, которая не способна активировать рецепторы Fc и, в частности, связываться с Fc γ R. Обе валентности молекулы являются TNFR2-специфическими и могут считаться ориентированными на «север». В одном из вариантов осуществления область Fc антитела содержит модификацию, которая означает, что она не связывается с рецепторами Fc, например, любую из специфичных модификаций, указанных в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В предпочтительном варианте осуществления оно имеет формат IgG1(N297A), показанный на фиг. 1, но не

ограничивающийся специфическим клоном,

iii. молекулы четырехвалентного антитела, содержащей четыре TNFR2-специфических антигенсвязывающих сайта, где все сайты ориентированы на «север», при этом антитело имеет базовую структуру молекулы IgG, модифицированную таким образом, что каждая легкая и тяжелая цепи имеют на своем N-конце связанный с ним антигенсвязывающий сайт. В одном из вариантов осуществления каждый антигенсвязывающий сайт содержит пару вариабельных областей тяжелой и легкой цепей (домен scFv), которые присоединены к легкой или тяжелой цепям базовой четырехцепочечной структуры IgG. В одном из вариантов осуществления антитело содержит константные области тяжелой и легкой цепей базовой молекулы IgG, где к каждому N-концу цепи антитела присоединен scFv. Антитело обычно содержит область Fc, модифицированную таким образом, что она не связывается с FcγR. В одном из вариантов осуществления оно включает любую из обсуждаемых в настоящем описании модификаций, которые предотвращают или уменьшают связывание с FcγR. В одном из вариантов осуществления антитело имеет формат scFv-IgG1(N297A), как показано на фиг. 1, но не ограничивается последовательностями, происходящими от конкретного клона,

iv. антитела с валентностью шесть, которое представляет собой мультимер из трех субъединиц антитела IgG, причем области Fc каждой отдельной субъединицы IgG не способны связываться с FcγR. Все шесть антигенсвязывающих сайтов можно рассматривать как ориентированные на «север». В одном из вариантов осуществления области Fc не способны связываться с рецепторами группы Fc гамма-рецепторов, поскольку они содержат модификации, такие как любые из описанных в настоящем описании. В другом варианте осуществления области Fc содержат модификацию N297A. Для мультимеризации отдельных субъединиц IgG можно использовать любой подходящий способ. В особенно предпочтительном варианте осуществления субъединицы связаны через пептид тенасцина-С (TNC), и в частности, пептид, полученный из TNC, такого как пептидная последовательность SEQ ID NO: 2. Например, в одном из вариантов осуществления тяжелые цепи субъединиц IgG содержат пептид тенасцина или связаны с ним, при этом ассоциация пептидов тенасцина приводит к сборке мультимера. В предпочтительном варианте осуществления пептиды имеют последовательность SEQ ID NO: 2 или вариант этой последовательности, все еще способный к мультимеризации. В одном из вариантов осуществления антитело имеет формат IgG1(N297A)-HC:TNC, как показано на фиг. 1, но не ограничивается последовательностями из конкретного клона,

v. антитела с валентностью 12, представляющего собой мультимер из трех субъединиц. Субъединицы в одном из вариантов осуществления содержат структуру IgG, в которой каждая вариабельная область заменена TNFR2-специфическим scFv, где все антигенсвязывающие сайты можно рассматривать как направленные на «север», например scFv-IgG1(297A)-HC:TNC. Антитело не способно связываться с рецепторами Fc; в одном из вариантов осуществления оно не связывается с FcγR, поскольку область Fc модифицирована и, следовательно, не способна к связыванию, например, была выполнена

любая из обсуждаемых в настоящем описании модификаций. В предпочтительном варианте осуществления используется модификация N297A. Для объединения трех субъединиц можно использовать любой подходящий способ, и в одном из вариантов осуществления используется домен тримеризации TNC. В предпочтительном варианте осуществления С-конец каждой тяжелой цепи либо содержит домен тримеризации TNC, либо связан с ним, чтобы вызвать мультимеризацию нескольких Fab2 или IgG, такой как SEQ ID NO: 2. В одном из вариантов осуществления антитело имеет формат scFv:IgG1(N297A)-HC:TNC, показанный на фиг. 1, но не ограничивается последовательностями из конкретного клона,

vi. гексамерного антитела IgG. Обычно все антигенсвязывающие сайты антитела являются TNFR2-специфическими, в результате чего валентность антитела равна двенадцати. Области Fc каждой отдельной субъединицы IgG имеют модификацию, предотвращающую связывание с FcγR. Можно использовать любую из обсуждаемых в настоящем описании модификаций; в одном из предпочтительных вариантов модификация представляет собой N297A. Может быть использован любой подходящий способ достижения гексамеризации как на мишени, так и вне ее. В одном особенно предпочтительном варианте осуществления каждая тяжелая цепь отдельной субъединицы IgG содержит мутации RGY, обеспечивающие гексамеризацию. В одном из вариантов осуществления антитело несет мутацию RGY плюс мутацию N297A (IgG1(N-RGY), показанное на фиг. 1) и, таким образом, имеет как мутацию, предотвращающую связывание рецептора Fc, так и мутации, приводящие к гексамеризации. Следовательно, в одном из вариантов осуществления связывающая молекула имеет формат IgG1(N-RGY), как показано на фиг. 1, но не ограничивается последовательностями из конкретного клона.

В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула представляет собой одну из молекул, указанных в пунктах (iii)-(vi) выше. В другом предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула представляет собой четырехвалентную связывающую молекулу, например, указанную в пункте (iv). В следующем предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула представляет собой молекулу с валентностью 12, например, выбранную из молекул, указанных в пунктах (v) и (vi) выше.

В одном из вариантов осуществления изобретения используется антитело, как с N-концевыми, так и с С-концевыми связывающими сайтами, расположенными на каркасе антитела с параллельно ориентированными цепями (Fc, IgG, Fc-TNC, TNC-Fc, IgG-TNC). Следовательно, используется антитело с «противоположно» ориентированными связывающими сайтами. На фиг. 7 настоящей заявки представлены иллюстративные примеры особенно предпочтительных TNFR2-связывающих молекул со связывающими сайтами, которые можно рассматривать как находящиеся в «противоположных» ориентациях. В предпочтительных вариантах осуществления связывающую молекулу по настоящему изобретению выбирают из приведенной ниже группы:

i. Антитела, содержащего Fab-область, присоединенную к scFv, где TNFR2-

связывающие сайты Fab и scFv находятся в противоположной ориентации, таким образом, домен scFv связан с С-концом LC или укороченным HC. В предпочтительном варианте осуществления scFv присоединен к С-концу легкой цепи Fab. Следовательно, в одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению имеет формат Fab-LC:scFv, показанный на фиг. 7, но не ограниченный последовательностями из конкретного клона.

ii. Антитела, которое представляет собой молекулу IgG, имеющую scFv, прикрепленный к С-концу каждой тяжелой цепи, и область Fc, модифицированную таким образом, что она не связывается с рецепторами Fc и в частности с FcγR. Область Fc может содержать любую из обсуждаемых здесь модификаций, которые устраняют связывание Fc и в частности модификацию N297A тяжелой цепи. В одном из вариантов осуществления антитело имеет формат IgG1(N297A)-HC:scFv, показанный на фиг. 7, но не ограниченный последовательностями из конкретного клона.

iii. Антитела, которое представляет собой молекулу IgG, имеющую scFv, прикрепленный к С-концу каждой легкой цепи, и область Fc, модифицированную таким образом, что она не связывается с рецепторами Fc и в частности с FcγR. Область Fc может содержать любую из обсуждаемых в настоящем описании модификаций, которые устраняют связывание Fc и в частности модификацию N297A тяжелой цепи. В одном из вариантов осуществления антитело имеет формат IgG1(N297A)-LC:scFv, показанный на фиг. 7, но не ограниченный последовательностями из конкретного клона.

iv. Антитела, которое представляет собой молекулу IgG, имеющую scFv, прикрепленный к С-концу каждой легкой и тяжелой цепей, и область Fc, модифицированную таким образом, что она не связывается с рецепторами Fc и в частности с FcγR. Область Fc может содержать любую из обсуждаемых в настоящем описании модификаций, которые устраняют связывание Fc и в частности модификацию N297A тяжелой цепи. В одном из вариантов осуществления антитело имеет формат IgG1(N297A)-LC:scFv-HC:scFv, показанный на фиг. 7, но не ограниченный последовательностями из конкретного клона.

v. Антитела, которое представляет собой молекулу IgG, модифицированную таким образом, что каждая переменная область тяжелой и легкой цепей заменена на TNFR2-специфический scFv, и где каждая тяжелая цепь молекулы IgG имеет TNFR2-специфический scFv, соединенный с ней. Следовательно, такое антитело имеет валентность шесть по отношению к TNFR2. Область Fc антитела модифицирована таким образом, что она не связывается с рецепторами Fc и в частности с FcγR. Область Fc может содержать любую из обсуждаемых в настоящем описании модификаций, которые устраняют связывание Fc и в частности модификацию N297A тяжелой цепи. В одном из вариантов осуществления антитело имеет формат LC:scFv-HC:scFv-IgG1(N297A)-HC:scFv, показанный на фиг. 7, но не ограниченный последовательностями из конкретного клона.

vi. Антитела, которое представляет собой молекулу IgG, модифицированную таким

образом, что каждая переменная область тяжелой и легкой цепей заменена на scFv, и где к каждой легкой цепи молекулы IgG присоединен scFv. Следовательно, такое антитело имеет валентность шесть по отношению к TNFR2. Область Fc антитела модифицирована таким образом, что она не связывается с рецепторами Fc и в частности с FcγR. Область Fc может содержать любую из обсуждаемых в настоящем описании модификаций, которые устраняют связывание Fc и в частности модификацию N297A тяжелой цепи. В одном из вариантов осуществления антитело имеет формат LC:scFv-NC:scFv-IgG1(N297A)-LC:scFv, показанный на фиг. 7, но не ограниченный последовательностями из конкретного клона.

vii. Антитела, которое представляет собой молекулу IgG, модифицированную таким образом, что каждая переменная область тяжелой и легкой цепей заменена на scFv, и где к каждой легкой и тяжелой цепям молекулы IgG присоединен scFv. Следовательно, такое антитело имеет валентность восемь по отношению к TNFR2. Область Fc антитела модифицирована таким образом, что она не связывается с рецепторами Fc и в частности с рецепторами FcγR. Область Fc может содержать любую из обсуждаемых в настоящем описании модификаций, которые устраняют связывание Fc и в частности модификацию N297A тяжелой цепи. В одном из вариантов осуществления антитело имеет формат LC:scFv-NC:scFv-IgG1(N297A)-LC:scFv-NC:scFv, показанный на фиг. 7, но не ограниченный последовательностями из конкретного клона.

viii. Мультимера, содержащего три отдельные молекулы антитела IgG, которые содержат на C-конце тяжелой цепи пептид тримеризации тенацина-C (TNC), при этом каждый пептид тенацина соединен своим C-концом с scFv. Указанная молекула антитела имеет валентность двенадцать для TNFR2. Область Fc антитела модифицирована таким образом, что она не связывается с рецепторами Fc и в частности с FcγR. Область Fc может содержать любую из обсуждаемых здесь модификаций, которые устраняют связывание Fc и в частности модификацию N297A тяжелой цепи. В одном из вариантов осуществления антитело имеет формат IgG1(N297A)-NC:TNC-scFv, показанный на фиг. 7, но не ограниченный последовательностями из конкретного клона.

Как обсуждалось выше, указанные выше форматы, показанные на фиг. 1, не ограничены последовательностями, происходящими из конкретного клона. В одном из вариантов осуществления также предусмотрены специфические форматы, где форматы содержат последовательности специфического клона, представленные в примерах, или варианты последовательностей, как обсуждается в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления, относящихся к форматам с областями Fc, тяжелые цепи содержат модификации тяжелой цепи, указанные в настоящем описании, например, модификации DANA, указанные в настоящем описании, а не только модификацию N297A.

В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления набор из шести CDR или последовательности VL и VH клона C4 или одного из специфических вариантов клона C4, представленных в настоящем описании, используются в одном из форматов, показанных на фиг. 1 и 7. Они также могут использоваться в форматах, показанных на

фиг. 29. В одном из вариантов осуществления любой из наборов из шести CDR, представленных в таблице 5, или пар переменных областей, представленных в таблице 6, может использоваться в любом из форматов, представленных в настоящем описании, в частности в форматах, которые показаны на фиг. 1 и 7. Также можно использовать варианты наборов CDR или пар переменных областей, представленных ниже в настоящем описании. Особенно предпочтительными CDR, наборами CDR и переменными областями, предназначенными для использования, являются те, которые представлены для С4 и вариантов С4, указанных в настоящем описании.

В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой антитело, выбранное из одного из следующих форматов, имеющие некоторые указанные в скобках преимущества, обеспечиваемые этим форматом:

- Fab1-scFv (высокая проницаемость в ткани, короткоживущее);
- IgG-НС:scFv (проверено на наличие множества антител, легко генерирует биспецифические варианты);
- scFv-IgG (легко генерирует биспецифические варианты);
- IgG-TNC (является потенциально полезным для распознавания путей); и
- scFv-IgG-TNC (высокоактивное, легко генерирует биспецифические варианты).

В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления, указанных выше, в которых имеется ссылка на IgG, используется IgG1. Альтернативно, в другом варианте осуществления, где IgG1 упоминается в конкретном формате, в том же формате также может рассматриваться IgG, который представляет собой IgG любого подтипа.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой антитело, которое:

- (a) содержит TNFR2-связывающий сайт как на N-конце, так и на C-конце одной или более тяжелых цепей антитела; и/или
- (b) содержит TNFR2-связывающий сайт как на N-конце, так и на C-конце одной или более легких цепей антитела.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула содержит scFv на C-концевой части тяжелых цепей связывающей молекулы, где scFv связывается с TNFR2. В другом варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению содержит scFv на C-концевой части легких цепей молекулы.

В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой антитело, которое содержит только область Fc, которая на C-концевой части тяжелых цепей либо имеет TNFR2-специфические лиганды, либо связана, либо конъюгирована с ними. В одном из вариантов осуществления каждая тяжелая цепь имеет три таких лиганда, присутствующих на C-концевой части тяжелых цепей.

В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой антитело или область Fc с C-

концевой тримеризацией TNC, за которой следует TNFR2-специфический мутант TNF, в частности TNF80. В одном из вариантов осуществления полипептид может содержать одноцепочечный полипептид, содержащий три последовательности TNF-альфа, которые могут тримеризоваться, например, три единицы TNF80.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению является двухвалентной с пространственно подвижными С- и N-концевыми антигенсвязывающими сайтами.

В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой двухвалентное антитело, которое содержит TNFR2-специфический Fab, где тяжелая или легкая цепь Fab-части антитела содержит TNFR2-специфический scFv. Одним из преимуществ такой малой молекулы является то, что она может обладать высокой проникающей способностью в ткани. В одном из предпочтительных вариантов осуществления антитело может содержать scFv, присоединенный к легкой цепи Fab, например, когда оба являются частью одного и того же полипептида. В одном из предпочтительных вариантов осуществления антитело имеет формат Fab-LC:scFv, как показано на фиг. 7, но не ограничено последовательностями из клонов, представленных в настоящих примерах, и может содержать любые подходящие последовательности анти-TNFR2 антитела. Например, в этих вариантах осуществления домены Fab и scFv могут распознавать одни и те же или разные эпитопы TNFR2.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула и в частности антитело по настоящему изобретению являются четырехвалентными. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению имеет формат Fab-FC-scFv, где антитело содержит модификацию области Fc, устраняющую или снижающую связывание с рецептором Fc, и где антитело содержит scFv на С-терминальном конце каждой тяжелой цепи. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело имеет формат Fab-FC-scFv, где антитело является биспецифическим в том смысле, что оно обладает двумя разными специфичностями в отношении TNFR2. Например, в одном из предпочтительных вариантов осуществления присутствующие scFv связываются с эпитопом, отличным от антигенсвязывающих сайтов IgG. В альтернативном варианте осуществления все TNFR2-связывающие сайты распознают один и тот же эпитоп TNFR2. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению имеет формат scFv:IgG, где легкие и тяжелые цепи антитела модифицированы путем включения scFv в N-концевую часть, и содержит область Fc антитела, модифицированную таким образом, что она не связывается с рецептором Fc. Могут быть использованы любые из обсуждаемых в настоящем описании модификаций, которые уменьшают или устраняют связывание Fc. Такое антитело может быть биспецифическим в том смысле, что scFv, экспрессированные на полипептиде тяжелой цепи, могут связываться с одним эпитопом TNFR2, а scFv легких цепей - с другой специфичностью TNFR2. В альтернативном варианте осуществления все области scFv могут связывать один и тот же эпитоп TNFR2.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению является шестивалентной. В одном из вариантов осуществления антитело имеет формат IgG-LC:scFv-NC:scFv, а также имеет область Fc, модифицированную таким образом, что она не связывается с рецептором Fc, например, имеет любую из обсуждаемых в настоящем описании модификаций Fc, которые устраняют или уменьшают связывание с Fcγ-рецепторами. В предпочтительном варианте осуществления IgG представляет собой IgG1. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело является шестивалентным, где оно содержит область Fc антитела, и каждая из тяжелых цепей антитела связана с тримером TNF-α или его вариантом в C-концевой части.

В другом предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по изобретению является 12-валентной. В одном из предпочтительных вариантах осуществления 12-валентная связывающая молекула представляет собой мультимер из трех отдельных субъединиц антитела, где переменные области тяжелой и легкой цепей антитела заменены молекулами scFv. В предпочтительном варианте осуществления связаны три субъединицы антитела, поскольку тяжелые цепи каждого антитела содержат на C-конце пептид тенасцина-C, содержащий домен тримеризации TNC. Связывающая молекула не будет связывать рецепторы Fc и в предпочтительном варианте осуществления содержит область Fc с любой из модификаций, указанных в настоящем описании. В другом варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может представлять собой гексатело, содержащее шесть молекул IgG. Например, связывающая молекула может представлять собой гексатело из шести антител IgG, где области Fc содержат мутации RGY HexaBody, а также модификацию, приводящую к тому, что области Fc не будут связываться с рецепторами Fc, например, любую из специфических модификаций, указанных в настоящем описании. В предпочтительном варианте осуществления IgG представляет собой IgG1.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению является четырех- или 12-валентной по отношению к TNFR2. В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой антитело, выбранное из формата scFv-IgG(*)-NC-TNC и scFv-IgG(*), где * указывает на модификацию области Fc, которая устраняет или уменьшает связывание с рецептором Fc. В особенно предпочтительном варианте осуществления IgG-часть связывающей молекулы представляет собой IgG1. NC-TNC указывает на то, что тяжелые цепи IgG содержат пептид тенасцина, например, SEQ ID NO:2 или его вариант. В другом варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой антитело, выбранное из форматов scFv-IgG(*)-NC-TNC, scFv-IgG(*) и IgG(*)-NC:RGY. Для формата IgG(*)-NC:RGY также предпочтительно, чтобы IgG-часть молекулы представляла собой антитело IgG1.

В особенно предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет способна обеспечивать образование гексамеров молекул

TNFR2 на поверхности клетки или, по меньшей мере, гексамеров. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может связывать рецепторы TNFR2 в цис-конфигурации, т.е. связывать множество рецепторов TNFR2 на поверхности одной и той же клетки. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула способна, по меньшей мере, обеспечивать образование гексамеров TNFR2 на поверхности одной и той же клетки. В другом варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению способна связывать молекулы TNFR2 в транс-конфигурации, т.е. связывающая молекула способна связывать по меньшей мере одну молекулу TNFR2 на поверхности одной клетки и по меньшей мере одну молекулу TNFR2 на поверхности другой клетки. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула способна обеспечивать цис- и транс-связывание TNFR2. Например, она может обеспечить связывание, а в другом варианте осуществления она действительно может обеспечить связывание. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению приводит к образованию гексамеров TNFR2 на обеих клетках в случае транс-связывания. В одном из вариантов осуществления ориентация связывающих сайтов может влиять на конфигурацию связывания антитела с TNFR2, обеспечивая цис- и/или транс-связывание. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой молекулу, которая имеет по меньшей мере два TNFR2-связывающих сайта с противоположной ориентацией относительно друг друга, предпочтительно, связывающая молекула имеет по меньшей мере два таких TNFR2-связывающих сайта, которые являются антигенсвязывающими сайтами антитела. В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой молекулу, которая имеет по меньшей мере два TNFR2-связывающих сайта, которые способны связывать молекулы TNFR2 на разных клетках, обеспечивая транс-связывание, предпочтительно, когда связывающая молекула имеет по меньшей мере два таких TNFR2-связывающих сайта, которые являются антигенсвязывающими сайтами антитела. В другом предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению имеет валентность по меньшей мере четыре и способна связывать множество разных молекул TNFR2 на поверхности одной и той же клетки, предпочтительно, когда связывающая молекула имеет валентность по меньшей мере шесть.

В другом варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может представлять собой диатело. Диатело обычно представляет собой небольшую часть двухвалентного антигенсвязывающего антитела, и существует множество форматов диател, любой из которых может быть использован, например, диатело может содержать переменный домен тяжелой цепи, связанный с переменным доменом легкой цепи на одном и том же участке полипептидной цепи, связанной пептидным линкером, который является слишком коротким, чтобы обеспечить спаривание двух доменов одной цепи. Это приводит к спариванию с комплементарными

доменами другой цепи и сборке димерной молекулы с двумя антигенсвязывающими сайтами для TNFR2.

Существует большое разнообразие форматов антител, которые можно использовать либо в виде антитела по настоящему изобретению, либо как его часть; например, Fab, Fv, scFv, (ScFv)₂, (ScFv)₂, биспецифические (scFv)₂, триатела, тетратела, биспецифические sc(Fv)₂, тандемные ди-scFv, тандемные три-scFv и триатела представляют собой возможные форматы антител по настоящему изобретению. Как обсуждалось выше, связывающая молекула по настоящему изобретению имеет валентность, равную по меньшей мере двум. В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению имеет валентность по меньшей мере двух пространственно-подвижных потенциально межклеточных TNFR2-связывающих сайтов или по меньшей мере шести «параллельно» или «однонаправленно» ориентированных цис-действующих связывающих сайтов. В вариантах осуществления, где упомянутые в настоящем описании форматы имеют валентность, равную единице, их можно использовать как часть антитела по настоящему изобретению в таких форматах, а не как целое антитело.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать вариант TNFR2-связывающего сайта, а не один из указанных в настоящем описании специфических TNFR2-связывающих сайтов. В одном из предпочтительных вариантов осуществления вариант TNFR2-связывающей молекулы определяют по ее способности перекрестно блокировать связывание одной из указанных в настоящем описании специфических TNFR2-связывающих молекул с TNFR2. Способность к перекрестному блокированию можно оценить с помощью анализа связывания путем измерения связывания связывающей молекулы с TNFR2 и способности дополнительной связывающей молекулы перекрестно блокировать такое связывание с TNFR2. В одном из вариантов осуществления способность к перекрестному блокированию изучают с использованием моновалентной молекулы, которая содержит только одну копию TNFR2-связывающего сайта. Например, изучают способность scFv, содержащего связывающий сайт, перекрестно блокировать scFv, который отличается от одной из молекул специфического связывания, представленных в настоящем описании, только наличием TNFR2-связывающего сайта. В другом варианте осуществления изучают способность реальных связывающих молекул перекрестно блокировать друг друга без превращения их в молекулы scFv. В дополнительном варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет способна блокировать или снижать связывание TNF α с TNFR2. В другом варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет способна снижать или блокировать связывание лимфотоксина-альфа с TNFR2.

В одном из вариантов осуществления средство связывающего домена к TNFR2 в связывающей молекуле, в частности антителе, по настоящему изобретению имеет K_D, которая составляет примерно 400 нМ или менее, 200 нМ или менее, например, примерно

100 нМ, 50 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 1 нМ, 500 пМ, 250 пМ, 200 пМ, 100 пМ или менее. В одном из вариантов осуществления средство связывания составляет 50 пМ или менее. Например, в одном из вариантов осуществления такое средство к TNFR2 будет продемонстрировано для отдельного TNFR2-связывающего сайта в связывающей молекуле по настоящему изобретению, а не общее средство к связывающей молекуле. В одном из вариантов осуществления такое средство представляет собой общую avidность антитела к TNFR2. В одном из вариантов осуществления средство отдельного антигенсвязывающего сайта связывающей молекулы по настоящему изобретению может составлять менее 1 мкМ, менее 750 нМ, менее 500 нМ, менее 250 нМ, менее 200 нМ, менее 150 нМ, менее 100 нМ, менее 75 нМ, менее 50 нМ, менее 10 нМ, менее 1 нМ, менее 0,1 нМ, менее 10 пМ, менее 1 пМ или менее 0,1 пМ. В некоторых вариантах осуществления Kd составляет от примерно 0,1 пМ до примерно 1 мкМ.

В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой моноклональное антитело. В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело IgG1, IgG2 или IgG4 или содержит константную область тяжелой цепи антитела этого класса. В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело изотипа IgG1 или содержит такое антитело. В одном из предпочтительных вариантов осуществления используемая константная область представляет собой константную область человеческого IgG. В особенно предпочтительном варианте осуществления используется константная область человеческого IgG1. Она может иметь любую из модификаций, указанных в настоящем описании. Не Термин «антитело» охватывает, без особых ограничений, антитела, полученные от любого подходящего источника, включая кур, акул и млекопитающих, таких как мышь, хомяк, кролик, коза, корова, лама, примат, не являющийся человеком, и человек. В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антитело по настоящему изобретению представляет собой гуманизованное антитело. В другом предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула и в частности антитело по настоящему изобретению являются полностью человеческими. Неограничивающие примеры способов получения гуманизованных антител известны в данной области техники, например, из Riechmann et al. *Nature*. 1988 Mar 24; 332(6162):323-7 или Jones et al. *Nature*. 1986 May 29-Jun 4; 321 (6069):522-5. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой человеческое антитело. Как обсуждалось в настоящем описании, связывающая молекула по настоящему изобретению и, в частности антитело, может содержать не относящиеся к человеческим последовательности, такие как пептид тенацина-с, но в одном из предпочтительных вариантов осуществления все основанные на антителе последовательности антитела являются человеческими, несмотря на присутствие пептидной последовательности тенацина. Термин «антитело» охватывает мономерные антитела (такие как IgD, IgE, IgG) или олигомерные антитела (такие как IgA или IgM).

Термин «антитело» также включает, без особых ограничений, выделенные антитела и модифицированные антитела, такие как генетически сконструированные антитела, например, химерные или гуманизированные антитела.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению обладает только одной специфичностью в отношении TNFR2. Следовательно, в одном из предпочтительных вариантов осуществления все TNFR2-специфические антигенсвязывающие сайты антитела по настоящему изобретению будут специфическими к одному и тому же эпитопу TNFR2. В другом варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет обладать более чем одной специфичностью в отношении TNFR2. Например, это может быть связано с тем, что связывающая молекула содержит как антигенсвязывающие сайты антитела, так и TNFR2-связывающие сайты на основе лиганда. Однако в одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой антитело, которое содержит антигенсвязывающие сайты, распознающие более чем один эпитоп TNFR2. Например, в одном из предпочтительных вариантов связывающая молекула по настоящему изобретению и, в частности антитело, являются биспецифическими к TNFR2. В одном из предпочтительных вариантов связывающей молекулы по настоящему изобретению одна специфичность связывающей молекулы к TNFR2 обеспечивается парой вариабельных областей легкой и тяжелой цепей, тогда как другая специфичность обеспечивается фрагментами scFv, присутствующими как часть всей связывающей молекулы. В другом варианте осуществления все TNFR2-связывающие сайты связывающей молекулы и, в частности антитела, обеспечиваются scFv, причем связывающая молекула образована из двух разных полипептидов, содержащих scFv с разной специфичностью.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать область Fc или молекулу антитела, которая имеет нерелевантную специфичность, и способность связываться с TNFR2 обеспечивается другими частями связывающей молекулы. Например, в одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению содержит Fc область, где на С-концевой части тяжелых цепей находятся молекулы TNF-альфа и в частности мутантные молекулы TNF-альфа, которые являются селективными в отношении TNFR2, такие как мутант TNF80. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать иммуноглобулин нерелевантной специфичности, и на С-концевой части тяжелых цепей могут находиться молекулы TNF-альфа и в частности мутантные молекулы TNF-альфа, такие как TNF80. В одном из вариантов осуществления тяжелые цепи Fc или нерелевантного антитела могут содержать в качестве части того же полипептида TNF-альфа и в частности мутант TNF80. В одном из вариантов осуществления они могут содержать одноцепочечный полипептид, содержащий три полипептида TNF-альфа и в частности три полипептида TNF80. В другом варианте осуществления перед частью TNF-альфа полипептидов тяжелые цепи могут

содержать пептид TNC или его вариант. В следующем предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать Fc область, которая вместо вариабельных областей содержит две части тяжелой цепи области Fc как часть одного полипептида.

Примером предпочтительной связывающей молекулы, содержащей лиганд TNF, является Fc(DANA)-TNC-TNF80, как показано на фиг. 24, где DANA означает тяжелые цепи Fc областей, содержащих мутации D265A и N297A, и TNC означает пептидную последовательность домена тримеризации тенасцина. Следовательно, предпочтительная связывающая молекула по настоящему изобретению содержит три Fc области, где каждая тяжелая цепь имеет DANA-модификации D265A и N297A. В следующем предпочтительном варианте осуществления каждый из этих полипептидов тяжелой цепи содержит пептид TNC. В следующем предпочтительном варианте осуществления каждый полипептид тяжелой цепи каждой области Fc содержит пептидную последовательность TNC, за которой следует последовательность TNF-альфа и в частности последовательность TNF80.

Еще одной предпочтительной связывающей молекулой по настоящему изобретению является Fc(DANA)-TNF80, которая содержит три области Fc, где каждый полипептид тяжелой цепи содержит DANA-модификации D265A и N297A и TNF-альфа, в частности последовательность TNF80. Настоящее изобретение также предлагает в качестве связывающих молекул молекулы форматов Fc-TNC-TNF80 и Fc-TNF80, показанные на фиг. 24.

В другом варианте осуществления предлагается связывающая молекула, которая специфически связывается с TNFR2, но не с TNFR1, причем связывающая молекула представляет собой Fc γ R-независимый агонист TNFR2, имеет TNFR2-связывающую валентность, равную по меньшей мере двум, и содержит полипептиды, содержащие мутантный TNF-альфа, которые связывают TNFR2, но не TNFR1, и пептидную последовательность тенасцина, которая олигомеризует полипептиды. В одном из вариантов осуществления такая связывающая молекула не включает последовательность антитела. В одном из вариантов осуществления молекула содержит полипептиды, каждый из которых содержит мутантную последовательность TNF-альфа с пептидом тенасцина, например, любой из полипептидов тенасцина, раскрытых в настоящем описании. В одном из предпочтительных вариантов осуществления пептидные последовательности тенасцина приводят к олигомеризации таких полипептидов. В одном из вариантов осуществления мутантный TNF-альфа имеет модификации 143N/145R, приводящие к селективному связыванию TNFR2, а не TNFR1. Такой мутант TNF также может называться TNF80.

Связывающие молекулы с более чем одной специфичностью к TNFR2

В предпочтительном варианте осуществления все антигенсвязывающие сайты TNFR2-специфической связывающей молекулы обладают одинаковой TNFR2-специфичностью. В частности, все они могут иметь одинаковую аминокислотную последовательность и, следовательно, связывать один и тот же эпитоп. В одном из

вариантов осуществления все антигенсвязывающие сайты являются специфичными к одному и тому же эпитопу TNFR2. В другом варианте осуществления все TNFR2-антигенсвязывающие сайты способны перекрестно блокировать связывание других TNFR2-антигенсвязывающих сайтов с TNFR2.

Однако в другом предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула может иметь антигенсвязывающие сайты, которые связывают TNFR2, но по меньшей мере два из этих антигенсвязывающих сайтов обладают разной TNFR2-специфичностью. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула содержит по меньшей мере два TNFR2-антигенсвязывающих сайта, которые связываются с разными эпитопами одной и той же молекулы TNFR2. В другом варианте осуществления по меньшей мере два антигенсвязывающих сайта не блокируют перекрестное связывание друг друга с TNFR2. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула является бипаратопной для TNFR2 в том смысле, что она содержит антигенсвязывающие сайты, распознающие по меньшей мере два разных эпитопа TNFR2. В другом варианте осуществления антигенсвязывающие сайты обеспечивают по меньшей мере две, три, четыре, пять или шесть разных специфичностей к TNFR2. В одном из вариантов осуществления все TNFR2-специфические антигенсвязывающие сайты связывающей молекулы обладают разной специфичностью к TNFR2.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула представляет собой шестивалентную связывающую молекулу, содержащую два полипептида, где каждый отдельный полипептид содержит по меньшей мере два разных антигенсвязывающих сайта с разной специфичностью к TNFR2. В одном из вариантов осуществления каждый полипептид обладает тремя такими специфичностями. В одном из вариантов осуществления, хотя два полипептида обладают разной специфичностью к одному и тому же полипептиду, эти два полипептида идентичны. В другом варианте осуществления два полипептида не являются идентичными, причем каждый полипептид имеет три разные специфичности к TNFR2, обеспечивая в общей сложности шесть разных специфичностей к TNFR2.

В другом варианте осуществления, где антитело содержит антигенсвязывающие сайты «северной» и «южной» ориентации, антигенсвязывающие сайты «северной» и «южной» ориентации обеспечивают разные, отличающиеся одна от другой, специфичности к TNFR2. Например, в одном из вариантов осуществления любая из тетравалентных антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании, может содержать два антигенсвязывающих сайта с одной специфичностью и два с другой специфичностью к TNFR2. В одном из вариантов осуществления два scFv, ориентированные на «юг», могут иметь специфичность к TNFR2, отличную от специфичности антигенсвязывающих сайтов, ориентированных на «север».

sdB, SdAb и связывающие домены VHH

В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению содержит однодоменные связывающие агенты

(sdB). Однодоменные связывающие агенты включают, например, не сконструированные Ig белковые каркасы, такие как дарпины, аффитела, аднектины, антикалиновые белки или пептиды и т.п. Таким образом, везде, где упоминаются sdB, sdAb, HCAb и VHH, можно также использовать дарпин, аффитело, аднектин, антикалин или пептид, который способен связывать TNFR2, и термин sdB охватывает такие используемые связывающие агенты.

Примеры связывающих агентов с одним связывающим доменом (sdB) включают, в частности, однодоменные антитела (sdAb), например, антитела только с тяжелой цепью (HCAb), особенно антитела с доменом VHH. Использование антигенсвязывающих доменов VHH является особенно предпочтительным вариантом осуществления. Однодоменное антитело (sdAb) представляет собой фрагмент антитела, состоящий из одного мономерного переменного домена антитела. Как и целое антитело, sdAb способно избирательно связываться со специфическим антигеном. sdAb может представлять собой фрагменты антител, которые можно сконструировать из одиночных мономерных переменных доменов либо антитела тяжелой цепи верблюдовых (VHH), либо IgNAR хрящевых рыб (VNAR), либо можно получить из камелизованных человеческих антител. Могут быть использованы любые такие sdAb. Особенно предпочтительными sdAb являются домены VHH. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать по меньшей мере два домена sdAb. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула может содержать по меньшей мере два домена sdAb в одном и том же полипептиде. В предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению может представлять собой молекулу, которая содержит однодоменное антитело или однодоменные антитела, где общая валентность связывающей молекулы равна по меньшей мере двум. Например, антитело по настоящему изобретению может содержать два таких однодоменных антитела, соединенных вместе как часть общего антитела.

В другом предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать связывающие домены VHH в виде sdAb. Можно использовать SdAb из таких организмов, как верблюдовые, акулы и другие хрящевые рыбы, которые продуцируют антитела только с тяжелыми цепями. Однодоменные переменные фрагменты этих антител, содержащих только тяжелые цепи, называются VHH, или нанотелами, или sdAb. VHH сохраняют складку иммуноглобулина, общую для антител, используя три гиперпеременные петли, CDR1, CDR2 и CDR3, для связывания со своими мишенями. Фрагмент VHH (например, NANOBODY®) представляет собой рекомбинантный антигенспецифический однодоменный переменный фрагмент, полученный из верблюжьих антител с тяжелыми цепями.

Поскольку связывающая молекула по настоящему изобретению предпочтительно имеет валентность для TNFR2, равную по меньшей мере двум, в одном из вариантов осуществления, где связывающая молекула содержит фрагменты VHH, она будет содержать по меньшей мере два таких фрагмента VHH. Отдельные фрагменты VHH могут

быть соединены вместе, например, с помощью линкера и, следовательно, в одном из вариантов осуществления они могут быть экспрессированы в виде одного полипептида, который в целом содержит по меньшей мере два фрагмента VHH, каждый из которых способен специфически связываться с TNFR2. Фрагменты VHH не содержат область Fc, и в одном из вариантов осуществления, где фрагменты VHH присутствуют как часть связывающей молекулы по настоящему изобретению, связывающая молекула не содержит область Fc и поэтому не связывается с рецепторами Fc. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет содержать или по меньшей мере будет содержать три, четыре, пять, шесть или более TNFR2-специфических фрагментов VHH. В другом варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет содержать антитело с одним доменом VHH. В особенно предпочтительном варианте осуществления антитело будет содержать по меньшей мере четыре sdAb. В особенно предпочтительном варианте осуществления антитело будет содержать четыре sdAb. В особенно предпочтительном варианте осуществления антитело будет содержать по меньшей мере шесть sdAb. В особенно предпочтительном варианте осуществления антитело будет содержать шесть sdAb. В следующем предпочтительном варианте осуществления sdAb представляют собой VHH. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула будет содержать такое количество sdBr.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет содержать область Fc, но не будет иметь область CH1, и будет способна связывать TNFR2 без участия легкой цепи. В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет содержать один или более VHH, область Fc и будет способна связывать TNFR2 без участия легкой цепи. В другом варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет содержать один или более VHH и домены тримеризации TNC или область Fc, или и то, и другое, как показано на некоторых структурах, приведенных на фиг. 41.

Константные области антитела и функции области Fc

В предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению не связывается с рецепторами Fc, в частности с рецепторами FcγR. В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой антитело, и она не связывается с рецепторами Fc либо потому, что она не содержит область Fc, либо, альтернативно, потому что она имеет область Fc, модифицированную таким образом, что эта область не связывается с рецепторами Fc. В контексте настоящего изобретения домен Fc обычно относится к $-(CH_2CH_3)_2$, если из контекста в явном виде не следует иное, где CH2 представляет собой домен CH2 тяжелой цепи, CH3 представляет собой домен CH3 тяжелой цепи, и имеется два CH2CH3, по одному от каждой тяжелой цепи. В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению не содержит фрагмент -

CH₂CH₃. В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению не содержит домен CH₂. В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению не содержит домен CH₃.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению связывается с гамма-рецептором Fc, но в существенно меньшей степени по сравнению со связыванием с FcγR идентичного антитела, содержащего немодифицированную область Fc (например, снижение связывания с FcγR на по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% относительно связывания с FcγR идентичного антитела, содержащего немодифицированную область Fc, согласно измерениям). Однако в особенно предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула вообще не демонстрирует детектируемого связывания с FcγR. Связывание, включая наличие или отсутствие связывания, можно определить многочисленными методами, известными в данной области техники, например, помимо прочего, равновесными методами (например, с помощью иммуноферментного анализа (ELISA); KinExA, Rathanaswami et al. *Analytical Biochemistry*, Vol.373:52-60, 2008; или радиоиммуноанализа (RIA)), или анализа поверхностного плазмонного резонанса, или с помощью другого механизма кинетического анализа (например, анализ BIACORE™ или анализа Octet™ (forteBIO)), и другими методами, такими как анализы непрямого связывания, анализы конкурентного связывания, флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET), гель-электрофорез и хроматография (например, гель-фильтрация).

В одном из вариантов осуществления, где присутствует область Fc, используемая область Fc мутирована, в частности, включает мутацию, раскрытую в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления мутация направлена на устранение связывания с рецепторами Fc и в частности с FcγR. В одном из предпочтительных вариантов осуществления антитело по изобретению мутировано таким образом, что оно не связывается с рецепторами Fc.

В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению может содержать область Fc, но не варибельные области, которые обычно встречаются в природных четырехцепочечных антителах. В одном из предпочтительных вариантов осуществления такие области Fc могут содержать другие последовательности как часть полипептидов, содержащих тяжелые цепи области Fc, в частности пептид TNC и/или TNF-альфа (в частности, TNF80) и предпочтительно оба, в частности в C-концевой части полипептида.

В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению может содержать агликозильный IgG, например, для снижения функции Fc и, в частности, получения практически Fc-нулевого фенотипа. В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению имеет модификацию N297 и в частности N297A. В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению имеет модификации F243 и/или F244, в частности те, которые означают, что антитело содержит агликозильный IgG. В одном из

вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению может содержать модификации F243A и/или F244A тяжелой цепи. В другом варианте осуществления один или более из F241, F243, V262 и V264 могут быть модифицированы, в частности, до аминокислот, которые влияют на гликозилирование. В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению может иметь модификации F241A, F243A, V262E и V264E. Такие модификации обсуждаются в работе Yu et al (2013) 135(26):9723-9732, которая включена в настоящее описание во всей своей полноте в качестве ссылки, особенно в отношении обсуждаемых в ней модификаций. Такие модификации позволяют модулировать, например, связывание рецептора Fc. Может присутствовать модификация, которая влияет на гликозилирование антитела. Кроме того, антитело по изобретению может быть получено в типе клеток, который влияет на гликозилирование, что является дополнительным подходом к инженерии сахара. В одном из вариантов осуществления фукозилирование, сиалирование, галактозилирование и/или маннозилирование антитела по настоящему изобретению можно изменить либо путем модификации последовательности, либо за счет типа клетки, используемой для продуцирования антитела.

В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению имеет модификации в положении 297 и/или 299. Например, в одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению содержит модификацию N297A в своих тяжелых цепях, предпочтительно N297Q или мутацию Ser или Thr в положении 299 на другие остатки. В одном из вариантов осуществления оно имеет обе эти модификации.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению и, в частности антитело, содержит две разные тяжелые цепи, содержащие модификации, которые обеспечивают предпочтительную ассоциацию этих разных тяжелых цепей по сравнению с тяжелыми цепями, которые ассоциируются с идентичными тяжелыми цепями. Такой подход может быть, в частности, использован там, где антитело обладает более чем одной специфичностью к TNFR2, например, когда антитело связывается с двумя разными эпитопами TNFR2. В одном из вариантов осуществления две разные тяжелые цепи содержат мутации типа «выступ-во-впадину». В некоторых аспектах мутации типа «выступ-во-впадину» представляют собой мутацию T366W в одной константной области тяжелой цепи и мутацию T366S, L368A и Y407V в другом домене. В некоторых аспектах модификации включают мутации заряженных пар. В некоторых аспектах мутации заряженной пары представляют собой мутацию T366K в одной из константных областей тяжелой цепи и соответствующую мутацию L351D в другом домене. В альтернативном варианте осуществления вместо модификаций, которые приводят к предпочтительному спариванию разных тяжелых цепей, тяжелые цепи содержат модификации, обеспечивающие предпочтительную очистку гетеродимера, содержащего две тяжелые цепи, от гомодимеров, содержащих только один тип тяжелой цепи. Например, модификации могут изменить сродство к белку A, при этом одна тяжелая цепь все еще будет способна связываться с белком A, в то время как модифицированная

тяжелая цепь не будет связываться с белком А, а это означает, что гетеродимеры с двумя разными тяжелыми цепями могут быть очищены на основе их сродства к белку А.

В других вариантах осуществления тяжелая и легкая цепи могут содержать модификации, которые изменяют образование дисульфидного мостика между ними или приводят к его отсутствию. В различных вариантах осуществления модификации включают мутации, которые обеспечивают формирование искусственных дисульфидных мостиков между легкими и тяжелыми цепями. Как раскрыто в настоящем описании, «искусственные дисульфидные мостики» представляют собой мутации, которые обеспечивают неэндогенные аминокислоты цистеины в двух или более полипептидах, благодаря чему при объединении двух или более доменов образуется ненативная дисульфидная связь. Искусственные дисульфидные мостики более подробно описаны в работе Merchant et al. (Nature Biotech (1998) 16:677-681), содержание которой включено в настоящее описание во всей своей полноте в качестве ссылки. В конкретном варианте осуществления мутации, которые приводят к образованию искусственных дисульфидных мостиков, представляют собой мутацию K392C в одном из первого или второго домена СНЗ и D399C в другом домене СНЗ. В предпочтительном варианте осуществления мутации, которые приводят к образованию искусственных дисульфидных мостиков, представляют собой мутацию S354C в одном из первого или второго домена СНЗ и Y349C в другом домене СНЗ. В другом предпочтительном варианте осуществления мутации, которые приводят к образованию искусственных дисульфидных мостиков, представляют собой мутацию 447C как в первом, так и во втором домене СНЗ, которая обеспечивается за счет удлинения С-конца домена СНЗ, включающего трипептидную последовательность KSC.

В одном из вариантов осуществления связывающие молекулы по настоящему изобретению могут содержать модификации, которые изменяют период полувыведения связывающей молекулы из сыворотки. Следовательно, в другом варианте осуществления антитело по настоящему изобретению имеет модификацию(и) области Fc, которая(ые) изменяет(ют) период полувыведения антитела. Возможно присутствие таких модификаций, а также модификаций, которые изменяют функции Fc. В одном из предпочтительных вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению имеет модификацию(и), которая(ые) изменяет(ют) период полувыведения антитела из сыворотки. В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению имеет модификацию(и), которая(ые) приводит(ят) к изменению периода полувыведения антитела из сыворотки по сравнению с антителом, лишенным таких модификаций. В одном из вариантов осуществления модификации приводят к увеличению периода полувыведения из сыворотки. В другом варианте осуществления они приводят к уменьшению периода полувыведения из сыворотки. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению содержит одну или более модификаций, которые в совокупности приводят как к сайленсингу области Fc, так и к уменьшению периода полувыведения антитела из

сыворотки по сравнению с антителом, лишенным таких модификаций.

В особенно предпочтительном варианте осуществления антитело имеет константную область с незначительными эффекторными функциями или вообще без них, например, антитело, полученное из одобренного FDA антитела дурвалумаба с модификациями Fc L234F/L235E/P331S. Модификации Fc в дурвалумабе помогают устранить функции Fc, поэтому использование константных областей легкой и тяжелой цепи или дурвалумаба является особенно эффективным способом обеспечения константной области с желаемым отсутствием функций Fc. Поскольку дурвалумаб одобрен для применения в клинике, это также является причиной того, почему использование его константных областей является особенно предпочтительным вариантом осуществления. Следовательно, в одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула содержит область Fc дурвалумаба.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления, где связывающая молекула содержит связывающие домены V_HH, полипептиды, содержащие домены V_HH, дополнительно содержат домены C_H2 и C_H2 дурвалумаба. В следующем предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула содержит тяжелые и легкие цепи, где антитело содержит константные области легкой и тяжелой цепи дурвалумаба. В любом из вариантов осуществления, где связывающая молекула содержит последовательности константной области, полученные из дурвалумаба, они могут содержать любую из модификаций константной области, указанных в настоящем описании. Дурвалумаб имеет остов человеческого IgG1. Следовательно, в следующем предпочтительном варианте осуществления, где связывающая молекула содержит константную область, она может содержать область человеческого IgG. В предпочтительном варианте осуществления она может содержать область человеческого IgG1. Такие области могут быть модифицированы для устранения функции Fc. В одном из вариантов осуществления константные области могут быть модифицированы для удаления области C_H1, особенно если антигенсвязывающие домены представляют собой sdBr.

Последовательности константных областей тяжелой и легкой цепей дурвалумаба представлены соответственно как SEQ ID NO: 135 и 136. В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению содержит такие переменные последовательности легкой и тяжелой цепей или вариант такой последовательности. В одном из предпочтительных вариантов осуществления вариант последовательности или последовательностей является идентичным соответствующей специфической последовательности на по меньшей мере 90%. В другом варианте осуществления вариант является идентичным на по меньшей мере 95%. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению содержит последовательности константных областей тяжелой и легкой цепей SEQ ID No: 135 и 136, но с одной или более модификациями последовательности константной области, указанными в настоящем описании. В одном из предпочтительных вариантов

осуществления такие константные области тяжелой и легкой цепей используются в четырехвалентных связывающих молекулах, представленных в настоящем описании.

Вариант константной области тяжелой цепи последовательности дурвалумаба с удаленной областью CH1 представлен как SEQ ID NO: 316. В одном из предпочтительных вариантов осуществления используется такая константная область, где связывающая молекула содержит антигенсвязывающие сайты на основе sdAb, предпочтительно с антигенсвязывающими сайтами VHH. Такая последовательность может быть использована, но с одной или более другими модификациями константной области, указанными в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать последовательность SEQ ID NO: 316 или ее вариант, идентичный на по меньшей мере 90%. В другом варианте осуществления вариант является идентичным на по меньшей мере 95%. В варианте в таких вариантах осуществления по-прежнему будет удален CH1. Такие константные области тяжелой цепи с удаленным CH1 предпочтительно используются в одном из вариантов осуществления, где по меньшей мере один из антигенсвязывающих сайтов представляет собой TNFR2-специфический антигенсвязывающий домен VHH.

Иллюстративные предпочтительные TNFR2-связывающие молекулы с высокой валентностью

В предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению имеет валентность для TNFR2, равную по меньшей мере четырем. В одном из вариантов осуществления валентность связывающей молекулы для TNFR2 составляет от четырех до девяти. Не желая быть ограниченными какой-либо конкретной теорией, считается, что более высокая плотность TNFR2-связывающих сайтов в ограниченном пространстве может способствовать активности агониста TNFR2. Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что известные антитела-антагонисты TNFR2 можно преобразовывать в молекулы-агонисты TNFR2 путем переформатирования антител в раскрытые в настоящем описании форматы, особенно в антитела с валентностью четыре или выше.

В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления предлагаемая связывающая молекула является четырехвалентной для TNFR2. Примеры четырехвалентных форматов представлены в разделе «Примеры» настоящей заявки. Настоящее изобретение предлагает любой из этих форматов, содержащий один из раскрытых в настоящем описании специфических связывающих доменов. Примеры предпочтительных форматов включают: scFv-IgG (см. фиг. 1); IgG-NC:scFv (см. фиг. 7); IgG-LC:scFv (см. фиг. 7). IgG-NC:scFv представляет собой особенно предпочтительный формат. IgG-LC:scFv также представляет собой особенно предпочтительный вариант осуществления. В одном из вариантов осуществления группы scFv присоединены в таких форматах к тяжелой или легкой цепи с помощью линкера. Следовательно, в одном из предпочтительных вариантов осуществления линкер G4S используется для присоединения scFv. В другом варианте осуществления антитело может содержать

линкер, разделяющий по меньшей мере два связывающих домена. Примеры предпочтительных четырехвалентных форматов проиллюстрированы на фиг. 29. Конструкции, показанные на фиг. 29, содержат связывающий домен С4, который представляет собой предпочтительный связывающий домен. Однако также предусмотрены форматы, изображенные на фиг. 29, в которых области VH и VL каждого связывающего сайта представляют собой любой из вариантов последовательностей С4, представленных в настоящем описании. Также могут использоваться показанные на фиг. 29 форматы, когда связывающая молекула представляет собой молекулу, связывающие сайты которой содержат любой из наборов из шести CDR, представленных в настоящем описании.

Еще одним особенно предпочтительным форматом связывающей молекулы по настоящему изобретению является шестивалентная связывающая молекула, в частности, имеющая шесть специфических TNFR2-связывающих сайтов. Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что связывающие молекулы в гексамерном формате демонстрируют меньшую вариативность агонистической активности TNFR2, когда для создания идентичной в остальном шестивалентной молекулы используются разные TNFR2 антигенсвязывающие домены.

Иллюстративные шестивалентные форматы включают любой из тех, которые используются в примерах или фигурах настоящей заявки. В одном из предпочтительных вариантов осуществления шестивалентное антитело содержит по меньшей мере два TNFR2-специфических связывающих сайта на одном и том же полипептиде. В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления шестивалентное антитело содержит два полипептида, где каждый полипептид имеет три TNFR2-связывающих сайта, в частности три VHH, в частности конкретные VHH, указанные в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления все антигенсвязывающие сайты VHH в шестивалентной связывающей молекуле являются одинаковыми. В другом варианте осуществления связывающая молекула может иметь по меньшей мере два антигенсвязывающих сайта, которые обладают разной специфичностью к TNFR2, например, которые связываются с разными эпитопами. В другом варианте осуществления все TNFR2-специфические антигенсвязывающие сайты связывающей молекулы могут иметь разные специфичности к TNFR2, т.е. связываться с разными эпитопами. В другом варианте осуществления антигенсвязывающие сайты могут различаться в том смысле, что они не блокируют друг друга при связывании с TNFR2.

Примеры предпочтительных форматов шестивалентных связывающих молекул включают форматы, описанные в примерах и представленные на фигурах настоящей заявки. В тех случаях, когда на фигуре или в примере описан формат антитела с конкретным TNFR2-связывающим доменом, настоящее изобретение также относится к антителу того же формата, но с одним из других TNFR2-связывающих доменов, раскрытых в настоящем описании. В особенно предпочтительном варианте

осуществления TNFR2-связывающие домены представляют собой домены VHH. В предпочтительном варианте осуществления используемый домен VHH представляет собой один из специфических доменов VHH, раскрытых в настоящем описании, или его вариант. В одном из предпочтительных вариантов связывающая молекула находится в одном из шестивалентных форматов, изображенных на фиг. 40. Другие предпочтительные форматы и специфические последовательности представлены на фиг. 54 и 55. Особенно предпочтительный формат включает два полипептида, каждый из которых содержит три домена VHH. В другом особенно предпочтительном формате связывающая молекула имеет формат 3xVHH-Fc. Например, особенно предпочтительным форматом является 3xVHH-Fc. Еще одним предпочтительным форматом является 3xVHH-Fc(DANA). Особенно предпочтительным доменом VHH для использования в связывающей молекуле по настоящему изобретению является C188. Еще одним предпочтительным доменом VHH является один из специфических вариантов C188, раскрытых в настоящем описании. Следовательно, 3xVHH:C188-Fc является особенно предпочтительной связывающей молекулой. Еще одной предпочтительной связывающей молекулой является 3xVHH:C188-Fc(DANA). Альтернативно, в любом из этих форматов C188 может быть заменен одним из других доменов VHH, раскрытых в настоящем описании.

В другом особенно предпочтительном варианте осуществления, где шестивалентная связывающая молекула содержит область Fc, она будет содержать область Fc антитела дурвалумаба. В альтернативном варианте осуществления связывающая молекула будет содержать область Fc дурвалумаба, но с любой областью Fc, представленной в настоящем описании.

Генерация и скрининг связывающих молекул

В одном из вариантов осуществления связывающие молекулы, в частности антитела, по настоящему изобретению мутированы для обеспечения улучшенного сродства к целевому антигену или антигенам и в частности к TNFR2. Такие варианты можно получить с помощью ряда протоколов созревания аффинности, включая мутацию CDR (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), перестановку цепей (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), использование штаммы-мутаторы *E.coli* (Low et al. J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), перестановку ДНК (Patten et al Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), фаговый дисплей (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) и половую ПЦР (Cramer et al. Nature, 391, 288-291, 1998). Эти методы созревания аффинности обсуждаются в работе Vaughan et al (см. выше). Связывающие домены для использования в настоящем изобретении могут быть созданы любым подходящим способом, известным в данной области техники, например, CDR могут быть получены из антител, не принадлежащих человеку, включая коммерчески доступные антитела, и могут быть привиты в человеческие каркасы, или, альтернативно, могут быть получены химерные антитела с не принадлежащими человеку переменными областями и человеческими константными областями и т.д. Поскольку антитела по настоящему изобретению могут не иметь природного формата, такой скрининг может использоваться

для идентификации антигенсвязывающих участков антитела с желательными свойствами для связывания TNFR2, а затем переформатированы в один из форматов, раскрытых в настоящем описании.

Специалист в данной области может создать антитела для использования в антителах по изобретению, используя любой подходящий метод, известный в данной области. Антигенные полипептиды для использования при создании антител, например, для использования для иммунизации хозяина или для использования в пэннинге, например, в фаговом дисплее, могут быть получены способами, хорошо известными в данной области техники, из генетически сконструированных клеток-хозяев, содержащих системы экспрессии, или они могут быть извлечены из природных биологических источников. В настоящей заявке термин «полипептиды» включает пептиды, полипептиды и белки, которые используются взаимозаменяемо, если не указано иное. В некоторых случаях антигенный полипептид может быть частью более крупного белка, такого как слитый белок, например, слитый с аффинной меткой или т.п. В одном из вариантов осуществления хозяин может быть иммунизирован трансфицированной TNFR2 клеткой, например, экспрессирующей TNFR2 на своей поверхности.

Когда необходима иммунизация животного антитела, генерируемые против антигенного полипептида, могут быть получены путем введения полипептидов животному, предпочтительно животному, отличному от человека, с помощью хорошо известных и рутинных протоколов, см., например, *Handbook of Experimental Immunology*, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986). Иммунизировать можно многих теплокровных животных, таких как кролики, мыши, крысы, овцы, коровы, верблюды или свиньи. Однако, как правило, наиболее подходящими являются мыши, кролики, свиньи и крысы. Моноклональные антитела могут быть получены любым методом, известным в данной области, таким как метод гибридомы (Kohler & Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497), метод триомы, метод гибридомы человеческих В-клеток (Kozbor et al 1983, *Immunology Today*, 4:72) и метод EBV-гибридомы (Cole et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, стр. 77-96, Alan R Liss, Inc., 1985). Антитела также могут быть получены методами, в которых используются антитела к одному лимфоциту, путем клонирования и экспрессии кДНК вариабельной области иммуноглобулина, полученной из отдельных лимфоцитов, выбранных для продуцирования специфических антител, например, методами, описанными Babcock, J. et al 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(15): 7843-78481; W092/02551; W02004/051268 и W02004/106377. Антитела для использования в настоящем изобретении также можно получить различными методами фагового дисплея, известными в данной области, включая методы, раскрытые Brinkman et al. (в *J. Immunol. Methods*, 1995, 182: 41-50), Ames et al. (*J. Immunol. Methods*, 1995, 184:177-186), Kettleborough et al. (*Eur. J. Immunol.* 1994, 24:952-958), Persic et al. (*Джин*, 1997, 187, 9-18), Burton et al. (*Advances in Immunology*, 1994, 57:191-280) и W090/02809; W091/10737; W092/01047; W092/18619; W093/11236; W095/15982; W095/20401; и US 5698426; 5223409; 5403484; 5580717;

5427908; 5750753; 5821047; 5571698; 5427908; 5516637; 5780225; 5658727; 5733743; 5969108 и WO20011/30305.

В одном из примеров антитело по настоящему изобретению является полностью человеческим, в частности, один или более переменных доменов являются полностью человеческими. Полностью человеческие молекулы представляют собой молекулы, в которых все переменные области и константные области (если они присутствуют) как тяжелой, так и легкой цепей имеют человеческое происхождение или по существу идентичны последовательностям человеческого происхождения не обязательно из одного и того же антитела. Примеры полностью человеческих антител могут включать антитела, полученные, например, методами фагового дисплея, описанными выше, и антитела, продуцируемые мышами, у которых переменная область мышиногго иммуноглобулина и, необязательно, гены константной области заменены человеческими аналогами, например, как описано в общих чертах в EP0546073, US5545806, US5569825, US5625126, US5633425, US5661016, US5770429, EP 0438474 и EP0463151, каждый из которых включен в качестве ссылки.

В одном из примеров антигенсвязывающие сайты и в частности переменные области антител по изобретению являются гуманизированными. В контексте настоящего описания гуманизированное (включающее антитела с привитыми CDR) относится к молекулам, имеющим одну или более определяющих комплементарность (CDR) областей из видов, отличных от человека, и каркасную область из молекулы человеческого иммуноглобулина (см., например, патент США 5585089; WO91/09967, который включен посредством ссылки). Следует иметь в виду, что может возникнуть необходимость в переносе только определяющих специфичность остатков CDR, а не всю CDR (см., например, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). Однако в предпочтительном варианте осуществления трансплантируют всю CDR или несколько CDR. Гуманизированные антитела могут дополнительно содержать один или более остатков каркасной области, происходящей от видов, отличных от человека, от которых были получены CDR. В настоящем документе термин «молекула гуманизированного антитела» относится к молекуле антитела, в которой тяжелая и/или легкая цепь содержит одну или более CDR (включая, при желании, одну или более модифицированных CDR) от донорного антитела (например, мышиногго моноклонального антитела), привитые на каркас переменной области тяжелой и/или легкой цепи акцепторного антитела (например, человеческого антитела). Обзор см. в Vaughan et al., Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. В одном из вариантов осуществления вместо переноса всей CDR в каркас человеческого антитела переносят только один или более определяющих специфичность остатков из любой CDR, раскрытого в настоящем описании выше (см., например, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). В одном из вариантов осуществления в каркас человеческого антитела переносятся только определяющие специфичность остатки из одной или более CDR, раскрытых в настоящем описании выше. В другом варианте осуществления в каркас человеческого антитела переносятся только определяющие специфичность остатки из каждой из CDR,

раскрытых в настоящем описании выше.

При трансплантации CDR или определяющих специфичность остатков можно использовать любую подходящую каркасную последовательность акцепторной вариабельной области с учетом класса/типа донорного антитела, из которого получены CDR, включая каркасные области мыши, примата и человека. Соответственно, гуманизованное антитело по настоящему изобретению имеет вариабельный домен, содержащий акцепторные каркасные области человека, а также одну или более CDR, представленных в настоящем описании. Примерами человеческих каркасов, которые можно использовать в настоящем изобретении, являются KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY и POM (Kabat et al., выше). Например, KOL и NEWM можно использовать для тяжелой цепи, REI можно использовать для легкой цепи, а EU, LAY и POM можно использовать как для тяжелой цепи, так и для легкой цепи. Альтернативно можно использовать последовательности зародышевой линии человека; они доступны по адресу: <http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/list2.php>.

В молекуле гуманизованного антитела по настоящему изобретению акцепторные тяжелая и легкая цепи не обязательно должны происходить из одного и того же антитела и, при желании, могут содержать составные цепи, имеющие каркасные области, полученные из разных цепей. Каркасные области не обязательно должны иметь точно такую же последовательность, как последовательность акцепторного антитела. Например, необычные остатки могут быть заменены на более часто встречающиеся остатки для этого класса или типа акцепторной цепи. Альтернативно, выбранные остатки в акцепторных каркасных областях могут быть изменены для приведения их в соответствие остатку, находящемуся в том же положении в донорном антителе (см. Reichmann et al. 1998, Nature, 332, 323-324). Такие изменения должны быть сведены к минимуму, необходимому для восстановления сродства донорного антитела. Протокол выбора остатков в областях акцепторного каркаса, изменение которых возможно потребуется, изложен в WO 91/09967. Производные каркасов могут иметь 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот, замененных на альтернативную аминокислоту, например, донорный остаток. Донорные остатки представляют собой остатки донорного антитела, т.е. антитела, из которого первоначально были получены CDR, в частности, остаток в соответствующем месте, заимствованный из донорной последовательности. Донорные остатки могут быть заменены подходящим остатком, полученным из каркаса человеческого рецептора (акцепторные остатки).

Остатки в вариабельных доменах антитела традиционно нумеруют в соответствии с системой, разработанной Kabat et al. Эта система изложена Kabat et al., 1987, в Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (hereafter "Kabat et al. (supra)"). Эта система нумерации используется в настоящем описании, если не указано иное. Обозначения остатков по Kabat не всегда напрямую соответствуют линейной нумерации аминокислотных остатков. Фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество или

дополнительные аминокислоты, чем в строгой нумерации по Kabat, что соответствует укорочению или вставке в структурном компоненте, будь то каркасная или определяющая комплементарность (CDR) область базовой структуры переменного домена. Правильная нумерация остатков по Kabat может быть определена для данного антитела путем выравнивания гомологичных остатков в последовательности антитела относительно «стандартной» последовательности, пронумерованной по Kabat. Согласно системе нумерации Kabat CDR переменного домена тяжелой цепи расположены в остатках 31-35 (CDR-H1), остатках 50-65 (CDR-H2) и остатках 95-102 (CDR-H3). Однако, согласно Chothia (Chothia, C. and Lesk, *AM J. Mol. Biol.*, 196, 901-917 (1987)), петля, эквивалентная CDR-H1, простирается от остатка 26 до остатка 32. Таким образом, если не указано иное, обозначение «CDR-H1», используемое в настоящем описании, предназначено для обозначения остатков с 26 по 35, как указано в комбинации системы нумерации Kabat и определено для топологической петли по Chothia. Согласно системе нумерации Kabat CDR переменного домена легкой цепи расположены в остатках 24-34 (CDR-L1), остатках 50-56 (CDR-L2) и остатках 89-97 (CDR-L3).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к последовательности антитела, раскрытой в настоящем описании. В другом случае оно относится к гуманизированным версиям таких антител.

Специалист в данной области способен протестировать варианты CDR или гуманизированные последовательности в любом подходящем анализе, например, раскрытом в настоящем описании, для подтверждения сохранения активности.

В одном из вариантов осуществления варианты связывающих молекул можно идентифицировать путем идентификации таких связывающих молекул, которые способны перекрестно блокировать специфические связывающие молекулы, указанные в настоящем описании. Перекрестно блокирующие антитела могут быть идентифицированы любым подходящим методом, известным в данной области, например, с помощью анализов с использованием конкурентного ELISA или VIAcore, где связывание перекрестно блокирующего антитела с антигеном (TNFR2) предотвращает связывание антитела по настоящему изобретению или наоборот. В таких анализах перекрестного блокирования в качестве мишени могут использоваться клетки, экспрессирующие TNFR2. В одном из вариантов осуществления для оценки связывания с клетками, экспрессирующими TNFR2, используется проточная цитометрия.

Могут быть использованы варианты связывающих молекул, у которых сохранены желаемые свойства связывающих молекул по настоящему изобретению. Следовательно, также предусмотрены связывающие молекулы и, в частности антитела, со степенями идентичности последовательностям специфических связывающих молекул по настоящему описанию. Идентичность последовательности может соответствовать всей длине полипептида или конкретным частям, например, только переменным областям или только последовательностям CDR. Степени идентичности и подобия можно легко вычислить (*Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New

York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991) с помощью программного обеспечения BLAST™, доступного на NCBI (Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. et al., 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656). Настоящее изобретение также относится к раскрытым в настоящем описании полипептидным последовательностям и последовательностям, которые подобны или идентичны им на по меньшей мере 80%, например, на 85% или более, например, на 90% или более, в частности на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. В одном из вариантов осуществления вариант является идентичным на по меньшей мере 80%. В другом варианте осуществления вариант является идентичным на по меньшей мере 90%. В другом варианте осуществления вариант является идентичным на по меньшей мере 95%. В одном из вариантов осуществления последовательность может быть идентичной по меньшей мере одной из специфических последовательностей, представленных в настоящем описании, на по меньшей мере 99%. Везде, где в настоящем описании упоминается вариант, он может иметь такую степень идентичности последовательности. Используемый в настоящем описании термин «идентичность» означает, что в любом конкретном положении в выровненных последовательностях определенный аминокислотный остаток в этих последовательностях является идентичным. Термин «подобие» в настоящем описании означает, что в любом конкретном положении в выровненных последовательностях аминокислотный остаток является остатком подобного типа в этих последовательностях. Например, лейцин может быть заменен изолейцином или валином. Другие аминокислоты, часто заменяемые друг другом, включают, без ограничения:

- фенилаланин, тирозин и триптофан (аминокислоты, имеющие ароматические боковые цепи);
- лизин, аргинин и гистидин (аминокислоты, имеющие основные боковые цепи);
- аспартат и глутамат (аминокислоты, имеющие кислые боковые цепи);
- аспарагин и глутамин (аминокислоты, имеющие амидные боковые цепи); и
- цистеин и метионин (аминокислоты, имеющие серосодержащие боковые цепи).

В одном из вариантов осуществления вариант может иметь от одного до десяти, например, одно, два, три, четыре, пять или до указанного количества изменений аминокислотной последовательности или, по меньшей мере, указанное количество или вплоть до указанного количества, при условии, что в описанных ранее форматах вариант все еще способен специфически связываться с TNFR2 и предпочтительно действовать как его агонист. В другом варианте осуществления антитело по настоящему изобретению может иметь по меньшей мере пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или

двенадцать изменений аминокислотных последовательностей по сравнению с CDR одного из специфических антител, раскрытых в настоящем описании, например, может иметь такое же количество изменений последовательностей шести CDR, составляющих антигенсвязывающий сайт. В одном из вариантов осуществления, где связывающая молекула содержит домен V_HH, домен V_HH может содержать набор из трех CDR, которые имеют вышеупомянутое количество изменений аминокислотной последовательности по сравнению со специфическим набором из трех CDR для V_HH, представленным в настоящем описании. Антитело по настоящему изобретению может иметь такое же количество изменений последовательностей CDR по сравнению со специфическим антителом, раскрытым в настоящем описании. Оно может иметь до указанного количества изменений последовательности. Оно может иметь по меньшей мере указанное количество изменений аминокислотной последовательности. Такие варианты молекул антител обычно сохраняют способность специфически связываться с TNFR2. Они также могут сохранять другие функции, указанные в настоящем описании.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления, где используется вариант пары переменных областей, они будут иметь последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична специфическим последовательностям, представленным в настоящем описании. В другом случае они будут идентичны на по меньшей мере 90%. В другом случае они будут идентичны на по меньшей мере 95%. В одном из вариантов осуществления они будут иметь не более десяти изменений аминокислотной последовательности. В другом варианте осуществления они будут иметь не более пяти изменений аминокислотной последовательности по сравнению со специфическими последовательностями. В одном из вариантов осуществления они будут иметь одно, два или три изменения в последовательности по сравнению со специфическими последовательностями. Варианты сохраняют способность связывать TNFR2. Например, варианты могут иметь по меньшей мере 50% связывающей активности специфической последовательности. В другом варианте осуществления они будут иметь по меньшей мере 75% связывающей активности. В одном из вариантов осуществления они будут иметь по меньшей мере такую же связывающую активность. В одном из вариантов осуществления изменения в последовательности будут происходить только в каркасных областях. В другом варианте осуществления изменения в последовательности будут представлять собой консервативные аминокислотные замены.

В вариантах осуществления, где идентифицирован набор CDR, могут использоваться наборы вариантов. Например, наборы, содержащие до десяти аминокислотных замен. Например, варианты, содержащие до пяти изменений аминокислотных последовательностей. В одном из вариантов осуществления может присутствовать одна, две или три аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления все замены в аминокислотной последовательности могут быть консервативными. Такие варианты CDR по-прежнему обеспечивают связывание антигенсвязывающего сайта с TNFR2. Например, варианты могут иметь по меньшей мере

50% связывающей активности специфической последовательности. В другом варианте осуществления они будут иметь по меньшей мере 75% связывающей активности. В одном из вариантов осуществления они будут иметь по меньшей мере такую же связывающую активность.

В одном из вариантов осуществления варианты последовательностей будут обладать способностью блокировать связывание связывающего сайта, содержащего специфические последовательности. В одном из вариантов осуществления вариант последовательности будет конкурировать за связывание. Примеры настоящей заявки включают иллюстративные анализы, которые можно использовать для измерения связывания и, следовательно, блокирования/конкуренции.

Следует иметь в виду, что этот аспект изобретения также относится к вариантам специфических связывающих молекул и в частности к антителам, включая гуманизированные версии и модифицированные версии, в том числе такие, в которых аминокислоты в CDR мутированы для удаления одного или более сайтов изомеризации, деаминарования, гликозилирования или цистеинового остатка, как описано выше.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения под идентичностью последовательности подразумевают полную длину двух сравниваемых последовательностей. Например, указанный уровень идентичности может быть приведен для последовательности большей длины, чем CDR. Это может быть длина варибельной области. Это может быть длина полноразмерной последовательности, например, полная длина более короткой из двух последовательностей.

Везде, где указана специфическая последовательность, можно использовать вариант, например, как определено выше или ниже. Могут быть использованы варианты CDR, а также варианты наборов CDR. Могут быть использованы варианты варибельных областей, а также пары таких варибельных областей. Могут быть использованы различные шарнирные области. Могут быть использованы варианты константных областей. В одном из вариантов осуществления вариант может представлять собой полноразмерный полипептид. В одном из вариантов осуществления такие варианты являются идентичными специфической последовательности на по меньшей мере 90%. В одном из вариантов осуществления они являются идентичными на по меньшей мере 95%. Вариант антигенсвязывающего сайта по-прежнему будет сохранять TNFR2-связывающую активность. Вариант связывающей молекулы обычно сохраняет активность агониста TNFR2. Вариант может сохранять любую из функций, указанных в настоящем описании. Предпочтительные варианты имеют замены от одной до десяти аминокислот. Другие варианты имеют замены от одной до пяти аминокислот. Предпочтительные варианты имеют одну, две или три аминокислотные замены. Другие варианты имеют только одну аминокислотную замену по сравнению со специфической последовательностью. В одном из вариантов осуществления вариант может представлять собой биоаналог связывающей молекулы, как указано в настоящем описании.

Дополнительные иллюстративные последовательности антител и CDR

Для иллюстрации изобретения и его преимуществ примеры настоящей заявки включают различные специфические молекулы антител, включая молекулы с лигандами TNF, входящими в состав их структуры. Изобретение не ограничено этими последовательностями. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула и в частности антитело по настоящему изобретению могут содержать специфические последовательности этих иллюстративных антител или их вариантов. Также предусмотрены варианты антител, включая варианты, определенные в настоящем описании, особенно те, которые специфически связываются с TNFR2, но не с TNFR1, независимым от FcγR способом.

В Таблице 3 настоящего изобретения представлены различные пары экспрессирующих конструкций, которые использовали для экспрессии конкретного антитела. В этой таблице также указаны полипептиды, экспрессируемые парами векторов. В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к связывающей молекуле, которая содержит одну из парных комбинаций полипептидов, представленных в таблице 3. Исходные клоны антител, использованные в примерах для создания антител, не основанных на VHH, представляют собой мышинные антитела. В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к связывающей молекуле, содержащей одну из парных комбинаций полипептидов, представленных в таблице 3, где сохранены последовательности мышинных CDR, но остальная часть антитела гуманизирована. В другом варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению содержит одну из парных комбинаций полипептидов, представленных в таблице, за исключением того, что все мышинные последовательности заменены последовательностью человеческого антитела, способного специфически связываться с TNFR2. В одном из вариантов осуществления используется связывающая молекула, которая перекрестно блокирует связывающую молекулу, полученную на основе парных комбинаций полипептидов, представленных в таблице 3. В другом варианте осуществления используется связывающая молекула, которая перекрестно реагирует со связывающей молекулой, полученной на основе парных комбинаций полипептидов, представленных в таблице 3. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению и, в частности антитело, будет содержать антигенсвязывающий сайт, содержащий набор из шести CDR из парных комбинаций тяжелой и легкой цепей, представленных в таблице 3 настоящей заявки. В другом варианте осуществления связывающая молекула и в частности антитело по настоящему изобретению будут содержать пару переменных областей легкой и тяжелой цепей из числа тех, которые представлены в таблице 3.

В таблице 4 настоящей заявки приведены SEQ ID NO для различных полипептидов, экспрессируемых векторами экспрессии, используемыми в примерах настоящей заявки. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один из этих полипептидов. В другом варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению

содержит по меньшей мере один из полипептидов, который был гуманизирован, с сохранением последовательностей мышинных CDR, в то время как остальные мышинные последовательности заменены человеческими. В предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула может содержать два полипептида или гуманизированные версии, в которых все, кроме мышинных CDR, заменены соответствующими последовательностями. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению и в частности антитело будут содержать антигенсвязывающий сайт, содержащий набор из шести CDR из парных комбинаций SEQ ID No тяжелой и легкой цепей, представленных в таблице 4 настоящей заявки. В другом варианте осуществления связывающая молекула и в частности антитело по настоящему изобретению будут содержать пару переменных областей легкой и тяжелой цепей из переменных областей с SEQ ID No, представленных в таблице 4.

В таблице 5 настоящей заявки приведены последовательности CDR из специфических антител, используемых в качестве отправной точки для форматов антител, представленных в настоящей заявке. Три CDR легкой цепи сгруппированы вместе, как и три CDR тяжелых цепей, причем CDR легкой и тяжелой цепей также сгруппированы вместе. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет содержать набор из трех CDR легкой цепи, как указано в таблице 5. В другом варианте осуществления она будет содержать набор из трех CDR тяжелой цепи, как указано в таблице 6, т.е. последовательности CDR как легкой, так и тяжелой цепей из одного из клонов или функциональных вариантов таких последовательностей. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению содержит CDR с более чем одной специфичностью, таким образом, связывающая молекула может, например, содержать два полипептида, которые в совокупности содержат шесть CDR одного из антител, как указано в таблице 5, но связывающая молекула может содержать дополнительный набор из шести CDR другого антитела, например, присутствующего в виде scFv, являющегося частью связывающей молекулы. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению является трипаратопной по отношению к TNFR2 и, таким образом, обладает тремя разными специфичностями к TNFR2. В одном из вариантов осуществления по меньшей мере одна из специфичностей обеспечивается набором из шести CDR из таблицы 5 или вариантов этих CDR. В другом варианте осуществления наборы из шести CDR имеют по меньшей мере две специфичности из таблицы или их вариантов. В дополнительном варианте осуществления присутствуют все три специфичности. В другом варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может быть тетрапаратопной, например, по меньшей мере, с одной, двумя или тремя специфичностями, обеспечиваемыми наборами из шести CDR, представленными в таблице 5 или их вариантами. В одном из вариантов осуществления все четыре специфичности могут быть из наборов из шести CDR из таблицы 5 или их вариантов.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по

настоящему изобретению содержит антигенсвязывающий сайт, содержащий набор из шести CDR из клона С40. В другом предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула содержит антигенсвязывающий сайт, содержащий набор из шести CDR, происходящих из клона С19. В следующем предпочтительном варианте осуществления антитело имеет как антигенсвязывающий сайт, содержащий набор из шести CDR из клона С40, так и дополнительный антигенсвязывающий сайт, содержащий набор из шести CDR из клона С19. В одном из предпочтительных вариантов осуществления CDR происходят из клона С4. В одном из вариантов осуществления все антигенсвязывающие сайты антитела по настоящему изобретению содержат один и тот же набор из шести CDR. В другом варианте осуществления разные антигенсвязывающие сайты антитела содержат разные наборы из шести CDR. В одном из вариантов осуществления вместо шести CDR из С40, С19 или С4 может быть использован вариант набора из шести CDR, такой как любой из вариантов, обсуждаемых в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления может быть представлен любой из форматов антител, представленных в настоящем описании, где шесть CDR антигенсвязывающих сайтов являются CDR С40. В другом варианте осуществления они представляют собой CDR С19. В другом варианте осуществления они представляют собой CDR С4. В другом варианте осуществления CDR представляют собой варианты CDR С40, С19 или С4, которые все еще сохраняют способность связываться с TNFR2.

Настоящее изобретение также относится к вариантам вышеуказанных связывающих молекул и специфическим связывающим молекулам, использованным в примере. Например, в одном из вариантов осуществления вариант может иметь одно, два, три, четыре, пять, шесть или более изменений аминокислотной последовательности в последовательностях CDR антигенсвязывающего сайта по сравнению с шестью CDR, представленными в таблице 5 в виде набора, но при этом еще способен действовать как агонист TNFR2. В другом варианте осуществления он может иметь шесть или более таких аминокислотных замен, например, он может иметь от шести до пятнадцати таких замен, например шесть, семь, восемь, девять, десять или более таких замен. В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению может иметь по меньшей мере указанное количество изменений аминокислотной последовательности. В другом варианте осуществления количество замен в антителе может достигать указанного значения. В дополнительном варианте осуществления оно может иметь указанное количество изменений аминокислотной последовательности. В одном из вариантов осуществления изменения в последовательности могут представлять собой консервативные аминокислотные замены. В другом варианте осуществления изменения в последовательности могут включать неконсервативные аминокислотные замены в последовательности. В настоящем описании обсуждаются различные специфические модификации, и они могут присутствовать в таких вариантах молекул. В любом из вариантов осуществления, представленных в настоящем описании, если указан

специфический формат антитела, то в дополнительном варианте осуществления может быть представлена или использована связывающая молекула, которая представляет собой антитело такого формата из примеров настоящей заявки, но которое модифицировано путем замены всех мышиных последовательностей CDR человеческими последовательностями CDR.

Предпочтительные антигенсвязывающие сайты C4 и вариантов C4

В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению содержит антигенсвязывающий сайт, содержащий последовательности клона C4 или варианты его последовательностей. Например, связывающая молекула может содержать антигенсвязывающий сайт, содержащий переменные области легкой и тяжелой цепей из клона C4. Она может содержать шесть CDR клона C4. Также можно использовать вариант переменной области C4 и последовательностей CDR, причем в настоящей заявке приводятся предпочтительные примеры таковых.

Переменные области легкой и тяжелой цепей клона C4 обозначены как SEQ ID No: 295 и 296, соответственно, и могут быть использованы в антигенсвязывающем сайте. Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области легкой цепи для клона C4 представлены как SEQ ID No: 69/70/71, соответственно, и эти три CDR могут быть использованы в антигенсвязывающем сайте. Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области тяжелой цепи для клона C4 представлены как SEQ ID No: 102/103/104, соответственно, и эти три CDR могут быть использованы в антигенсвязывающем сайте. В предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающий сайт содержит все шесть CDR, т.е. CDR легкой цепи с SEQ ID NO: 69/70/71 и CDR тяжелой цепи с SEQ ID NO: 102/103/104. Также можно использовать варианты последовательностей C4. В одном из вариантов осуществления можно использовать набор вариантов из этих шести CDR, которые имеют максимум 10 изменений аминокислотной последовательности по сравнению с последовательностью специфических CDR. В одном из вариантов осуществления набор вариантов будет содержать максимум 5 изменений аминокислотной последовательности. В одном из вариантов осуществления они могут иметь одно, два или три изменения аминокислотной последовательности по сравнению с последовательностями специфического набора из шести CDR.

Особенно предпочтительные переменные области легкой цепи варианта C4, которые могут быть использованы, представлены как SEQ ID No: 262-265. CDR из этих переменных областей легкой цепи, которые могут быть использованы, представлены как SEQ ID No: 266-277. Набор вариантов CDR может иметь до 10 изменений аминокислотной последовательности по сравнению с последовательностью специфических переменных CDR легкой цепи. Например, набор вариантов может иметь до пяти изменений аминокислотной последовательности по сравнению со специфическими последовательностями. Особенно предпочтительные переменные

области тяжелой цепи, которые могут быть использованы, указаны как SEQ ID NO: 278-281. CDR из этих переменных областей тяжелой цепи, которые могут быть использованы, обозначены как SEQ ID NO: 282-293. Могут быть использованы варианты, содержащие до десяти изменений аминокислотной последовательности CDR тяжелой цепи. В одном из вариантов осуществления может быть использован набор вариантов, содержащий до пяти изменений аминокислотной последовательности по сравнению с последовательностью набора CDR тяжелой цепи.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению содержит антигенсвязывающий сайт, содержащий переменную область легкой цепи, выбранную из одной из SEQ ID NO: 295, 262-265 или любого из их вариантов, и переменную область тяжелой цепи, выбранную из одной из SEQ ID NO: 306, 278-281 или любого из их вариантов. В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула содержит антигенсвязывающий сайт, содержащий переменную область легкой цепи с CDR1, CDR2 и CDR3 с SEQ ID NO: 69, 70 и 71 или их вариантов, и переменную область тяжелой цепи с CDR1, CDR2 и CDR3 SEQ с ID NO: 102, 103 и 104 или их вариантов. В следующем предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула содержит антигенсвязывающий сайт, содержащий набор из трех CDR легкой цепи для CDR1/CDR2/CDR3, выбранных из SEQ ID NO: 266/267/268; 269/270/271; 272/273/274; 275/276/278; или их вариантов. В следующем предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула содержит антигенсвязывающий сайт, содержащий набор из трех CDR тяжелой цепи для CDR1/CDR2/CDR3, выбранных из SEQ ID NO: 282/283/284; 285/286/287; 288/289/290; 291/292/293; или их вариантов. В одном из вариантов осуществления связывающий сайт содержит такие CDR как легкой, так и тяжелой цепи. Например, в одном из вариантов осуществления связывающая молекула содержит CDR легкой цепи, тяжелой цепи или обеих цепей из одного из специфических вариантов С4, представленных в настоящем описании.

Связывающие сайты на основе С4 и вариантов С4 можно использовать в любом из обсуждаемых здесь форматов антител, которые содержат антигенсвязывающий сайт, содержащий переменную область легкой и тяжелой цепей. В одном из предпочтительных вариантов осуществления такие антигенсвязывающие сайты используются в четырехвалентной связывающей молекуле по настоящему изобретению. В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления набор из шести CDR или пары последовательностей VL и VH из клона С4 или одного из специфических вариантов клона С4, представленных в настоящем описании, используется в одном из форматов, показанных на фигурах, в частности, показанных на фиг. 1 и 7. Они также могут использоваться в формате, показанном на фиг. 29А. Также могут использоваться варианты специфических последовательностей.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения связывающая молекула по настоящему изобретению содержит полипептид, имеющий

последовательность SEQ ID NO: 259, и полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 261. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула состоит из двух таких полипептидов. В следующем предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула содержит два таких полипептида, в которых переменные области легкой цепи с SEQ ID NO: 261 заменены переменными областями одной из SEQ ID NO: 262-265 или их вариантами. В следующем предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула содержит два таких полипептида, в которых переменная область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 259 заменена переменными областями одной из SEQ ID NO: 278-281 или их вариантами. В одном из предпочтительных вариантов осуществления таким образом заменены переменные области как тяжелой, так и легкой цепей.

В следующем предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула содержит полипептид с последовательностью, представленной на фиг. 54 или 55. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула содержит:

(a) полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 332 или вариант, идентичный этой последовательности на по меньшей мере 90%; и

(b) полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 333 или вариант, идентичный этой последовательности на по меньшей мере 90%.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула содержит два полипептида, определенных в (a), и два полипептида, определенных в (b).

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула представляет собой молекулу, содержащую переменные области легкой и тяжелой цепей, представленных в SEQ ID NO: 332 и 333, или варианты этих последовательностей, идентичные им на по меньшей мере 90%, где связывающая молекула способна действовать как агонист TNFR2.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула содержит:

(c) полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 334 или вариант, идентичный этой последовательности на по меньшей мере 90%; и

(d) полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 335 или вариант, идентичный этой последовательности на по меньшей мере 90%.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула содержит два полипептида, определенных в (a), и два полипептида, определенных в (b).

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула представляет собой молекулу, содержащую переменные области легкой и тяжелой цепей, представленные в SEQ ID NO: 334 и 335, или варианты этих последовательностей, идентичные им на по меньшей мере 10%, где связывающая молекула способна действовать как агонист TNFR2.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула содержит:

(e) полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 336 или вариант, идентичный этой последовательности на по меньшей мере 90%; и

(f) полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 337 или вариант, идентичный этой последовательности на по меньшей мере 90%.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула содержит два полипептида, определенных в (a), и два полипептида, определенных в (b).

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула представляет собой молекулу, содержащую переменные области легкой и тяжелой цепей, представленные в SEQ ID NO: 336 и 337, или их варианты, идентичные на по меньшей мере 10%, где связывающая молекула способна действовать как агонист TNFR2.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления все TNFR2-специфические антигенсвязывающие сайты в связывающей молекуле по настоящему изобретению представляют собой один из связывающих сайтов на основе C4 или вариантов C4, обсуждаемых в настоящем описании.

В таблице 10 представлены примеры предпочтительных пар легких и тяжелых цепей для антигенсвязывающих сайтов варианта C4. В одном из предпочтительных вариантов осуществления в качестве антигенсвязывающего сайта можно использовать пару последовательностей, указанных в таблице 10. В другом варианте осуществления может быть использована пара последовательностей, идентичная одной из этих пар последовательностей на по меньшей мере 90%. Могут быть использованы варианты последовательностей, идентичные на 95%.

C4 и специфические варианты C4, представленные в настоящем описании, могут быть использованы в любом из связывающих форматов, представленных в настоящем описании, как и варианты их CDR, наборов CDR легкой цепи, наборов CDR тяжелой цепи, наборов из шести CDR, переменных областей легкой цепи, переменных областей тяжелой цепи и пар переменных областей. Специфические пары вариантов C4, которые можно использовать, представлены в таблице 10, при этом также можно использовать варианты последовательностей этих специфических пар. На фиг. 54 и 55 показаны особенно предпочтительные полипептиды на основе варианта C4, которые можно использовать, в частности, указанные тяжелые и легкие цепи.

Предпочтительные последовательности VHH

В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления TNFR2-связывающие домены связывающей молекулы по настоящему изобретению представляют собой домены VHH. Следовательно, в одном из предпочтительных вариантов осуществления все TNFR2-связывающие домены в связывающей молекуле представляют собой домены VHH. В примерах настоящей заявки описано создание 14 TNFR2-специфических областей VHH, последовательности которых представлены как SEQ ID NO: 140-153. Каждая из этих специфических областей VHH представляет собой предпочтительный домен VHH, предназначенный для использования в связывающей молекуле по настоящему изобретению, включая любой из представленных в настоящем описании форматов связывающих молекул. Варианты последовательности таких специфических доменов VHH также могут быть использованы при условии, что вариант все еще способен связываться с TNFR2, и связывающая молекула действует как агонист TNFR2.

Особенно предпочтительным доменом VHH для использования в связывающей молекуле является связывающий домен VHH C188 с SEQ ID NO: 140 или его вариант. Три CDR C188 представлены как SEQ ID NO: 154/155/156. В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула содержит антигенсвязывающий сайт, содержащий эти три CDR. В одном из предпочтительных вариантов осуществления все антигенсвязывающие TNFR2-специфические сайты содержат эти три CDR. Кроме того, можно использовать варианты CDR при условии, что связывающий сайт все еще способен связывать TNFR2.

Как описано в примерах настоящей заявки, создавали варианты специфических последовательностей C188 C188-VHH_1 - C188-VHH_15, последовательности которых представлены как SEQ ID NO: 198-212, соответственно. Следовательно, в одном из вариантов осуществления TNFR2-связывающий домен связывающей молекулы по настоящему изобретению имеет в качестве VHH-домена одну из SEQ ID NO: 198-212. Все TNFR2-связывающие домены предпочтительно имеют одну и ту же последовательность. В особенно предпочтительном варианте осуществления вариант имеет последовательность одной из SEQ ID NO: 198-211. Опять же, все связывающие домены предпочтительно имеют одинаковые последовательности. В одном из вариантов осуществления можно использовать варианты связывающих доменов VHH, идентичные одной из SEQ ID NO: 198-211 на по меньшей мере 90%. В другом варианте осуществления степень идентичности последовательности составляет по меньшей мере 95%. Такие варианты по-прежнему могут действовать как агонисты TNFR2.

В следующем предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула содержит антигенсвязывающий сайт, который представляет собой один из вариантов специфического VHH C188, представленных как SEQ ID No: 198-211 или представляет собой вариант такой последовательности. В одном из вариантов осуществления все TNFR2-специфические связывающие сайты представляют собой вариант связывающего домена VHH. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула содержит набор из трех CDR одного из вариантов связывающих доменов VHH C188. Например, в одном из вариантов осуществления связывающая молекула содержит антигенсвязывающий домен, содержащий набор из трех CDR, выбранных из 213/214/215; 216/217/218; 219/220/221; 222/223/224; 225/226/227; 227/229/230; 231/232/233; 234/235/236; 237/238/239; 240/241/242; 243/244/245; 246/247/248; 249/250/251; 252/253/254; 255/256/257; или варианты этих наборов. В предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула содержит антигенсвязывающий домен, содержащий набор из трех CDR, выбранных из 213/214/215; 216/217/218; 219/220/221; 222/223/224; 225/226/227; 227/229/230; 231/232/233; 234/235/236; 237/238/239; 240/241/242; 243/244/245; 246/247/248; 249/250/251; 252/253/254; или варианты этих наборов, где вариант имеет в общей сложности до десяти изменений аминокислотной последовательности, но VHH все еще может связывать TNFR2. В одном из вариантов осуществления вариант имеет до пяти изменений аминокислотной последовательности, но все еще способен связывать TNFR2.

В особенно предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула, в которой используются такие домены VHH, является четырехвалентной или шестивалентной связывающей молекулой в отношении такого VHH, например, в одном из форматов, изложенных в настоящем описании. Специфические области VHH с SEQ ID NO: 140-153 и 198-212 могут быть использованы в любом из форматов связывающих молекул, представленных в настоящем описании, включая те, которые показаны на фигурах и в примерах. В одном из вариантов осуществления специфические области VHH с SEQ ID NO: 140, 142-145, 149, 151 и 153 могут быть использованы в любом из форматов связывающих молекул, представленных в настоящем описании, включая те, которые показаны на фигурах и в примерах. В особенно предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула может содержать антигенсвязывающий сайт, содержащий VHH, имеющий переменную область, выбранную из одной из SEQ ID NO: 198-211, или ее варианта, идентичного на по меньшей мере 90%, который все еще способен связывать TNFR2. В одном из вариантов осуществления один из форматов связывающих молекул, представленных в примерах или на фигурах, может быть модифицирован для использования такого антигенсвязывающего сайта.

На фиг. 40 и 41 показаны особенно предпочтительные форматы для антител VHH. Показанные шестивалентные форматы являются особенно предпочтительными. Любой из доменов VHH или набор из трех CDR из доменов VHH, представленных в настоящем описании, можно использовать в связывающей молекуле на основе VHH, особенно в молекулах C188 или специфических вариантах C188, представленных в настоящем описании. Особенно предпочтительным форматом является формат 3xVHH-Fc, в котором необязательно присутствуют линкеры между связывающими доменами VHH. Особенно предпочтительная связывающая молекула содержит два полипептида с SEQ ID NO: 197. Дополнительные особенно предпочтительные связывающие молекулы содержат два полипептида с последовательностью, соответствующей SEQ ID NO: 197, за исключением того, что домены VHH представляют собой домены с одной из SEQ ID NO: 198-212. Дополнительные особенно предпочтительные связывающие молекулы содержат два полипептида с последовательностью, соответствующей SEQ ID NO: 197, за исключением того, что домены VHH являются разными и включают набор из трех CDR из одной из SEQ ID NO: 213-257.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 331 или ее вариант, идентичный на по меньшей мере 90%. В другом варианте осуществления связывающая молекула содержит три таких полипептида. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула содержит полипептид, который представляет собой вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 331 с другой шарнирной областью, при этом вариант имеет аминокислотную последовательность, идентичную на по меньшей мере 90%. В другом варианте осуществления он содержит три таких полипептида. В другом варианте осуществления связывающая молекула содержит

антигенсвязывающий сайт, который содержит вариабельную область, представленную в SEQ ID NO: 331, или вариант, идентичный на по меньшей мере 90%, который все еще способен действовать как агонист. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула содержит антигенсвязывающий сайт, содержащий три CDR, присутствующие в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 331.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула содержит обсуждаемый в настоящем описании вариант специфической области VHH, такой как один из указанных выше. Например, вариант может представлять собой вариант с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична одной из специфических последовательностей. Он может быть идентичным на по меньшей мере 90%. Он может быть идентичным на по меньшей мере 95%. Он может быть идентичным на по меньшей мере 98%. Он может быть идентичным на по меньшей мере 99%. В одном из вариантов осуществления вариант имеет от одного до десяти изменений аминокислотной последовательности. В одном из вариантов осуществления он может иметь от одного до пяти изменений аминокислотной последовательности. Он может иметь одно, два, три, четыре или пять изменений аминокислотной последовательности по сравнению со специфической последовательностью. Он может иметь одно, два или три изменения аминокислотной последовательности по сравнению со специфическими последовательностями. Возможные варианты данной последовательности обсуждаются в других местах настоящего описания, и можно использовать любые такие типы вариантов. Вариант предпочтительно сохраняет по меньшей мере ту же самую TNFR2-связывающую активность. Например, вариант может обладать по меньшей мере такой же агонистической активностью. В одном из вариантов осуществления вариант может иметь по меньшей мере 50% активности исходной молекулы. В одном из вариантов осуществления он может иметь по меньшей мере 75% активности исходной молекулы, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% той же активности. Одна из предпочтительных связывающих молекул содержит последовательность SEQ ID NO: 197, но можно использовать варианты этой последовательности, например, любой из типов варианта, упомянутых в настоящем описании. Домены VHH с SEQ ID NO: 198-212 также являются предпочтительными, и можно использовать их варианты, включая любой из типов варианта, обсуждаемых в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула может содержать как связывающие домены sdBr, так и другие не являющиеся связывающими доменами sdBr. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула может содержать оба связывающих домена VHH, таких как антигенсвязывающие домены C188 и варианта C188, в комбинации с антигенсвязывающими доменами, не относящимися к VHH. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула может содержать как связывающий домен C188, варианта C188, так и связывающий домен, который представляет собой антигенсвязывающий домен C4 или варианта C4.

C188 и специфические варианты C188, представленные в настоящем описании, могут использоваться в любом из связывающих форматов, представленных в настоящем описании, как и варианты их CDR, наборов CDR или переменных областей. На фиг. 53 показаны особенно предпочтительные полипептиды, которые можно использовать, а также варианты этих специфических последовательностей.

Дополнительные предпочтительные связывающие молекулы

Особенно предпочтительным форматом связывающей молекулы является четырехвалентный. Одним из особенно предпочтительных доменов VH для использования в связывающих молекулах, особенно четырехвалентных, является домен VH C4. Особенно предпочтительным форматом является IgG1-НС:scFv или IgG1-НС:scFv. В предпочтительном формате домены VH и VL в таких форматах являются доменами C4. Одним из особенно предпочтительных форматов является C4-IgG1(Durv)-НС:scFvC4(G4S)4. В особенно предпочтительном варианте такая связывающая молекула содержит два полипептида: последовательность легкой цепи с SEQ ID NO: 261 и последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO: 259. В одном из вариантов осуществления предложена связывающая молекула, которая содержит такие полипептиды, за исключением того, что области VH и/или VL представляют собой одну из таких специфических областей, представленных в настоящем описании. Как описано в примерах, варианты последовательностей VL C4 созданы с использованием последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 262-265; любая из этих последовательностей VL может заменять последовательности в молекуле C4-IgG1(Durv)-НС:scFvC4(G4S)4. Как описано в примерах, варианты последовательностей VH C4 созданы с использованием последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 278-281, любая из этих последовательностей VH может заменять последовательности в молекуле C4-IgG1(Durv)-НС:scFvC4(G4S)4. В одном из вариантов осуществления последовательности областей VL и VH выбирают из SEQ ID NO: 262-265 для легкой цепи и SEQ ID NO: 278-281 для тяжелой цепи. В одном из предпочтительных вариантов осуществления используемые последовательности VL и VH представляют собой SEQ ID NO: 295 и 296, соответственно.

Анализ

В одном из вариантов осуществления для определения того, обладает ли связывающая молекула по настоящему изобретению определенным свойством или свойствами, например такими, как любое из упомянутых в настоящем описании, может быть использован функциональный анализ. Следовательно, функциональные анализы можно использовать для оценки связывающей молекулы, в частности антитела, по настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления для оценки специфической связывающей молекулы и того, обладает ли она желаемым свойством или свойствами, может быть использован один или более анализов, описанных в примерах настоящей заявки. В особенно предпочтительном варианте осуществления можно использовать один из анализов, описанных в примере 1.

Связывающая молекула по настоящему изобретению способна связывать TNFR2. Способность связывающей молекулы по настоящему изобретению или способность потенциальной связывающей молекулы связывать TNFR2 можно оценивать различными способами. Например, в одном из вариантов осуществления способность связывающей молекулы связывать TNFR2 оценивают с использованием белка TNFR2, например, такими методами, как поверхностный плазмонный резонанс с использованием TNFR2 или его части, связанной с чипом. В особенно предпочтительном варианте осуществления способность связывающей молекулы связывать TNFR2 оценивают с использованием клетки, экспрессирующей TNFR2 на своей поверхности. В одном из вариантов осуществления молекулы-кандидаты метят, а затем подвергают скринингу на способность связываться с клетками, экспрессирующими TNFR2, с помощью таких методов, как ELISA или проточная цитометрия. В другом варианте осуществления молекулы-кандидаты можно инкубировать с клетками, экспрессирующими TNFR2, а затем связанные молекулы-кандидаты могут быть детектированы с помощью вторичных агентов, таких как меченое антитело, специфичное для молекулы-кандидата. В одном из вариантов осуществления связывающую молекулу по настоящему изобретению метят, например, используют меченные люциферазой (например, люциферазой *Gaussia Princeps* (GpL)) варианты связывающей молекулы, в частности антитела или слитые белки, например, как описано Kums et al., *MABs*. 2017 Apr; 9(3):506-520). Такие меченые связывающие молекулы также можно использовать в анализах конкурентного связывания.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению способна: (a) олигомеризировать TNFR2 на поверхности клетки, экспрессирующей TNFR2, предпочтительно образовывать на поверхности клеток гексамеры TNFR2 или кластеры тримеров TNFR2 более высокого порядка; (b) запускать передачу сигналов TNFR2; и/или (d) стимулировать пролиферацию лейкоцитов, предпочтительно Т-клеток, более предпочтительно Treg клеток. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может связывать уже существующие комплексы более высокого порядка рецепторов TNFR2 на поверхности клетки и, в частности, тримеры TNFR2 на поверхности клетки. Например, в одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может вызывать образование суперкластера рецепторов TNFR2 либо на одной и той же клетке, либо может связывать две клетки, либо и то, и другое.

В одном из вариантов осуществления измеряют способность молекулы-кандидата вызывать олигомеризацию отдельных молекул TNFR2 на поверхности клетки, экспрессирующей TNFR2. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению способна вызывать такую олигомеризацию. Например, в одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет способна вызывать образование гексамеров или других олигомеров тримеров TNFR2. В одном из вариантов осуществления образование таких олигомеров можно обнаружить с помощью микроскопии высокого разрешения. В одном из вариантов

осуществления образование олигомеров TNFR2 можно обнаружить таким методом, как PALM, dSTORM, химическая сшивка или FRET.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления способность связывающей молекулы по настоящему изобретению активировать TNFR2 оценивают путем измерения последующих эффектов активации TNFR2, а не непосредственного измерения самого связывания. Например, в одном из вариантов осуществления способность данной связывающей молекулы индуцировать передачу сигнала TNFR2 можно установить путем определения, индуцирует ли связывающая молекула продуцирование IL-8. Активация NF κ B в ответ на передачу сигнала TNFR2 обычно приводит к продуцированию IL-8, и поэтому ее можно использовать как один из способов оценки способности данной связывающей молекулы активировать передачу сигнала TNFR2 в качестве желательного варианта осуществления, где связывающая молекула по настоящему изобретению способна активировать такую передачу сигналов. В одном из вариантов осуществления в качестве положительного контроля можно использовать молекулу, о которой известно, что она активирует передачу сигналов TNFR2, например, связывающую молекулу по настоящему изобретению. Примером предпочтительной линии клеток, которую можно использовать для оценки способности связывающей молекулы связываться с TNFR2 и стимулировать продуцирование IL-8, является HT1080-Bcl2-TNFR2. В одном из вариантов осуществления функциональный анализ включает приведение в контакт оцениваемой связывающей молекулы с клетками, экспрессирующими TNFR2, такими как, например, клетки HT1080-Bcl2-TNFR2, инкубацию этих двух молекул в течение ночи, а затем анализ образца супернатанта на наличие IL-8. В одном из вариантов осуществления для такой оценки используют ELISA, например, набор BD OptEIATM IL8 ELISA. В одном из вариантов осуществления такой способ может также включать положительный контроль, о котором известно, что он стимулирует передачу сигналов TNFR2. В одном из вариантов осуществления такой анализ можно использовать для скрининга одной или более связывающих молекул на их способность связывать IL-8 и активировать его продуцирование, например, для скрининга библиотеки потенциальных связывающих молекул и идентификации тех из них, которые активируют продуцирование IL-8. В одном из вариантов осуществления такой анализ можно использовать для проверки того, что вариант связывающей молекулы по настоящему изобретению все еще является таким же активным или более активным, чем специфическая связывающая молекула по настоящей заявке.

Другим анализом, который можно использовать для оценки связывающей молекулы по настоящему изобретению, является анализ жизнеспособности, поскольку TNFR2 может индуцировать в некоторых клеточных линиях/типах клеток гибель клеток путем ингибирования белков выживания (TRAF2, cIAP1, cIAP2) и сопутствующей активации эндогенно продуцируемых TNF, запускающих TNFR1. В предпочтительном варианте осуществления для такой оценки используют клетки Kym-1 (Schneider et al., 1999). Например, клетки, экспрессирующие TNFR2, в частности клетки Kym-1, посеянные

на планшете или в лунках, можно инкубировать с тестируемой связывающей молекулой с последующим окрашиванием кристаллическим фиолетовым, с последующим измерением OD при 595 нм. Можно использовать положительный контроль, который, как известно, приводит к гибели клеток, например «смерти клеток», например, контрольную смесь (примером которой является 200 нг/мл TNF, 200 нг/мл TRAIL, 200 нг/мл CD95L, 25 мкг/мл CHX, 1% (мас./об.) азида натрия). Наблюдаемые значения могут быть нормализованы относительно необработанных клеток и клеток, обработанных «смесью, вызывающей гибель клеток». Опять же, такие методы можно использовать для скрининга связывающих молекул на наличие желаемых свойств.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет способна одновременно индуцировать продуцирование IL-8, например, согласно оценке с помощью обсуждаемого выше анализа, а также индуцировать гибель клеток, например, согласно оценке с помощью обсуждаемого выше анализа. В другом предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет индуцировать продуцирование IL-8, но вызывать гибель клеток в незначительной степени, например, как измерено с помощью анализов в примерах настоящей заявки.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет способна связываться с TNFR2 и инициировать передачу сигнала посредством активации альтернативного пути NFκB. В особенно предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет способна к активации альтернативного пути NFκB, которую можно обнаружить по результатам процессинга p100 в p52. В одном из вариантов осуществления экспрессирующие TNFR2 клетки приводят в контакт с оцениваемой связывающей молекулой, затем эти клетки собирают, и выполняют оценку лизата клеток путем измерения уровней p100 и p52. В одном из вариантов осуществления клеточные лизаты оценивают с помощью вестерн-блоттинга, используя антитела к p100 и p52, для изучения, происходит ли процессинг первого во второй. Можно использовать любые подходящие клетки, но в предпочтительном варианте осуществления для оценки используют клетки Кум-1. Можно использовать положительный контроль, такой как связывающая молекула, о которой известно, что она является активной. Также можно использовать отрицательный контроль, например, клетки, которые инкубируют без связывающей молекулы, а затем оценивают таким же образом. В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет способна активировать классический путь NFκB, например, согласно измерению продуцирования IL-8, а также будет способна активировать альтернативный путь NFκB, например, по оценке, подвергается ли p100 процессингу до p52. В другом предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула также будет способна активировать гибель клеток, например, по результатам анализа жизнеспособности клеток, как описано выше.

Обычно связывающие молекулы по настоящему изобретению не связываются с

FcγR. В одном из предпочтительных вариантов осуществления потенциальную связывающую молекулу оценивают как по ее способности связывать и активировать TNFR2, так и по ее способности не связываться с FcγR и не активировать его. В одном из вариантов осуществления оценивают способность связывающей молекулы по настоящему изобретению связывать рецепторы Fc и, в частности FcγR. Отсутствие связывания с рецепторами Fc можно оценить, например, для определения, проявляется или нет активность CDC или ADCC, и предпочтительно связывающая молекула по настоящему изобретению не будет проявлять ни одну из этих активностей.

В другом варианте осуществления оценивают способность связывающей молекулы по настоящему изобретению стимулировать активацию и/или размножение клеток, например, стимулировать таким образом конкретные иммунные клетки, поскольку связывающая молекула по настоящему изобретению обычно способна стимулировать активацию и/или размножение клеток, таких как Т-клетки. В одном из вариантов осуществления оценивают способность связывающей молекулы по настоящему изобретению стимулировать Treg клетки из РВМС. В одном из вариантов осуществления способность связывающей молекулы стимулировать размножение Treg оценивают с помощью способа, включающего:

- выделение РВМС и затем культивирование РВМС (например, при высокой плотности, такой как 10 миллионов клеток на мл);
- сбор клеток и последующий посев РВМС (например, при более низкой плотности 1 миллион клеток на мл);
- инкубирование клеток со связывающей молекулой-кандидатом в течение четырех дней; и
- проведение анализа для определения количества клеток.

В предпочтительном варианте осуществления используют отрицательный контроль, когда клетки культивируют без контакта со связывающей молекулой-кандидатом. Клетки можно оценить с помощью проточной цитометрии, в частности, путем окрашивания CD4+CD25+FoxP3+ клеток. В предпочтительном варианте осуществления измеряют количество FoxP3+CD25+ клеток в популяции CD3+CD4+ клеток. Клетки также можно окрашивать антителами, специфическими к CD3 и/или CD8. В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет давать более высокое количество CD4+CD25+FoxP3+ клеток по сравнению с инкубацией без связывающей молекулы. В другом варианте осуществления потенциальную связывающую молекулу также можно сравнить со специфической связывающей молекулой по настоящему изобретению, например, чтобы оценить, является ли вариант связывающей молекулы также способным стимулировать размножение Treg в той же или более высокой степени, чем специфическая связывающая молекула по настоящему изобретению.

В другом предпочтительном варианте осуществления для изучения размножения Treg клеток используют мышей FoxP3-Luc1, поскольку эти мыши экспрессируют

люциферазу под контролем мышинового промотора FoxP3, который действует в качестве маркера Treg клеток. Например, таким мышам можно инъецировать кандидата-агониста TNFR2, а затем использовать биоллюминесцентную визуализацию для визуализации Treg клеток. Можно выполнить положительный контроль с известным агонистом TNFR2, а также отрицательный контроль. В одном из вариантов осуществления вариант или кандидат связывающей молекулы будут сравнивать с известным агонистом TNFR2, представленным в настоящем описании, и если он приводит к эквивалентному или более высокому уровню Treg, по оценке с помощью биоллюминесцентной визуализации в предпочтительном варианте осуществления, то такой вариант или кандидат также классифицируют как связывающая молекула по настоящему изобретению. Такую оценку также можно комбинировать с оценкой *ex vivo*, например, путем последующего умерщвления животного, выделения клеток и последующей оценки количества Treg.

В другом предпочтительном варианте осуществления для тестирования специфичных для человека молекул используют трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий TNFR2 или, в частности, внеклеточный домен человеческого TNFR2, например, полученных после случайного введения кДНК человеческого TNFR2 в геном мыши или, более конкретно, в организм мыши. Локус гена TNFR2 используют для изучения уровней Treg и, в частности, их размножения. Таких трансгенных мышей можно скрещивать с трансгенными мышами FoxP3-Luc1 для визуализации размножения Treg *in vivo*. После умерщвления отдельные ткани также можно обработать для визуализации для определения изменения уровней Treg по сравнению с таковыми у животных отрицательного контроля. Размножение Treg и соотношение Treg/Teff также можно определить количественно с помощью проточной цитометрии, исследуя спленоциты, лейкоциты в крови или других тканях. Альтернативно, мышам с иммунодефицитом, таким как мыши NSG, можно инъецировать PBMC человека или человеческие Treg, и размножение Treg определить с помощью проточной цитометрии.

Эффективность конкретной связывающей молекулы можно оценить в системе *in vivo*, например, на животных моделях. Например, можно использовать различные модели болезни «трансплантат против хозяина» (GvHD), где связывающую молекулу вводят в такую животную модель, а затем сравнивают с контрольным животным, которое представляет собой такую же животную модель GvHD, но которому не была введена связывающая молекула. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению будет представлять или уменьшать GvHD на животной модели. Таким же образом можно использовать и другие модели животных, например, модели таких состояний, как псориаз, воспалительное заболевание кишечника (IBD), волчанка, рассеянный склероз, диабет 1 типа, неврологические заболевания и атеросклероз. Для определения, способна ли данная связывающая молекула стимулировать размножение Treg *in vivo*, также можно использовать исследования *in vivo*.

Конъюгаты, слитые белки и эффекторные молекулы

Связывающая молекула, в частности антитело, по настоящему изобретению может

быть конъюгирована с эффекторной молекулой. Следовательно, при желании связывающая молекула и, в частности антитело, для применения в настоящем изобретении может быть конъюгирована с одной или более эффекторными молекулами. Следует понимать, что эффекторная молекула может содержать одну эффекторную молекулу или две или более таких молекул, связанных таким образом, что они образуют один фрагмент, который может быть присоединен к связывающим молекулам, в частности к антителам, по настоящему изобретению. Если желательно получить связывающую молекулу и в частности антитело по настоящему изобретению, связанные с эффекторной молекулой, их можно получить с помощью стандартных химических процедур или процедур рекомбинантной ДНК, в которых связывающая молекула и в частности антитело связаны с эффекторной молекулой либо непосредственно, либо через связывающий агент. Методы конъюгации таких эффекторных молекул с антителами хорошо известны в данной области техники (см. Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2nd Ed., Robinson et al., eds., 1987, p. 623-53; Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 and Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123)). Конкретные химические процедуры включают, например, описанные в WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 и WO 03/031581. Альтернативно, когда эффекторная молекула представляет собой белок или полипептид, связь может быть достигнута с помощью процедур рекомбинантной ДНК, например, как описано в WO 86/01533 и EP0392745. В одном из вариантов осуществления связывающие молекулы, в частности антитела, по настоящему изобретению могут содержать эффекторную молекулу. В контексте настоящего описания термин «эффекторная молекула» включает, например, лекарственные средства, токсины, биологически активные белки, например, ферменты, антитела или фрагменты антител, синтетические или природные полимеры, нуклеиновые кислоты и их фрагменты, например ДНК, РНК и их фрагменты, радионуклиды, в частности радиоiodиды, радиоизотопы, хелатные металлы, наночастицы и репортерные группы, такие как флуоресцентные соединения или соединения, которые можно обнаружить с помощью ЯМР- или ЭПР-спектроскопии.

Примеры эффекторных молекул могут включать цитотоксины или цитотоксические агенты, включая любой агент, который вреден (например, губителен) для клеток. Примеры включают комбрестатины, доластатины, эпотилоны, стауроспорин, майтансиноиды, спонгистатины, ризоксин, галихондрины, роридины, гемиастерлины, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, новокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин и их аналоги или гомологи. Эффекторные молекулы также включают, без ограничения, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлорэтамин, тиопепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU)),

циклофосфамид, бусульфан, дибромманнит, стрептозотоцин, митомицин С и цис-дихлордиамины платины (II) ((DDP) (цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин (ранее дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин, антрамицин (АМС), калихеамицины или дуокармицины) и антimitотические агенты (например, винкристин и винбластин).

Другие эффекторные молекулы могут включать хелатные радионуклиды, такие как ^{111}In и ^{90}Y , Lu^{177} , висмут 213 , калифорний 252 , иридий 192 и вольфрам 188 /рений 188 ; или лекарственные средства, такие как, без ограничения, алкилфосфохолины, ингибиторы топоизомеразы I, таксоиды и сурамин. Другие эффекторные молекулы включают белки, пептиды и ферменты. Представляющие интерес ферменты включают, без ограничения, протеолитические ферменты, гидролазы, лиазы, изомеразы, трансферазы. Представляющие интерес белки, полипептиды и пептиды включают, без ограничения, иммуноглобулины, токсины, такие как абрин, рицин А, экзотоксин *Pseudomonas* или дифтерийный токсин, белок, такой как инсулин, фактор некроза опухоли, α -интерферон, β -интерферон, фактор роста нервов, фактор роста тромбоцитов или тканевый активатор плазминогена, тромботический агент или антиангиогенный агент, например ангиостатин или эндостатин, или модификатор биологического ответа, такой как лимфокин, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), фактор роста нервов (NGF) или другой фактор роста и иммуноглобулины.

Другие эффекторные молекулы могут включать детектируемые вещества, полезные, например, в диагностике. Примеры детектируемых веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радионуклиды, металлы, излучающие позитроны (для использования в позитронно-эмиссионной томографии) и ионы нерадиоактивных парамагнитных металлов. См. в целом патент США № 4741900 в отношении ионов металлов, которые можно конъюгировать с антителами для использования в качестве диагностических агентов. Подходящие ферменты включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; подходящие простетические группы включают стрептавидин, авидин и биотин; подходящие флуоресцентные материалы включают умбеллиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, флуоресцеина дихлортриазиниламин, дансилхлорид и фикоэритрин; подходящие люминесцентные материалы включают люминол; подходящие биолюминесцентные материалы включают люциферазу, люциферин и экворин; и подходящие радионуклиды включают ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In и ^{99}Tc .

В другом варианте осуществления эффекторная молекула может увеличивать или уменьшать период полувыведения связывающей молекулы, в частности антитела, *in vivo* и/или снижать иммуногенность и/или усиливать доставку через эпителиальный барьер в иммунную систему. Примеры подходящих эффекторных молекул этого типа включают

полимеры, альбумин, белки, связывающие альбумин, или соединения, связывающие альбумин, например, описанные в WO 05/117984. Когда эффекторная молекула представляет собой полимер, она может, как правило, представлять собой синтетический или природный полимер, например, необязательно замещенный полиалкиленовый, полиалкениленовый или полиоксиалкиленовый полимер с прямой или разветвленной цепью, или разветвленный или неразветвленный полисахарид, например, гомо- или гетерополисахарид. Специфические необязательные заместители, которые могут присутствовать в вышеупомянутых синтетических полимерах, включают одну или более гидроксильных, метильных групп или метоксигрупп. Конкретные примеры синтетических полимеров включают необязательно замещенный поли(этиленгликоль) с прямой или разветвленной цепью, поли(пропиленгликоль), поли(виниловый спирт) или их производные, в частности необязательно замещенный поли(этиленгликоль), такой как метоксиполи(этиленгликоль) или его производные.

Связывающая молекула, в частности антитело, по настоящему изобретению может быть конъюгирована с молекулой, которая модулирует или изменяет период полувыведения из сыворотки. Связывающая молекула, в частности антитело, по изобретению может связываться с альбумином, например, для модуляции периода полувыведения из сыворотки. В другом варианте осуществления связывающая молекула, в частности антитело, по настоящему изобретению может включать пептидный линкер, который представляет собой пептид, связывающий альбумин. Примеры пептидов, связывающих альбумин, включены в WO 2015/197772 и WO 2007/106120, которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки.

В другом варианте осуществления связывающая молекула, в частности антитело, по настоящему изобретению не конъюгирована с эффекторной молекулой. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула, в частности антитело, по изобретению не конъюгирована с токсином. В другом варианте осуществления связывающая молекула, в частности антитело, по изобретению не конъюгирована с радиоизотопом. В другом варианте осуществления связывающая молекула, в частности антитело, по настоящему изобретению не конъюгирована с агентом для визуализации.

Конъюгацию, помимо использования для присоединения молекулы антитела по настоящему изобретению к эффекторной молекуле, также можно использовать для присоединения разных частей антитела или, например, для присоединения с помощью лигандов TNFR2-связывающих сайтов к части антитела молекулы по настоящему изобретению.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может представлять собой слитый белок. «Слитый белок», как он упоминается в настоящем описании, не ограничивается конкретными типами слитых белков, при условии, что части слитого белка слиты посредством ковалентных связей. Например, части слитого белка могут быть слиты посредством экспрессии в одну или более одиночных полипептидных цепей, с помощью одной или более дисульфидных

связей, путем химической конъюгации (предпочтительно путем химической конъюгации с помощью клик-химии) и/или посредством любой другой ковалентной связи, которая известна в данной области техники как подходящая связь для белков. Предпочтительно части слитого белка сливают посредством экспрессии в одну или более одиночных полипептидных цепей и/или с помощью одной или более дисульфидных связей. Например, связывающая молекула и в частности антитело могут содержать полипептид, который содержит константную область тяжелой или легкой цепи, слитую с полипептидной последовательностью scFv. В другом варианте осуществления полипептид может содержать последовательность константной области тяжелой цепи, которая слита с последовательностью пептида тенаксина, в частности с последовательностью пептида тенаксина на С-конце полипептида. В других вариантах осуществления слияние может осуществляться посредством одной или более дисульфидных связей, химической конъюгации (предпочтительно химической конъюгации с помощью клик-химии) и/или любой другой ковалентной связи, которая известна в данной области техники как подходящая связь для белков.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению содержит фрагмент, который влияет на период полувыведения молекулы из сыворотки. Например, связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать хвост Fc, сывороточный альбумин и/или фрагмент, который является связывающим агентом сывороточного альбумина, и ПЭГ. В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по изобретению либо будет содержать, либо будет иметь связывающий сайт для сывороточного альбумина, либо будет конъюгирована с ним. В одном из вариантов осуществления связывающую молекулу конъюгируют с сывороточным альбумином или его вариантом для изменения периода полувыведения связывающей молекулы из сыворотки. В другом варианте осуществления связывающая молекула представляет собой антитело, которое содержит антигенсвязывающий сайт для сывороточного альбумина. В другом варианте осуществления связывающая молекула и в частности тело антитела по настоящему изобретению могут содержать пептидную последовательность, которая связывается с сывороточным белком.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать линкер или линкеры. Линкеры могут использоваться для соединения вместе частей связывающей молекулы. В одном из вариантов осуществления связывающие сайты разделены линкерами. В одном из предпочтительных вариантов осуществления, когда связывающая молекула содержит по меньшей мере один линкер, она будет содержать глицин/сериновый линкер, такой как GS или G4S (GGGGS), или множество копий одного или обоих таких линкеров. В одном из вариантов осуществления можно использовать одиночные линкеры G4S. В одном из вариантов осуществления линкер может содержать множество единиц G4S, например, где каждый линкер может иметь от 1 до 7 повторов этой последовательности. В одном из вариантов осуществления

последовательно расположены от 1 до 5 линкерных единиц G4S. В настоящем изобретении можно использовать любой подходящий линкер; например, в тех вариантах осуществления, в которых используется конкретный линкер G4S, предусмотрен альтернативный вариант осуществления, в котором линкер не ограничен линкерной последовательностью G4S и может быть любым подходящим линкером. В одном из вариантов осуществления, где три домена VHH расположены последовательно на одном и том же полипептиде для разделения доменов VHH можно использовать линкеры, например, по обе стороны от среднего VHH, чтобы отделить его от других доменов VHH.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать шарнирную область. В случае (четырёхвалентных) форматов IgG, включающих VH и VL, такая шарнирная область обычно соединяет домен CH1 с доменом CH2. В случае VHH такая шарнирная область обычно соединяет C-концевой sdAB/VHH с частью Fc. В одном из вариантов осуществления шарнир может представлять собой шарнирную область IgG1 или 2, или 3, или 4. Такая шарнирная область может быть человеческой шарнирной областью. В одном из вариантов осуществления шарнирная область представляет собой консенсусную последовательность человеческого IgG1. В одном из вариантов осуществления шарнирная область представляет собой область дурвалумаба. В одном из вариантов осуществления шарнирная область может представлять собой вариант шарнирной области дурвалумаба.

Ряд полипептидов, представленных в настоящем описании, включают сигнальную или лидерную последовательность. В некоторых случаях, особенно предпочтительным полипептидом является полипептид, в котором сигнальная или лидерная последовательность удалена.

Фармацевтические композиции

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: (a) связывающую молекулу и в частности антитело по настоящему изобретению; и (b) фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или наполнитель. В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция содержит связывающую молекулу по настоящему изобретению, которая представляет собой антитело. В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит связывающую молекулу по настоящему изобретению, а также носитель, стабилизатор, наполнитель, разбавитель, солюбилизатор, поверхностно-активное вещество, эмульгатор, консервант и/или адьювант. В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению находится в твердой или жидкой форме. В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция может быть в форме порошка, таблетки, раствора или аэрозоля. В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению представлена в замороженной форме.

Композиция по настоящему изобретению обычно поставляется в виде стерильной фармацевтической композиции. Фармацевтическая композиция по настоящему

изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый адъювант. В другом варианте осуществления такой адъювант не присутствует в фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Настоящее изобретение также относится к способу приготовления фармацевтической или лекарственной композиции, включающему добавление и смешивание связывающей молекулы, в частности антитела, по настоящему изобретению вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми наполнителями, разбавителями или носителями.

Фармацевтически приемлемые носители в терапевтических композициях могут дополнительно содержать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. Такие носители можно использовать, например, для приготовления фармацевтических композиций в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, кашицы и суспензий для приема внутрь пациентом. Термин «фармацевтически приемлемый наполнитель», используемый в настоящем описании, обычно относится к фармацевтически приемлемому носителю, раствору или добавке для улучшения желаемых характеристик композиций по настоящему изобретению. Наполнители хорошо известны в данной области и включают буферы (например, цитратный буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер и бикарбонатный буфер), аминокислоты, мочевины, спирты, аскорбиновую кислоту, фосфолипиды, белки (например, сывороточный альбумин), ЭДТА, хлорид натрия, липосомы, маннит, сорбит и глицерин. Растворы или суспензии могут быть инкапсулированы в липосомы или биоразлагаемые микросферы. Подходящими носителями могут быть крупные, медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и неактивные вирусные частицы. Могут быть использованы фармацевтически приемлемые соли, например, соли минеральных кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты и сульфаты, или соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты и бензоаты.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать материалы состава для модификации, поддержания или сохранения определенных характеристик композиции, таких как pH, осмолярность, вязкость, прозрачность, цвет, изотоничность, запах, стерильность, стабильность, скорость растворения или высвобождения, адсорбция или проникновение. Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей доступно в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J., 1991). Дополнительные фармацевтические композиции включают составы, включая составы с пролонгированной или контролируемой доставкой, содержащие связывающую молекулу по настоящему изобретению. Методы приготовления составов различных средств с замедленной или контролируемой доставкой известны специалистам в данной области. Связывающая молекула по настоящему изобретению также может быть заключена в микрокапсулы, приготовленные, например, методами коацервации или межфазной полимеризацией, в коллоидные системы доставки лекарственного средства или в макроэмульсии. Такие методы также раскрыты в

Remington's Pharmaceutical Sciences.

Субъекту обычно вводят терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции и, следовательно, связывающей молекулы по настоящему изобретению. Термин «терапевтически эффективное количество» обычно относится к количеству терапевтического агента, необходимому для лечения, облегчения или профилактики целевого заболевания или состояния или для проявления детектируемого терапевтического или профилактического эффекта. Точное терапевтически эффективное количество для человека будет зависеть от тяжести болезненного состояния, общего состояния здоровья субъекта, возраста, веса и пола субъекта, диеты, времени и частоты введения, комбинации(й) лекарственных средств, чувствительности реакции и толерантности/ответа на терапию. Это количество может быть определено путем обычных экспериментов и находится в пределах компетенции врача. Обычно терапевтически эффективное количество составляет от 0,01 до 50 мг/кг, например, от 0,1 до 20 мг/кг в сутки. Альтернативно, доза может составлять от 1 до 500 мг в сутки, например, от 10 до 100, 200, 300 или 400 мг в сутки. В одном из вариантов осуществления количество в данной дозе является по меньшей мере достаточным для реализации конкретной функции.

В одном из вариантов осуществления связывающую молекулу по настоящему изобретению можно вводить в комбинации с другим лекарственным средством для лечения заболевания, подлежащего лечению и в частности с блокатором TNF-альфа. В одном из вариантов осуществления второе лекарственное средство, вместе с которым используют связывающую молекулу по настоящему изобретению, является противовоспалительным средством. Например, связывающая молекула по настоящему изобретению может быть введена одновременно с дополнительным агентом, последовательно или отдельно от него. В другом варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может быть представлена в той же фармацевтической композиции, что и второй терапевтический агент. Примеры блокаторов TNF-альфа, которые можно использовать в сочетании со связывающей молекулой по настоящему изобретению, включают, без ограничения, инфликсимаб, адалимумаб, этанерцепт, голимумаб и цертолизумаб. В одном из вариантов осуществления второе лекарственное средство представляет собой TNF-альфа-специфическое антитело. В одном из вариантов осуществления второе вводимое лекарственное средство может представлять собой стероид.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления терапевтический агент по изобретению в фармацевтическом препарате может присутствовать в виде дозированных форм. Подходящие дозы могут быть рассчитаны для пациентов в соответствии с их весом, например, подходящие дозы могут находиться в диапазоне от 0,01 до 20 мг/кг, например, от 0,1 до 20 мг/кг, например от 1 до 20 мг/кг, например от 10 до 20 мг/кг или, например, от 1 до 15 мг/кг, например, от 10 до 15 мг/кг. Для эффективного лечения состояний у человека, применительно к настоящему изобретению, подходящие дозы могут находиться в диапазоне от 0,01 до 1000 мг, например от 0,1 до 1000 мг, например от 0,1 до 500 мг,

например 500 мг, например от 0,1 до 100 мг, или от 0,1 до 80 мг, или от 0,1 до 60 мг, или от 0,1 до 40 мг, или например от 1 до 100 мг, или от 1 до 50 мг белка с двойным нацеливанием по настоящему изобретению, которые можно вводить парентерально, например, подкожно, внутривенно или внутримышечно. Такую дозу можно, при необходимости, повторять через соответствующие промежутки времени, выбранные врачом. Связывающая молекула по настоящему изобретению может быть, например, лиофилизирована для хранения и восстановлена в подходящем носителе перед использованием. Могут быть использованы методы лиофилизации и восстановления.

Связывающие молекулы и фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить с помощью любого количества способов, включая, без ограничения, пероральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, интратекальный, внутрижелудочковый, трансдермальный, чрескожный (например, см. WO 98/20734), подкожный, внутрибрюшинный, интраназальный, энтеральный, топический, сублингвальный, интравагинальный или ректальный. Для введения фармацевтических композиций по изобретению также можно использовать гипоспрей. Прямую доставку композиций обычно осуществляют путем инъекции, подкожно, внутрибрюшинно, внутривенно или внутримышечно, или путем доставки в интерстициальное пространство ткани. В одном из предпочтительных вариантов осуществления введение осуществляют путем внутривенного введения, например, в одном из предпочтительных вариантов осуществления введение осуществляют путем внутривенной инъекции. В другом предпочтительном варианте осуществления введение осуществляют путем подкожного введения, например, путем подкожной инъекции. Композиции также можно вводить в конкретную представляющую интерес ткань. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу по настоящему изобретению вводят методами сайт-специфической или адресной местной доставки. Примеры методов точечной или целевой местной доставки включают различные имплантируемые источники депо связывающей молекулы или катетеры для местной доставки, такие как инфузионные катетеры, постоянные катетеры или игольчатые катетеры, синтетические трансплантаты, адвентициальные оболочки, шунты и стенты или другие имплантируемые устройства, сайт-специфические носители, прямая инъекция или непосредственное нанесение.

Дозированное лечение может представлять собой схему с применением однократной дозы или схему с применением нескольких доз. Если продукт предназначен для инъекций или инфузий, он может иметь форму суспензии, раствора или эмульсии в масляном или водном носителе и может содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, консервирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, связывающая молекула, в частности антитело, может находиться в сухой форме для восстановления перед использованием подходящей стерильной жидкостью. В одном из вариантов осуществления фармацевтическую композицию, содержащую связывающую молекулу по настоящему изобретению, предоставляют в

лиофилизированной форме. Если композицию следует вводить путем введения через желудочно-кишечный тракт, композиция должна будет содержать агенты, которые защищают связывающий белок от деградации, но высвобождают связывающую молекулу после ее абсорбции из желудочно-кишечного тракта. В другом варианте осуществления распыляемый состав по настоящему изобретению может быть представлен, например, в виде разовых доз (например, герметичных пластиковых контейнеров или флаконов), упакованных в конверты из фольги. Каждый флакон содержит единичную дозу растворителя/буферного раствора в объеме, например, 2 мл.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть представлена в упаковке, обеспечивающей средства для введения субъекту. В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть предоставлена в предварительно заполненном шприце. Таким образом, настоящее изобретение предусматривает такой наполненный шприц. Также предлагается автоинжектор, загруженный фармацевтической композицией по настоящему изобретению.

В одном из вариантов осуществления состав представлен в виде состава для топического применения, включая ингаляцию. Подходящие препараты для ингаляции включают порошки для ингаляции, дозированные аэрозоли, содержащие газы-пропелленты, или растворы для ингаляции, не содержащие газов-пропеллентов. Ингаляционные порошки согласно изобретению, содержащие активное вещество, могут состоять исключительно из вышеупомянутых активных веществ или из смеси вышеупомянутых активных веществ с физиологически приемлемым наполнителем. Эти порошки для ингаляции могут включать моносахариды (например, глюкозу или арабинозу), дисахариды (например, лактозу, сахарозу, мальтозу), олиго- и полисахариды (например, декстраны), полиспирты (например, сорбит, маннит, ксилит), соли (например, хлорид натрия, карбонат кальция) или их смеси. Подходящим образом можно использовать моно- или дисахариды, лактозу или глюкозу, в частности, но не исключительно, в форме их гидратов.

Частицы для осаждения в легких должны иметь размер менее 10 микрон, например, 1-9 микрон, например от 1 до 5 микрон. Размер частиц активного ингредиента (такого как антигено или фрагмент) имеет первостепенное значение. Газы-пропелленты, которые можно использовать для приготовления ингаляционных аэрозолей, известны в данной области техники. Подходящие газы-пропелленты выбирают из углеводородов, таких как н-пропан, н-бутан или изобутан, и галогидроуглеводородов, таких как хлорированные и/или фторированные производные метана, этана, пропана, бутана, циклопропана или циклобутана. Вышеупомянутые газы-пропелленты можно использовать отдельно или в виде смеси. Особенно подходящими газами-пропеллентами являются производные галогенированных алканов, выбранные из TG11, TG12, TG134a и TG227. Из вышеупомянутых галогенированных углеводородов особенно подходящими являются TG134a (1,1,1,2-тетрафторэтан) и TG227 (1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан) и их смеси.

Содержащие газ-пропеллент ингаляционные аэрозоли могут также содержать другие ингредиенты, такие как сорастворители, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества (сурфактанты), антиоксиданты, смазочные материалы и средства для регулирования pH. Все эти ингредиенты известны в данной области. Содержащие газ-пропеллент аэрозоли для ингаляции по изобретению могут содержать до 5 мас.% активного вещества. Содержание активного вещества в аэрозолях по изобретению может составлять, например, от 0,002 до 5% по массе, от 0,01 до 3% по массе, от 0,015 до 2% по массе, от 0,1 до 2% по массе, от 0,5 до 2% по массе или от 0,5 до 1% по массе.

В качестве альтернативы, топическое введение в легкие также возможно путем введения жидкого раствора или суспензии, например, с помощью такого устройства, как распылитель, например, распылитель, соединенный с компрессором (например, Pari LC-Jet Plus® небулайзер, подключенный к компрессору Pari Master® производства Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

Распыляемый состав по настоящему изобретению может предоставляться, например, в виде единичных дозированных форм (например, запечатанных пластиковых контейнеров или флаконов), упакованных в конверты из фольги. Каждый флакон содержит единичную дозу растворителя/буфера в объеме, например, 2 мл. Настоящее изобретение также предлагает шприц, наполненный композицией, содержащей связывающую молекулу, в частности антитело, по настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления предусмотрен предварительно заполненный шприц, загруженный единичной дозой связывающей молекулы, в частности антитела, по изобретению. В другом варианте осуществления предложен автоматический инжектор, загруженный связывающей молекулой, в частности антителом, по настоящему изобретению. В следующем варианте осуществления предложен пакет для внутривенной инфузии, наполненный связывающей молекулой, в частности антителом, по настоящему изобретению. Также предложена связывающая молекула, в частности антитело, по настоящему изобретению в лиофилизированной форме во флаконе или аналогичном сосуде в лиофилизированной форме.

Также предусмотрено, что связывающую молекулу по настоящему изобретению можно вводить с помощью генной терапии. Для достижения этой цели пациенту вводят последовательности ДНК, кодирующие необходимые полипептиды, например, тяжелые и легкие цепи молекулы антитела, под контролем соответствующих компонентов ДНК, в результате чего цепи антител экспрессируются из последовательностей ДНК и собираются *in situ*.

После приготовления состава композиции по настоящему изобретению можно вводить непосредственно субъекту. Субъектами, подлежащими лечению, могут быть животные. Однако в одном или более вариантах осуществления композиции адаптированы для введения людям. В особенно предпочтительном варианте осуществления субъектом является человек.

В одном из вариантов осуществления, когда связывающую молекулу по

настоящему изобретению вводят вместе с другим агентом, оба средства можно вводить одновременно, последовательно или раздельно. В одном из вариантов осуществления оба препарата можно назначать в одной и той же фармацевтической композиции.

В одном из вариантов осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят до, одновременно и/или после трансплантации. Например, ее можно вводить одновременно с трансплантацией клеток, тканей или органов, таких как любые из упомянутых в настоящем описании. В другом варианте осуществления перед трансплантацией трансплантируемый субъекту материал может быть обработан *ex vivo*. В одном из вариантов осуществления связывающую молекулу по настоящему изобретению используют для предотвращения или уменьшения отторжения трансплантированного материала. В одном из вариантов осуществления ее используют для профилактики, лечения или улучшения иммунного ответа против трансплантированного материала. В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления ее используют для этой цели в отношении реакции «трансплантат против хозяина».

Настоящее изобретение также охватывает набор, включающий связывающую молекулу по изобретению. В одном из вариантов осуществления предоставляется набор, включающий любую из связывающих молекул по изобретению, необязательно с инструкциями по введению. В еще одном варианте осуществления набор дополнительно содержит один или более реагентов для выполнения одного или более функциональных анализов. В другом варианте осуществления предусмотрен набор, содержащий однокамерные или многокамерные предварительно заполненные шприцы. Изобретение также относится к набору для введения одной дозы.

Патологические состояния, медицинское и диагностическое применение

Также предлагается применение связывающей молекулы по настоящему изобретению в качестве лекарственного средства. В другом варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению предлагается для применения в способе терапии человека или животного. Следует отметить, что в различных терапевтических применениях, изложенных в настоящем описании, где упоминается связывающая молекула, также может использоваться фармацевтическая композиция, содержащая связывающую молекулу, и наоборот, если не указано иное. Связывающая молекула по настоящему изобретению также может быть использована в диагностике, включая диагностику как *in vivo*, так и диагностику *in vitro*, например, такую диагностику выполняют на образце, полученном от субъекта.

Как обсуждается ниже, связывающая молекула по настоящему изобретению может быть использована для лечения заболевания. Используемые в настоящем описании термины «лечить» или «лечение» относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, целью которых является профилактика или замедление (уменьшение) нежелательных физиологических изменений или нарушений. Полезные или желаемые клинические результаты включают, без ограничения, облегчение

симптомов, уменьшение тяжести заболевания, стабилизацию (т.е. не ухудшение) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), выявляемую или невыявляемую. «Лечение» также может означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в случае отсутствия лечения. К нуждающимся в лечении относятся те, кто уже страдает этим заболеванием или расстройством, а также те, кто предрасположен к развитию такого состояния или расстройства, или те, у которых необходимо предотвратить развитие состояния или расстройства.

В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может быть использована для модуляции иммунной системы. Например, связывающая молекула по настоящему изобретению может быть использована для стимуляции клеток иммунной системы, например, активации конкретных клеток иммунной системы. В одном из вариантов осуществления клетки можно стимулировать к пролиферации. В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающую молекулу по настоящему изобретению используют для активации клеток, экспрессирующих TNFR2 на своей поверхности. Например, рассматриваемыми клетками могут быть лейкоциты и в частности Т-клетки. В особенно предпочтительном варианте осуществления связывающую молекулу по настоящему изобретению используют для активации Т-reg клеток. Например, связывающая молекула по настоящему изобретению может быть использована для стимуляции Т-reg клеток, которые, в свою очередь, подавляют, уменьшают иммунный ответ или предотвращают формирование иммунного ответа.

Способность настоящего изобретения модулировать иммунную систему означает, что оно представляет собой особенно хороший способ воздействия, например, на аутоиммунное заболевание или воспалительное заболевание. Следовательно, настоящее изобретение обеспечивает связывающую молекулу или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению для использования в способе лечения или профилактики аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания. Настоящее изобретение предлагает связывающую молекулу или фармацевтическую композицию для применения в таком способе, где:

(a) расстройство представляет собой реакцию «трансплантат против хозяина» (GvHD), предпочтительно, когда связывающая молекула предназначена для использования в способе, где ее вводят до, одновременно или после трансплантации клетки, ткани или органа; или

(b) расстройство включает дисфункцию или нежелательную пролиферацию лейкоцитов, предпочтительно Т-клеток, более предпочтительно клеток Teff; такие расстройства могут проявляться в виде дисбаланса Treg по сравнению с клетками Teff, например, из-за увеличения количества или активности Teff, которое не уравнивает количество и/или иммуносупрессивные свойства Treg, и в одном из вариантов

осуществления настоящее изобретение способствует развитию Treg и в частности сдвигу баланса эффекторных клеток до или до примерно нормального.

(с) расстройство выбирают из воспалительного заболевания кишечника (такого как язвенный колит, болезнь Крона и глютеновая болезнь), рассеянного склероза, миастении, аутоиммунных заболеваний кожи, таких как обыкновенная пузырчатка или буллезный пемфигоид, а также диабета 1 типа и атеросклероза.

Настоящее изобретение может быть использовано при лечении реакции «трансплантат против хозяина» (GVHD). В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение применяется для стимуляции активности Treg перед трансплантацией клеток, тканей или органов. Например, в одном из вариантов осуществления настоящее изобретение используется для стимуляции активности Treg перед трансплантацией клеток, в частности, перед трансплантацией стволовых клеток и предпочтительно перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. В другом варианте осуществления вместо стимуляции Treg у реципиента перед трансплантацией изобретение используется для увеличения количества Treg в клетках, ткани или органе, которые подлежат трансплантации хозяину. В следующем варианте их используют как часть лечения доброкачественных заболеваний системы кроветворения.

Настоящее изобретение можно использовать для уменьшения, профилактики или лечения иммунного ответа против трансплантата, например, против трансплантированных клеток, ткани или органа. Следовательно, изобретение можно использовать для уменьшения, профилактики или лечения заболевания «трансплантат против хозяина» (GVHD). В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение можно использовать для трансплантации клеток, таких как клеточная популяция. В одном из вариантов осуществления трансплантированный материал представляет собой гемопоэтические стволовые клетки (HSC) или содержит их. В другом варианте осуществления трансплантируемый материал может представлять собой орган или ткань, например, трансплантат сердца, легкого, почки, роговицы или другого органа. В другом варианте осуществления трансплантируемый материал может представлять собой трансплантат, например, кожный трансплантат. В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способу, включающему введение связывающей молекулы по настоящему изобретению для лечения, профилактики или ослабления нежелательного иммунного ответа против трансплантированных клеток, тканей или органов. В одном из вариантов осуществления способ может дополнительно включать проведение трансплантации. В другом варианте осуществления связывающую молекулу по настоящему изобретению вводят субъекту до, во время и/или после трансплантации. В дополнительном варианте осуществления вместо введения субъекту связывающей молекулы способ включает обработку подлежащего трансплантации материала *ex vivo* связывающей молекулой до его трансплантации.

В одном из вариантов осуществления вместо лечения, профилактики или облегчения самого заболевания, изобретение применяется для гарантии эффективности

лечения заболевания, а именно трансплантации клеток, ткани или органа, путем предотвращения или снижения тяжести GVHD. Следовательно, настоящее изобретение можно использовать в различных вариантах осуществления, где заболевание лечат путем трансплантации клеток, ткани или органа. В одном из предпочтительных вариантов осуществления состояние можно лечить путем трансплантации стволовых клеток, например, трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSC). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или иным образом страдает метаболическим нарушением накопления, которое подлежит лечению трансплантацией. Субъект может страдать или быть пораженным иным образом метаболическим расстройством, выбранным из группы, состоящей из болезней накопления гликогена, мукополисахаридозов, болезни Гоше, болезни Гурлера, сфинголипидозов, метахроматической лейкодистрофии или любых других заболеваний или расстройств, при которых могут быть полезны способы лечения и терапии, раскрытые в настоящем описании, включая, без ограничения, тяжелый комбинированный иммунодефицит, синдром Вискотта-Олдрича, синдром гипериммуноглобулина М (IgM), болезнь Чедиака-Хигаси, наследственный лимфогистиоцитоз, остеопетроз, несовершенный остеогенез, болезни накопления, большую талассемию, серповидноклеточную анемию, системный склероз, системную красную волчанку, рассеянный склероз, ювенильный ревматоидный артрит и те заболевания или расстройства, которые описаны в работе «Bone Marrow Transplantation for Non-Malignant Disease,» ASH Education Book, 1:319-338 (2000), раскрытие которой включено в настоящее описание во всей полноте посредством ссылки, поскольку она относится к патологиям, которые можно лечить путем трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В одном из вариантов осуществления, когда изобретение касается трансплантации, может быть осуществлен перенос аллогенных клеток, тканей или органов. В одном из вариантов осуществления перенесенные клетки могут представлять собой клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления субъект нуждается в терапии Т-клетками с химерными антигенными рецепторами (CART). Например, такая терапия может быть частью способа настоящего изобретения. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу стимуляции приживания популяции клеток, ткани или органа у субъекта путем лечения, снижения иммунного ответа или предотвращения развития иммунного ответа против указанной популяции, ткани или органа.

Способность связывающей молекулы по настоящему изобретению модулировать иммунную систему также делает ее особенно ценным подходом для борьбы с аутоиммунными заболеваниями. Следовательно, в другом варианте осуществления субъект, подлежащий лечению, страдает аутоиммунным заболеванием. В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой рассеянный склероз. В следующем конкретном предпочтительном варианте осуществления субъект страдает язвенным колитом. В другом особенно

предпочтительном варианте осуществления состояние представляет собой склеродермию. В одном из вариантов осуществления заболевание, подлежащее лечению, является волчанкой. Дополнительные примеры аутоиммунных заболеваний включают склеродермию, болезнь Крона, диабет 1 типа или другую аутоиммунную патологию, раскрытую в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления аутоиммунное заболевание, подлежащее лечению, выбирают из язвенного колита, болезни Крона, глютеновой болезни, воспалительного заболевания кишечника, рассеянного склероза, волчанки, болезни Грейвса и диабета 1 типа. В одном из вариантов осуществления лечение предоставляется субъекту с диабетом 1 типа. В одном из вариантов осуществления состояние представляет собой атеросклероз.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления состояние, подлежащее лечению, представляет собой состояние, связанное с нежелательным воспалением. В одном из предпочтительных вариантов осуществления состояние представляет собой артрит. Например, настоящее изобретение можно использовать для лечения ревматоидного артрита или остеоартрита. Неограничивающие примеры заболеваний, которые можно лечить, включают ревматоидный артрит, полиартикулярный ювенильный идиопатический артрит, псориатический артрит и детский артрит. В другом предпочтительном варианте осуществления состояние, подлежащее лечению, выбирают из рассеянного склероза, анкилозирующего спондилита, болезни Крона и язвенного колита.

В одном из вариантов осуществления способность изобретения стимулировать Treg клетки используется как способ лечения аллергии. В другом варианте осуществления способность стимулировать Treg клетки может быть использована как способ лечения астмы.

Детектирование и диагностика

Связывающая молекула по настоящему изобретению может быть использована для детектирования TNFR2. Например, настоящее изобретение относится к способу, включающему приведение в контакт связывающей молекулы по настоящему изобретению с тестируемым образцом и детектирование любого связывания связывающей молекулы. Связывающая молекула по настоящему изобретению может быть помечена или связана с ферментом, который позволяет обнаружить связывающую молекулу и, следовательно, определить, что произошло связывание связывающей молекулы. В одном из вариантов осуществления такими методами детектирования могут быть, например, анализы ELISA или проточная цитометрия как способ определения, экспрессируют ли клетки в тестируемом образце TNFR2 на своей поверхности. Связывающая молекула по настоящему изобретению может быть использована для детектирования *in vitro*, ее также можно использовать для детектирования TNFR2 *in vivo*.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способу детектирования TNFR2 *in vivo*, который включает введение меченой связывающей молекулы по настоящему изобретению и последующее определение местоположения

антитела в организме субъекта. В другом варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может быть использована для диагностики состояния, например, для выявления снижения количества клеток, экспрессирующих TNFR2, в частности снижения конкретного подмножества клеток, экспрессирующих TNFR2. В одном из предпочтительных вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способу стратификации пациентов, включающему разделение пациентов на группы на основе уровня TNFR2, например, на основе уровня конкретного типа клеток, экспрессирующих TNFR2.

Настоящее изобретение также относится к набору для детектирования TNFR2, содержащему связывающую молекулу по настоящему изобретению и, необязательно, инструкции по применению связывающей молекулы в способе детектирования TNFR2.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к связывающей молекуле по настоящему изобретению в качестве сопутствующего диагностического средства, например, для определения, следует ли вводить лекарственное средство субъекту, исходя из результатов детектирования TNFR2, такого как уровни TNFR2, например, количество конкретных типов клеток, экспрессирующих TNFR2, или их местоположение.

Связывающая молекула по настоящему изобретению может быть использована для визуализации. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула может быть использована для визуализации *in vivo*. Таким образом, также предлагается способ визуализации, включающий введение субъекту меченой связывающей молекулы по настоящему изобретению и последующее детектирование метки. В одном из вариантов осуществления визуализация позволяет обнаружить клетки, экспрессирующие TNFR2 *in vivo*. В одном из вариантов осуществления такие способы можно использовать для выявления локализации или скоплений таких клеток. В другом варианте осуществления связывающие молекулы можно использовать в способе визуализации *in vitro*.

Как обсуждалось в настоящем описании, настоящее изобретение может быть использовано для лечения субъекта. Под «субъектом», или «индивидуумом», или «животным», или «пациентом», или «млекопитающим» подразумевается любой субъект, в частности субъект-млекопитающее, для которого желательны диагностика, прогноз или терапия. Субъекты-млекопитающие включают людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных, а также животных из зоопарков, животных, используемых для спорта, или домашних питомцев, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и т.д. В особенно предпочтительном варианте осуществления субъектом является человек.

Связывающие молекулы по настоящему изобретению также можно использовать для стимуляции пролиферации Т-клеток и в частности пролиферации Т-reg клеток. В одном из вариантов осуществления такой метод осуществляют *in vitro* или *ex vivo*, например, путем приведения в контакт Т-reg клеток со связывающей молекулой по настоящему изобретению. В другом варианте осуществления настоящее изобретение

может дополнительно включать последующий перенос клеток субъекту, например, после размножения популяции T-reg клеток или после контакта со связывающей молекулой, следовательно, пролиферация происходит *in vivo* после того, как клетки были перенесены субъекту.

Дополнительные варианты осуществления

Настоящее изобретение также относится к способу лечения или профилактики аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания по настоящему изобретению у субъекта, страдающего этим заболеванием или подверженного риску его возникновения.

Настоящее изобретение также относится к способу, предназначенному для лечения или профилактики реакции «трансплантат против хозяина» (GvHD), где способ включает введение связывающей молекулы субъекту и трансплантацию клетки, ткани или органа субъекту, при этом связывающую молекулу вводят субъекту до, во время или после трансплантации.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу, где:

(a) расстройство включает уменьшение количества, дисфункции или нежелательной пролиферации лейкоцитов, предпочтительно T-клеток, более предпочтительно Treg клеток; или

(b) возможно улучшение при расстройстве за счет увеличения количества и/или функции Treg

(c) расстройство выбирают из воспалительного заболевания кишечника (такого как язвенный колит, болезнь Крона и глютеновая болезнь), атеросклероза, волчанки, рассеянного склероза, диабета 1 типа, миастении, обыкновенной пузырчатки и буллезного пемфигоида.

Настоящее изобретение также относится к применению связывающей молекулы по настоящему изобретению для производства лекарственного средства для применения в способе лечения или профилактики аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания.

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению, при котором лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения:

(a) расстройства, включающего дисфункцию или нежелательную пролиферацию лейкоцитов, предпочтительно T-клеток, более предпочтительно Treg клеток; или

(b) расстройства, выбранного из воспалительного заболевания кишечника (такого как язвенный колит, болезнь Крона или целиакия), волчанки, рассеянного склероза, диабета 1 типа, атеросклероза, миастении, обыкновенной пузырчатки и буллезного пемфигоида.

Настоящее изобретение также относится к способу диагностики, включающему введение субъекту связывающей молекулы по настоящему изобретению и детектирование связывания связывающей молекулы с TNFR2, где предпочтительно связывающая молекула является меченой, и связывание связывающей молекулы с TNFR2 детектируют

с помощью метки.

Пронумерованные варианты осуществления

Ниже представлены дополнительные предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения:

[1]. Связывающая молекула, которая специфически связывает TNFR2, но не TNFR1, где связывающая молекула представляет собой Fc γ R-независимый агонист TNFR2 и имеет валентность для связывания TNFR2, равную по меньшей мере двум.

[2]. Связывающая молекула по [1], где связывающая молекула способна:

- (a) олигомеризовать TNFR2 на поверхности клетки, экспрессирующей TNFR2, предпочтительно кластеризовать шесть или более молекул TNFR2 на поверхности клетки;
- (b) запускать передачу сигналов TNFR2; и/или
- (c) стимулировать пролиферацию лейкоцитов, предпочтительно Т-клеток, более предпочтительно Treg клеток.

[3]. Связывающая молекула по [1] или [2], где:

(a) связывающая молекула содержит фрагмент, который изменяет период полувыведения из сыворотки, предпочтительно, где фрагмент выбирают из группы, состоящей из хвоста Fc, сывороточного альбумина, фрагмента, который является связывающим агентом сывороточного альбумина, и ПЭГ;

- (a) связывающая молекула является двухвалентной для связывания TNFR2;
- (b) связывающая молекула является трехвалентной для связывания TNFR2;
- (c) связывающая молекула является четырехвалентной для связывания TNFR2; или
- (d) связывающая молекула, имеющая валентность для связывания TNFR2, равную по меньшей мере четырем.

[4]. Связывающая молекула по любому из [1]-[3], где:

- (a) связывающая молекула представляет собой антитело;
- (b) связывающая молекула представляет собой антитело, которое содержит лиганд TNFR2;

(c) связывающая молекула содержит по меньшей мере часть константной области антитела, предпочтительно область Fc; или

(d) связывающая молекула содержит лиганд TNFR2, где предпочтительно лиганд получают из TNF α или лимфотоксина-альфа,

где предпочтительно связывающая молекула представляет собой:

- (a) антитело, которое содержит TNFR2-связывающий сайт как на N-конце, так и на C-конце одной или более тяжелых цепей антитела; или
- (b) антитело, которое содержит TNFR2-связывающий сайт как на N-конце, так и на C-конце одной или более легких цепей антитела.

[5]. Связывающая молекула по [4], где:

- (a) антитело представляет собой двухвалентное антитело;
- (b) антитело представляет собой трехвалентное антитело;
- (c) антитело представляет собой четырехвалентное антитело;

(d) антитело представляет собой шестивалентное антитело;
 (e) антитело представляет собой антитело, содержащее только тяжелые цепи;
 (f) антитело представляет собой однодоменное антитело, такое как однодоменное Ab (sdAb), VHH или нанотело;

(g) антитело представляет собой мультимер из по меньшей мере двух антител;

(h) антитело содержит или связано с мультимеризующим фрагментом, предпочтительно пептидом тенасцина-с (TNC), где предпочтительно антитело представляет собой мультимер по меньшей мере из двух антител, связанных через последовательность пептида тенасцина-с;

(i) антитело связано с одной или более молекулами, полученными из лиганда TNFR2, предпочтительно полученными из TNF- α или лимфотоксина альфа.

[6]. Связывающая молекула по [4] или [5], где:

(a) в антителе отсутствует область Fc; или

(b) антитело содержит модифицированную область Fc, которая не способна связываться с рецепторами Fc.

[7]. Связывающая молекула по любому из предшествующих пунктов, где связывающая молекула представляет собой антитело в формате антитела, выбранного из:

- IgG с модификацией Fc, устраняющей связывание с рецептором Fc;

- scFv:IgG, где IgG имеет модификацию Fc, устраняющую связывание с рецептором Fc;

- IgG-NC:TNC, где IgG имеет модификацию, устраняющую связывание с рецептором Fc;

- scFv:IgG-NC:TNC, где IgG имеет модификацию, устраняющую связывание с рецептором Fc; и

- гексамерный IgG;

где:

- NC представляет собой тяжелую цепь IgG;

- LC представляет собой легкую цепь IgG;

- scFv:IgG представляет scFv, либо связанный с молекулой IgG, либо образующий ее часть; и

- NC:TNC указывает на тяжелую цепь (NC), содержащую или связанную с пептидом домена тримеризации тенасцина-с (TNC).

[8]. Связывающая молекула по любому из [1]-[7], где связывающая молекула представляет собой антитело в формате антитела, выбранного из группы, состоящей из:

- Fab-LC:scFv;

- IgG-NC:scFv, где IgG имеет модификацию, устраняющую связывание с рецептором Fc, предпочтительно N297A;

- IgG-LC:scFv, где IgG имеет модификацию, устраняющую связывание с рецептором Fc, предпочтительно N297A;

- IgG-LC:scFv-NC:scFv;

- LC:scFv-HC:scFv-IgG-HC:scFv;
- LC:scFv-HC:scFv-IgG-LC:scFv;
- LC:scFv-HC:scFv-IgG-LC:scFv-HC:scFv; и
- IgG-HC-TNC-scFv;
- sdAb/VHH

где:

- HC представляет собой тяжелую цепь IgG;
- LC представляет собой легкую цепь IgG;
- LC:scFv указывает на scFv, связанный с легкой цепью или образующий ее часть;
- HC:scFv указывает на scFv, связанный с тяжелой цепью или образующий ее часть;
- HC:TNC указывает тяжелую цепь (HC), содержащую тенасцин (TNC) или

связанную с ним;

- TNC-scFv указывает тенасцин, связанный или соединенный с scFv;

- sdAb указывает на однодоменное антитело; и

- VHH указывает на переменную область тяжелой цепи верблюжьего антитела,

где предпочтительно связывающая молекула представляет собой антитело и имеет

формат антитела, выбранный из:

- Fab-scFv;
- IgG-HC:scFv;
- LC:scFv-HC:scFv-IgG1; и
- LC:scFv-HC:scFv-IgG1-TNC.

[9]. Связывающая молекула, которая специфически связывает TNFR2, но не TNFR1, где связывающая молекула представляет собой Fc γ R-независимый агонист TNFR2, имеет валентность для связывания TNFR2, равную по меньшей мере двум, и содержит полипептиды, содержащие мутантный TNF-альфа, который связывается с TNFR2, но не TNFR1, и область Fc или пептидную последовательность тенасцина, или и то, и другое, которые олигомеризуют полипептиды,

где предпочтительно связывающая молекула представляет собой молекулу:

(а) которая не содержит последовательности антител;

(b) которая содержит полипептиды, содержащие мутантный TNF-альфа, который связывает TNFR2, но не TNFR1, и пептид тенасцина;

(с) где мутанты TNF-альфа представляют собой TNF80; и/или

(d) которая имеет валентность для TNFR2, равную по меньшей мере трем, предпочтительно имеет валентность для TNFR2, равную шести.

[10]. Связывающая молекула по любому из [1]-[10] для применения в качестве лекарственного средства.

[11]. Связывающая молекула по любому из [1]-[9] для применения в способе лечения или профилактики аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания,

где предпочтительно:

(a) расстройство представляет собой реакцию «трансплантат против хозяина» (GvHD), где предпочтительно связывающая молекула предназначена для использования в способе, где ее вводят до, одновременно или после трансплантации клетки, ткани или органа; или

(b) расстройство включает дисфункцию или нежелательную пролиферацию лейкоцитов, предпочтительно Т-клеток, более предпочтительно Treg клеток; или

(c) расстройство выбирают из воспалительного заболевания кишечника (такого как язвенный колит, болезнь Крона или глютеновая болезнь), атеросклероза, волчанки, рассеянного склероза, диабета 1 типа, миастении, обыкновенной пузырчатки и буллезного пемфигоида.

[12]. Способ стимуляции пролиферации клеток, включающий приведение в контакт клетки-мишени, экспрессирующей TNFR2, со связывающей молекулой по любому из пунктов [1]-[9].

[13]. Фармацевтическая композиция, содержащая связывающую молекулу по любому из [1]-[9] и фармацевтически приемлемый носитель.

[14]. Способ детектирования TNFR2, включающий приведение тестируемого образца в контакт со связывающей молекулой по любому из [1]-[9] и детектирование связывания связывающей молекулы с TNFR2,

где предпочтительно связывающая молекула является меченной и связывание связывающей молекулы с TNFR2 детектируют с помощью метки.

[15]. Связывающая молекула по любому из [1]-[9] для применения в способе диагностики, где способ включает введение субъекту связывающей молекулы по любому из [1]-[15] и детектирование связывания связывающей молекулы с TNFR2,

где предпочтительно связывающая молекула является меченной и связывание связывающей молекулы с TNFR2 детектируют с помощью метки.

Все документы, упомянутые в настоящем описании, включены посредством ссылки. Ссылка в настоящем описании на единственное число с использованием таких терминов, как «а» и «an», также охватывает множественное число, если специально не указано иное. Если что-то в настоящем документе упоминается как «содержащее» в другом варианте осуществления, изобретение может «по существу состоять из» указанного. В другом варианте осуществления оно может «состоять» из указанного. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют значения, в котором их обычно понимает специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Материалы и методы

Введение

Ниже приведено краткое описание материалов и методов, которые использовались при проведении описанных ниже экспериментов.

Клеточные линии и условия культивирования клеток

Клетки HEK293T, клетки HeLa, клетки HeLa-TNFR2 (Weiss et al., 1997), HT1080-TNFR2 (Gerspach et al., 2006, Cell Death Differ., 13(2):273-284) и клетки Кум-1 культивировали в среде RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Irvine, United Kingdom), дополненной 10% FCS (GIBCO, одобрено ЕС, South America). Клетки культивировали в стандартных условиях (5% CO₂, 37°C).

Клонирование, продуцирование и очистка антител

Фрагменты кДНК, кодирующие тяжелую и легкую цепи TNFR2-специфических антител собственной разработки (Medler et al., 2019), создавали, секвенированы и впоследствии клонировали в вектор экспрессии pCR3 (Invitrogen) стандартными методами ПЦР и клонирования. Варианты (мутанты, слитые белки) цепей антител создавали с помощью синтетических фрагментов ДНК, кодирующих представляющие интерес аминокислотные последовательности, используя стандартные методы клонирования. Плазмиды для экспрессии TNFR2-специфических антител обычно содержали FLAG-метку.

Антитела и варианты антител получали в клетках HEK293T, используя реагенты для трансфекции PEI (полиэтиленимин; Polyscience Inc., Warrington, USA), как описано, например, в Medler and Wajant (2021). Для определения количества белка, секретируемого в супернатант, проводили SDS-PAGE и вестерн-блоттинг против FLAG с использованием стандартного белка, меченного FLAG, собственного производства (антитело ANTI-FLAG M2, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Супернатант, содержащий продуцированные TNFR2-специфические антитела, очищали аффинной хроматографией на агарозе против FLAG. После связывания меченных анти-FLAG антител с аффинным гелем против FLAG M2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) антитела элюировали в присутствии избытка FLAG-пептида (100 мкг/мл, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) и собирали в виде фракций. Очистку проводили в системе с TBS-буфером. Затем для замены TBS на PBS белки диализовали в течение ночи при +4°C.

Немеченные анти-FLAG антитела очищали с помощью хроматографии с белком А с последующей эксклюзионной хроматографией. Чистоту и концентрацию очищенных белков/антител определяли с помощью электрофореза в SDS-PAGE и окрашивания серебром, используя в качестве сравнения набор Amersham для SDS электрофореза «Low Molecular Weight Calibration Kti for SDS Electrophoresis» (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, UK), содержащий определенные количества белков с известной молекулярной массой. Набор для окрашивания серебром приобретали у компании Thermo Scientific (Rockford, USA).

Форматы антител

На фиг. 1 показаны форматы антител, в которых TNFR2-связывающие сайты являются однонаправленно ориентированными N-концевыми, с указанием для каждого из них номенклатуры и архитектуры домена. В названиях различных форматов антител на фигуре используются следующие сокращения: СI=идентификатор клона, например, С4, С19 и т.д.; N297A относится к соответствующей мутации в тяжелой цепи человеческого

IgG1, уменьшающей FcγR-взаимодействие; N-RGY относится к мутации N297A плюс мутациям, способствующим гексамеризации IgG1; и TNC относится к пептиду домена тримеризации тенасцина-С, присутствующему на С-конце тяжелых цепей, который позволяет объединять три отдельных антитела в тримерную форму. Форматы антител и количество связываний N-концевого антигена суммированы в таблице ниже.

Таблицы, обобщающие информацию

Таблица 1 - Антитела, приведенные на фиг. 1 и их валентность

Формат антитела	Валентность для TNFR2
CI-Fab	1
CI-Fab2	2
CI-IgG1(N297A)	2
ScFv:CI-IgG1(297A)	4
CI-IgG1(N297A)-HC:TNC	6
ScFv:CI-IgG1(N297A)-HC:TNC	12
CI-IgG1(N-RGY)	12

На фиг. 7 показаны форматы антител, в которых TNFR2-связывающие сайты организованы как на N-конце, так и на С-конце, где для каждого из них также представлена номенклатура и архитектура домена. Для идентификатора клона, наличия модификации N297A и пептида тримеризации тенасцина используются те же сокращения, что и на фиг. 1.

Таблица 2 - Антитела, приведенные на фиг. 1 и их валентность

Формат антитела	Количество N и С терминально расположенных TNFR2-антигенсвязывающих сайтов, а также общая валентность
CI-Fab-LC:scFvCI	2 (1 N-терминальный и 1 С-терминальный)
CI-IgG1(N297A)-HC:scFvCI	4 (2 N-терминальных и 2 С-терминальных)
CI-IgG1(N297A)-LC:scFvCI	4 (2 N-терминальных и 2 С-терминальных)
CI-IgG1(N297A)-LC:scFvCI- HC:scFvCI	6 (2 N-терминальных и 4 С-терминальных)
LC:scFvCI-HC:scFvCI- IgG1(N297A)-HC:scFvCI	6 (4 N-терминальных и 2 С-терминальных)
LC:scFvCI-HC:scFvCI- IgG1(N297A)-LC:scFvCI	6 (4 N-терминальных и 2 С-терминальных)
LC:scFvCI-HC:scFvCI- IgG1(N297A)-LC:scFvCI- HC:scFvCI	8 (4 N-терминальных и 4 С-терминальных)

CI-IgG1(297A)-HC:TNC-scFvCI	12 (6 N-терминальные и 6 C-терминальных)
-----------------------------	--

В нижеприведенной таблице 3 суммированы связывающие молекулы, представленные на фиг. 1-26, которые описаны в последующих примерах, включая два вектора экспрессии, которые использовались для экспрессии полипептидов для каждого антитела.

Таблица 3 - Белки, приведенные на фиг. 1-27: Аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепей, кодируемые перечисленными экспрессионными плазмидами pDualyx

Название белка	Экспрессионная(ые) плазида(ы)		Экспрессируемые полипептиды
C4-IgG1(N297A)	pDualyx-010pre	pDualyx-011pre	SEQ ID NO: 3 & SEQ ID NO: 28
C4-IgG1-LC:GpL	pDualyx-030pre	pDualyx-029pre	SEQ ID NO: 4 & SEQ ID NO: 29
C4-IgG1(N297A)- HC:scFvC4	pDualyx-010pre	pDualyx-012pre	SEQ ID NO: 3 & SEQ ID NO: 30
C4-IgG1(N297A)- LC:scFvC4	pDualyx-013pre	pDualyx-011pre	SEQ ID NO: 5 & SEQ ID NO: 28
C4-IgG1(N297A)- LC:scFvC4-HC:scFvC4	pDualyx-013pre	pDualyx-012pre	SEQ ID NO: 5 & SEQ ID NO: 30
C4-Fab1	pDualyx-010pre	pDualyx-019pre	SEQ ID NO: 3 & SEQ ID NO: 31
C4-Fab1-LC:scFvC4	pDualyx-013pre	pDualyx-019pre	SEQ ID NO: 5 & SEQ ID NO: 31
C4-Fab2	pDualyx-010pre	pDualyx-020pre	SEQ ID NO: 3 & SEQ ID NO: 32
C4-Fab2-LC:scFvC4	pDualyx-013pre	pDualyx-020pre	SEQ ID NO: 5 & SEQ ID NO: 32
C4-IgG1(N297A)-HC:TNC	pDualyx-010pre	pDualyx-044	SEQ ID NO: 3 & SEQ ID NO: 33
C4-IgG1(N297A)-HC:RGY	pDualyx-010pre	pDualyx-118	SEQ ID NO: 3 & SEQ ID NO: 34
C4-IgG1(N297A)-HC:TNC- scFvC4	pDualyx-010pre	pDualyx-119	SEQ ID NO: 3 & SEQ ID NO: 35
C4(scFv)-IgG1(N297A)	pDualyx-022	pDualyx-021	SEQ ID NO: 6 & SEQ ID NO: 36
C4(scFv)-IgG1(N297A)- LC:scFvC4	pDualyx-023	pDualyx-021	SEQ ID NO: 7 & SEQ ID NO: 36
C4(scFv)-IgG1(N297A)- HC:scFvC4	pDualyx-022	pDualyx-024	SEQ ID NO: 6 & SEQ ID NO: 37
C4(scFv)-IgG1(N297A)- LC:scFvC4-HC:scFvC4	pDualyx-023	pDualyx-024	SEQ ID NO: 7 & SEQ ID NO: 37
C4(scFv)-IgG1(N297A)- HC:TNC	pDualyx-022	pDualyx-051	SEQ ID NO: 6 & SEQ ID NO: 38
C4-IgG1(N297A)- HC:scFvC19	pDualyx-010pre	pDualyx-080	SEQ ID NO: 3 & SEQ ID NO: 39
C4-IgG1(N297A)- HC:scFvC27	pDualyx-010pre	pDualyx-082	SEQ ID NO: 3 & SEQ ID NO: 40
C4-IgG1(N297A)-	pDualyx-010pre	pDualyx-063	SEQ ID NO: 3 &

HC:scFvC40			SEQ ID NO: 41
C19-muIgG1(D265A)	pDualyx-005	pDualyx-006	SEQ ID NO: 8 & SEQ ID NO: 42
C19-IgG1-LC:GpL	pDualyx-032	pDualyx-031	SEQ ID NO: 9 & SEQ ID NO: 43
C27-IgG1(N297A)	pDualyx-092	pDualyx-091	SEQ ID NO: 10 & SEQ ID NO: 44
C27-IgG1(N297A)-LC:GpL	pDualyx-093	pDualyx-091	SEQ ID NO: 11 & SEQ ID NO: 44
C40-IgG1(N297A)	pDualyx-077	pDualyx-075	SEQ ID NO: 12 & SEQ ID NO: 45
C40-IgG1(N297A)-LC:GpL	pDualyx-076	pDualyx-075	SEQ ID NO: 13 & SEQ ID NO: 45
C19-gG1(N297A)- HC:scFvC19	pDualyx-016pre	pDualyx-017pre	SEQ ID NO: 14 & SEQ ID NO: 46
C27-IgG1(N297A)- HC:scFvC27	pDualyx-092	pDualyx-108	SEQ ID NO: 10 & SEQ ID NO: 47
C40-IgG1(N297A)- HC:scFvC40	pDualyx-077	pDualyx-111	SEQ ID NO: 12 & SEQ ID NO: 48
C1-IgG1-LC:GpL	pDualyx-028	pDualyx-027	SEQ ID NO: 15 & SEQ ID NO: 49
C9-IgG1(N297A)-LC:GpL	pDualyx-087	pDualyx-085	SEQ ID NO: 16 & SEQ ID NO: 50
C29-IgG1(N297A)-LC:GpL	pDualyx-090	pDualyx-088	SEQ ID NO: 17 & SEQ ID NO: 51
C31-2-IgG1(N297A)- LC:GpL	pDualyx-071	pDualyx-069	SEQ ID NO: 18 & SEQ ID NO: 52
68/69-IgG1(N297A)- LC:GpL	pDualyx-040pre	pDualyx-041pre	SEQ ID NO: 19 & SEQ ID NO: 53
C19-IgG1(N297A)-HC:TNC	pDualyx-016	pDualyx-149	SEQ ID NO: 14 & SEQ ID NO: 54
C19(scFv)-IgG1(N297A)	pDualyx-151	pDualyx-150	SEQ ID NO: 25 & SEQ ID NO: 55
C19(scFv)-IgG1(N297A)- HC:TNC	pDualyx-151	pDualyx-152	SEQ ID NO: 25 & SEQ ID NO: 56
C19(scFv)-Fab2-HC:TNC	pDualyx-151	pDualyx-153	SEQ ID NO: 25 & SEQ ID NO: 57
C40-IgG1(N297A)-HC:TNC	pDualyx-077	pDualyx-159	SEQ ID NO: 12 & SEQ ID NO: 62
C40(scFv)-IgG1(N297A)	pDualyx-161	pDualyx-160	SEQ ID NO: 27 & SEQ ID NO: 63
C40(scFv)-IgG1(N297A)- HC:TNC	pDualyx-161	pDualyx-162	SEQ ID NO: 27 & SEQ ID NO: 64
C40(scFv)-Fab2-HC:TNC	pDualyx-161	pDualyx-163	SEQ ID NO: 27 & SEQ ID NO: 65
C27-IgG1(N297A)-HC:TNC	pDualyx-092	pDualyx-154	SEQ ID NO: 10 & SEQ ID NO: 58
C27(scFv)-IgG1(N297A)	pDualyx-156	pDualyx-155	SEQ ID NO: 26 & SEQ ID NO: 59
C27(scFv)-IgG1(N297A)- HC:TNC	pDualyx-156	pDualyx-157	SEQ ID NO: 26 & SEQ ID NO: 60

C27(scFv)-Fab2-HC:TNC	pDualyx-156	pDualyx-158	SEQ ID NO: 26 & SEQ ID NO: 61
C4-IgG1(N297A)-LC:GpL-HC:scFvC4	pDualyx-030	pDualyx-012	SEQ ID NO: 4 & SEQ ID NO: 30
C4-Fab1-LC:scFvC9	pDualyx-112	pDualyx-019	SEQ ID NO: 20 & SEQ ID NO: 31
C4-Fab1-LC:scFvC27	pDualyx-113	pDualyx-019	SEQ ID NO: 21 & SEQ ID NO: 31
C4-Fab1-LC:scFvC29	pDualyx-114	pDualyx-019	SEQ ID NO: 22 & SEQ ID NO: 31
C4-Fab1-HC:scFvC40	pDualyx-116	pDualyx-019	SEQ ID NO: 24 & SEQ ID NO: 31
C4-Fab1-HC:scFv31.1	pDualyx-115	pDualyx-019	SEQ ID NO: 23 & SEQ ID NO: 31

В таблице 4 ниже приведены SEQ ID NO полипептидов легкой и тяжелой цепей, кодируемых экспрессирующими конструкциями, указанными в таблице 3 выше.

Таблица 4 - SEQ ID NO для белков, кодируемых экспрессионными плазмидами, указанными в таблице 3

Экспрессионная плазмида	LC/HC	SEQ ID NO:
pDualyx-010pre	LC	SEQ ID NO: 3
pDualyx-030pre	LC	SEQ ID NO: 4
pDualyx-013pre	LC	SEQ ID NO: 5
pDualyx-022	LC	SEQ ID NO: 6
pDualyx-023	LC	SEQ ID NO: 7
pDualyx-005	LC	SEQ ID NO: 8
pDualyx-032	LC	SEQ ID NO: 9
pDualyx-092	LC	SEQ ID NO: 10
pDualyx-093	LC	SEQ ID NO: 11
pDualyx-077	LC	SEQ ID NO: 12
pDualyx-076	LC	SEQ ID NO: 13
pDualyx-016pre	LC	SEQ ID NO: 14
pDualyx-028	LC	SEQ ID NO: 15
pDualyx-087	LC	SEQ ID NO: 16
pDualyx-090	LC	SEQ ID NO: 17
pDualyx-071	LC	SEQ ID NO: 18
pDualyx-040pre	LC	SEQ ID NO: 19
pDualyx-112	LC	SEQ ID NO: 20
pDualyx-113	LC	SEQ ID NO: 21

pDualyx-114	LC	SEQ ID NO: 22
pDualyx-115	LC	SEQ ID NO: 23
pDualyx-116	LC	SEQ ID NO: 24
pDualyx-151	LC	SEQ ID NO: 25
pDualyx-156	LC	SEQ ID NO: 26
pDualyx-161	LC	SEQ ID NO: 27
pDualyx-011pre	HC	SEQ ID NO: 28
pDualyx-029pre	HC	SEQ ID NO: 29
pDualyx-012pre	HC	SEQ ID NO: 30
pDualyx-019pre	HC	SEQ ID NO: 31
pDualyx-020pre	HC	SEQ ID NO: 32
pDualyx-044	HC	SEQ ID NO: 33
pDualyx-118	HC	SEQ ID NO: 34
pDualyx-119	HC	SEQ ID NO: 35
pDualyx-021	HC	SEQ ID NO: 36
pDualyx-024	HC	SEQ ID NO: 37
pDualyx-051	HC	SEQ ID NO: 38
pDualyx-080	HC	SEQ ID NO: 39
pDualyx-082	HC	SEQ ID NO: 40
pDualyx-063	HC	SEQ ID NO: 41
pDualyx-006	HC	SEQ ID NO: 42
pDualyx-031	HC	SEQ ID NO: 43
pDualyx-091	HC	SEQ ID NO: 44
pDualyx-075	HC	SEQ ID NO: 45
pDualyx-017pre	HC	SEQ ID NO: 46
pDualyx-108	HC	SEQ ID NO: 47
pDualyx-111	HC	SEQ ID NO: 48
pDualyx-027	HC	SEQ ID NO: 49
pDualyx-085	HC	SEQ ID NO: 50
pDualyx-088	HC	SEQ ID NO: 51
pDualyx-069	HC	SEQ ID NO: 52
pDualyx-041pre	HC	SEQ ID NO: 53

pDualyx-149	HC	SEQ ID NO: 54
pDualyx-150	HC	SEQ ID NO: 55
pDualyx-152	HC	SEQ ID NO: 56
pDualyx1-153	HC	SEQ ID NO: 57
pDualyx-154	HC	SEQ ID NO: 58
pDualyx-155	HC	SEQ ID NO: 59
pDualyx-157	HC	SEQ ID NO: 60
pDualyx-158	HC	SEQ ID NO: 61
pDualyx-159	HC	SEQ ID NO: 62
pDualyx-160	HC	SEQ ID NO: 63
pDualyx-162	HC	SEQ ID NO: 64
pDualyx-163	HC	SEQ ID NO: 65

В нижеприведенной таблице 5 представлены последовательности CDR специфических клонов антител, варибельные области легкой и тяжелой цепей которых и последовательности CDR использовали в качестве исходных для антигенсвязывающих сайтов различных форматов антител, использованных в примерах настоящей заявки, отличных от антител на основе VHH, обсуждаемых в ниже приведенных примерах. Затенение использовано просто для указания CDR легкой и тяжелой цепей одного и того же клона.

Таблица 5. Аминокислотные последовательности CDR специфических клонов анти-TNFR2 антител

Анти-тело	Домен	CDR1	CDR2	CDR3
C1	VL	RSSTGAVTTSNYAN GTNNRTP (SEQ ID NO: 66)	GTNNRTP (SEQ ID NO: 67)	ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 68)
C1	VH	DDYIH (SEQ ID NO: 99)	WIDPENSDEYASK FQ GKAT (SEQ ID NO: 100)	TTGLWLRTAIDY (SEQ ID NO: 101)
C4	VL	KASQDVDTAVA (SEQ ID NO: 69)	WASTRHT (SEQ ID NO: 70)	QQYYSVPPT (SEQ ID NO: 71)
C4	VH	SYDIN (SEQ ID NO: 102)	WIYPRDGDTKYNE KFKGKAI (SEQ ID NO: 103)	LTGPYWFYFDV (SEQ ID NO: 104)
C8	VL	KASQDVDTAV (SEQ ID NO: 72)	WASTRHT (SEQ ID NO: 73)	QQYYSVPPT (SEQ ID NO: 74)

C8	VH	DDYIH (SEQ ID NO: 105)	WIDPENS DTEYASK FQ GKAT (SEQ ID NO: 106)	GLWLRTAIDY (SEQ ID NO: 107)
C9	VL	SASSSVSYM H (SEQ ID NO: 75)	STSNLAS (SEQ ID NO: 76)	QQRSSYPPT (SEQ ID NO: 77)
C9	VH	TAGMQ (SEQ ID NO: 108)	WINTHSGE PKYAED FKGRFA (SEQ ID NO: 109)	WDGTGY (SEQ ID NO: 110)
C15	VL	RASENIDNYGISFM Y (SEQ ID NO: 78)	AASNQGS (SEQ ID NO: 79)	QQSKEVPYT (SEQ ID NO: 80)
C15	VH	DYEMH (SEQ ID NO: 111)	VVDPGTGDTASNQ KFKG (SEQ ID NO: 112)	RYYGSRESMDY (SEQ ID NO: 113)
C16	VL	KASQNVGTNVA (SEQ ID NO: 81)	SASFRYS (SEQ ID NO: 82)	QHFNSFPLT (SEQ ID NO: 83)
C16	VH	RYWMS (SEQ ID NO: 114)	ESDPDSSTINYAPSL KDKFI (SEQ ID NO: 115)	EGYYDNEGYFDV (SEQ ID NO: 116)
C19	VL	KASQNVGTNVA (SEQ ID NO: 84)	SASYRYS (SEQ ID NO: 85)	QQFDSHPLT (SEQ ID NO: 86)
C19	VH	IHGMS (SEQ ID NO: 117)	WINTYSGVPTYAND FKGRFA (SEQ ID NO: 118)	ARDEVRRGFGFAY (SEQ ID NO: 119)
C25	VL	KASQNVGSNVD (SEQ ID NO: 87)	SASYRYS (SEQ ID NO: 88)	QQYN SHPLT (SEQ ID NO: 89)
C25	VH	DLYIH (SEQ ID NO: 120)	WIDPETDNTIYDPK FQ GKAS (SEQ ID NO: 121)	STG LLQWYFDV (SEQ ID NO: 122)
C31-1	VL	RASQSLVHSNGNTY LQ (SEQ ID NO: 90)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 91)	SQSTHVPFT (SEQ ID NO: 92)
C31	VH	GYAWN (SEQ ID NO: 123)	YITNDGSNNYNPSL KNRIS (SEQ ID NO: 124)	DGGWFHYFDY (SEQ ID NO: 125)
C31-2	VL	RSSTGAVTTSNYAN	TNNRAP	ALWYSNHWW

		(SEQ ID NO: 93)	(SEQ ID NO: 94)	(SEQ ID NO:95)
C31	VH	GYAWN (SEQ ID NO: 126)	YITNDGSNNYNPSL KNRIS (SEQ ID NO: 127)	DGGWFHYFDY (SEQ ID NO: 128)
C40	VL	KASQDINKFIA (SEQ ID NO: 96)	YTSTLQP (SEQ ID NO: 97)	LQYDNLTY (SEQ ID NO: 98)
C40	VH	GMGVG (SEQ ID NO: 129)	HIWWDDDKYYNPA LKSRLT (SEQ ID NO: 130)	IAGTRYFDV (SEQ ID NO: 131)

Таблица 6: Специфические последовательности переменных областей VH и VL из клонов

Антитело	Домен	SEQ ID NO
C1	VL	294
C1	VH	305
C4	VL	295
C4	VH	306
C8	VL	296
C8	VH	307
C9	VL	297
C9	VH	308
C15	VL	298
C15	VH	309
C16	VL	299
C16	VH	310
C19	VL	300
C19	VH	311
C25	VL	301
C25	VH	312
C31-1	VL	302
C31	VH	313
C31-2	VL	303
C31	VH	314
C40	VL	304

C40	VH	315
-----	----	-----

В таблице 7 представлены SEQ ID NO для дополнительных релевантных белков.

Таблица 7. SEQ ID NO для TNFR2, вариантов TNF α , LT α и других белков

SEQ ID NO:	Белок
SEQ ID NO: 1	Человеческий TNFR2 - Номер доступа: NP_001057
SEQ ID NO: 2	Белок тенацин - аминокислоты 110-139 тенацина кур
SEQ ID NO: 132	Человеческий TNF- α - Номер доступа: NP_000585
SEQ ID No: 133	Человеческий лимфотоксин-альфа - Номер доступа: NP_000586
SEQ ID No: 134	TNC-sc(mu)TNF(143N/145R)
SEQ ID No: 135 & SEQ ID 136	Последовательность константной области тяжелой цепи дурвалумаба: SEQ ID NO: 135 Последовательность константной области легкой цепи дурвалумаба: SEQ ID NO: 136
SEQ ID: 316	Последовательность константной области тяжелой цепи дурвалумаба без области CH1: SEQ ID NO: 316
SEQ ID No: 137	TNFR2(mu)-pCMV-SPORT6 (Tnfrsf1b) (Origene) кДНК, клон IMAGE:3710793; GenBank: BC039127.1
SEQ ID No: 138	TNFR2-цино; Macaca fascicularis; GenBank: EHH62644.1
SEQ ID No: 139	Пептид человеческого тенацина - аминокислоты 110-139 человеческого тенацина (NP_002151.2)

Таблица 8. SEQ ID NO для последовательностей на основе VHH

SEQ ID NO:	Белок
SEQ ID NO: 140-153	Четырнадцать созданных TNFR2-специфических последовательностей VHH
SEQ ID NO: 198-212	Варианты последовательностей VHH C188: C188-VHH_1: SEQ ID NO 148/ C188-VHH_2: SEQ ID NO 149/ C188-VHH_3: SEQ ID NO 150/ C188-VHH_4: SEQ ID NO 151/ C188-VHH_5: SEQ ID NO 152/ C188-VHH_6: SEQ ID NO 153/ C188-VHH_7: SEQ ID NO 154/ C188-VHH_8: SEQ ID NO 155/ C188-VHH_9: SEQ ID NO 156/ C188-VHH_10: SEQ ID NO 157/ C188-VHH_11: SEQ ID NO 158/ C188-VHH_12: SEQ ID NO 159/ C188-VHH_13: SEQ ID NO 160/ C188-VHH_14: SEQ ID NO 161/ C188-VHH_15: SEQ ID NO 162
SEQ ID NO: 197	<u>3XVHH C188(G4S)1-Fc(Durv)</u>

Таблица 9. Варианты последовательности на основе C4

SEQ ID NO:	Белок
SEQ ID NO: 261 и 258	Последовательности C4-IgG1(Durv)-HC:scFvC4(G4S)4:

	<u>Легкая цепь (сигнальный пептид+C4-VL+durvaCL) - SEQ ID NO: 261</u> <u>Тяжелая цепь (сигнальный пептид+C4-VH+DURVA[CH1+шарнир+CH2+CH3] + scFvC4(C4-Vh-линкер-C4-VL): SEQ ID NO: 258</u>
SEQ ID NO: 262-265	Последовательности вариантов легкой цепи для C4: C4_VL_1 - SEQ ID NO: 262/ C4_VL_2 - SEQ ID NO: 263/ C4_VL_3 - SEQ ID NO: 264/ C4_VL_1 - SEQ ID NO: 265
SEQ ID NO: 278-281	Последовательности вариантов легкой цепи для C4: C4_VH_1 - SEQ ID NO: 278/ C4_VH_2 - SEQ ID NO: 279/ C4_VH_3 - SEQ ID NO: 280/ C4_VH_4 - SEQ ID NO: 281

Таблица 10: Варианты оптимизированной последовательности C4: перестановки вариантов C4_VH и C4_VL:

Название варианта	Тяжелая цепь	Легкая цепь
C4	C4_VH	C4_VL
C4_var1	C4_VH_1	C4_VL_1
C4_var2	C4_VH_1	C4_VL_2
C4_var3	C4_VH_2	C4_VL_1
C4_var4	C4_VH_2	C4_VL_2
C4_var5	C4_VH_1	C4_VL_3
C4_var6	C4_VH_1	C4_VL_4
C4_var7	C4_VH_2	C4_VL_3
C4_var8	C4_VH_2	C4_VL_4
C4_var9	C4_VH_3	C4_VL_1
C4_var10	C4_VH_3	C4_VL_2
C4_var11	C4_VH_4	C4_VL_1
C4_var12	C4_VH_4	C4_VL_2
C4_var13	C4_VH_3	C4_VL_3
C4_var14	C4_VH_3	C4_VL_4
C4_var15	C4_VH_4	C4_VL_3
C4_var16	C4_VH_4	C4_VL_4

Гель-фильтрация

Нативную массу и потенциальную агрегацию очищенных слитых белков антител (50-200 мкг) анализировали методом гель-фильтрации на колонке MabPac SEC-1 (Thermo Fisher) с помощью системы ВЭЖХ UltiMate 3000 (Thermo Fisher) и стандарта проверки производительности колонки SEC-1 с водным элюентом (#AL0-3042, Phenomenex, Torrance, CA, USA). В качестве альтернативы использовали колонки Gravitrap или MAbSelect.

Оценка клеточного связывания

Сродство (значения K_D) TNFR2-нацеленных антител к TNFR2 человека, яванского макака и мыши оценивали с помощью клеточного анализа равновесного связывания. С этой целью клетки HEK293T временно трансфицировали экспрессионными плазмидами, кодирующими TNFR2 человека, яванского макака или мыши, или пустым контрольным

вектором (EV) методом PEI. Аликвоты трансфектантов HEK293T обрабатывали увеличивающейся концентрацией указанных анти-TNFR2 антител, меченных GpL (люциферазой Gaussia Princeps), инкубировали в течение одного часа в стандартных условиях для клеточных культур и затем два раза промывали ледяным PBS. Наконец, клетки ресуспендировали в 50 мкл среды RPMI 1640, дополненной 0,5% FCS, и переносили в 96-луночный планшет. Активность клеточно-ассоциированной люциферазы (RLU; относительные световые единицы) определяли с помощью люцинометра LUmo (anthos Mikrosysteme GmbH, Friesoythe, Germany) непосредственно после добавления 1,5 мкМ субстрата целентеразина (Carl Roth, Karlsruhe, Germany).

Сродство TNFR2-специфических антител и вариантов антител также оценивали, используя клетки HeLa и клетки HeLa, стабильно экспрессирующие человеческий TNFR2. Клетки HeLa и HeLa-TNFR2 высевали в 24-луночные планшеты. На следующий день клетки стимулировали указанными концентрациями GpL-меченных анти-TNFR2 антител в течение 1 часа при 37°C. Для удаления несвязавшихся антител клетки промывали 10 раз ледяным PBS. Затем клетки соскребали и собирали в 50 мкл среды (RPMI, 0,5% FCS) и переносили в черные 96-луночные планшеты для измерения, как указано выше. Специфическое связывание разных TNFR2-специфических антител/вариантов антител вычисляли путем вычитания неспецифического связывания (значений, полученных для клеток HeLa) из общего связывания (полученного для HeLa-TNFR2). Полученные значения аппроксимировали, используя опцию нелинейного регрессионного анализа GraphPad Prism 5.

Анализ индукции IL8

Индукция цитокинов является общепризнанным показателем активации NFκB в ответ на передачу сигналов TNFR2. Анализировали силу активации NFκB, измеряя количество IL8 после стимуляции TNFR2 с помощью коммерчески доступного набора IL8 ELISA (IL8 ELISA Set, BD OptEIA™, San Diego, USA).

Клетки HT1080-Vcl2-TNFR2, отвечающие на стимуляцию TNFR2 сильной индукцией IL8, высевали в 96-луночные планшеты (20000 клеток/лунку). На следующий день клетки стимулировали представляющими интерес реагентами, нацеленными на TNFR2, и олигомеризованным TNF80 (=TNC-sc(mu)TNF(143N/145R), высокоэффективным TNFR2-селективным вариантом TNF (Chopra et al., 2015), в качестве положительного контроля. После инкубации в течение ночи 50 мкл супернатанта анализировали с помощью набора BD OptEIA™ IL8 ELISA в соответствии с руководством производителя.

Анализ жизнеспособности

TNFR2 может вызывать гибель клеток в некоторых клеточных линиях/типах клеток путем ингибирования белков выживания (TRAF2, cIAP1, cIAP2) и сопутствующей активации TNF, запускающей TNFR1. Этот тип ответа был продемонстрирован, помимо прочего, в клетках Кум-1 (Schneider et al., 1999). Для проверки, способны ли конструкции, нацеленные на TNFR2, запускать этот ответ TNFR2, клетки Кум-1 высевали в 96-

луночные планшеты (20000 клеток на лунку) и на следующий день стимулировали представляющими интерес реагентами, нацеленными на TNFR2. Для определения полной гибели клеток аликвоту клеток также обрабатывали «смесью, вызывающей гибель клеток» в качестве контроля (200 нг/мл TNF, 200 нг/мл TRAIL, 200 нг/мл CD95L, 25 мкг/мл CHX, 1% (мас./об.) азида натрия). Оставшиеся в итоге прикрепленные к планшету клетки окрашивали 70 мкл раствора кристаллического фиолетового. Через 20 минут планшеты один раз промывали dH₂O и сушили на воздухе. После растворения в метаноле измеряли OD при 595 нм с помощью фотометра PНОmo (anthos Mikrosysteme GmbH, Friesoythe, Germany) для количественной оценки жизнеспособности. Значения нормализовали по необработанным клеткам (100% жизнеспособность) и клеткам, обработанным цитотоксической смесью (0% жизнеспособность).

Активация альтернативного пути NFκB

Процессинг p100 в p52 является основной характеристикой активности альтернативного пути NFκB. Для оценки способности анти-TNFR2 антител индуцировать процессинг p100, 1×10^6 клеток Кум-1 на лунку высевали в 6-луночный планшет для культуры тканей. На следующий день клетки стимулировали представляющим интерес реагентом, нацеленным на TNFR2. После инкубации в течение ночи в стандартных условиях для клеточной культуры готовили общие клеточные лизаты (1x промывка PBS, соскабливание клеток в 1 мл PBS, центрифугирование (2 мин, 12000 об/мин), лизис клеточного осадка в 4x буфере Laemmli для образцов, обработка ультразвуком в течение 25 секунд с максимальной амплитудой (ультразвуковой процессор UP100H, Hielscher, Germany), нагревание в течение 5 мин при 95°C и удаление дебриса центрифугированием (2 мин, 12000 об/мин)). Для оценки процессинга p100 выполняли вестерн-блоттинг стандартными методами и с помощью стандартного оборудования с использованием анти-p100/p52 антитела от Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany).

Ссылки на материалы и методы

Chopra M, Bichl M, Steinfatt T, Brandl A, Kums J, Amich J, Vaeth M, Kuen J, Holtappels R, Podlech J, Mottok A, Kraus S, Jordán-Garrote AL, Bäuerlein CA, Brede C, Ribechini E, Fick A, Scher A, Polz J, Ottmüller KJ, Baker J, Nishikii H, Ritz M, Matenheimer K, Schwinn S, Winter T, Schäfer V, Krappmann S, Einsele H, Müller TD, Reddehase MJ, Lutz MB, Männel DN, Berberich-Siebelt F, Wajant H, Beilhack A. Exogenous TNFR2 activation protects from acute GHD via host I reg cell expansion. *J Exp Med*. 2016 Aug 22; 213(9):1881-900.

Medler, J., Nelke, J., Weisenberger, D. et al. TNFRSF receptor-specific antibody fusion proteins with targeting controlled FcyR-independent agonistic activity. *Cell Death Dis* 10, 24 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1456-x>

Medler J, Wajant H. Analysis of FcyR-Dependent Agonism of Antibodies Specific for Receptors of the Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor Superfamily (TNFRSF). *Methods Mol Biol*. 2021; 2248:81-90.

Schneider P, Schwenzer R, Has E, Muhlenbeck F, Schubert G, Scheurich P et al. (1999).

TWEAK can induce cell death via endogenous TNF and TNF receptor 1. Eur J Immunol 29:1785-1792.

Weiss T., et al. Enhancement of TNF receptor p60-mediated cytotoxicity by TNF receptorp80: requirement of the TNF receptor-associated factor-2 binding site. J. Immunol. 158, 2398-2404 (1997).

Пример 2: Вестерн-блот анализ вариантов анти-TNFR2 антитела С4 с параллельно организованными (однонаправленно ориентированными) N-концевыми TNFR2-связывающими сайтами.

Меченные Flag варианты анти-TNFR2 антитела С4 с однонаправленно ориентированными (параллельно организованными) N-концевыми TNFR2-связывающими сайтами экспрессировали в клетках HEK293T, как описано в примере 1. Оцениваемые форматы антител были такими, как показано на фиг. 1, при этом специфические антитела содержали переменные области тяжелой и легкой цепей из клона 4 анти-TNFR2 антитела, где указанный на фигуре «Идентификатор клона» представляет собой «С4». Плазмиды, кодирующие цепи (НС, LC) каждой из различных конструкций С4, трансфицировали в клетки. Вариант антитела, содержащий супернатанты вместе с различными количествами стандарта антител известной концентрации, анализировали с помощью WB, и концентрацию вариантов антител в супернатантах определяли по сигналам стандартных антител. Затем супернатант, содержащий каждый вариант антитела, объемом 200 нг снова подвергали вестерн-блоттингу с антителами к человеческому IgG и анти-Flag антителами. Полученные результаты показаны на фиг. 2, где все форматы антител успешно экспрессируются и обнаруживаются в супернатанте, выделенном из клеток.

Пример 3: TNFR2-опосредованное продуцирование IL8 после обработки вариантами С4 с однонаправленно ориентированными (параллельно организованными) N-концевыми TNFR2-связывающими сайтами

Способность вариантов антител с однонаправленно ориентированными (параллельно организованными) N-концевыми TNFR2-связывающими сайтами оценивали, используя варианты антител, содержащих переменные области тяжелой и легкой цепей исходного TNFR2-специфического антитела клона 4. Структура этих вариантов также показана на фиг. 1, но «идентификатор клона», представляющий собой С4, обозначает происхождение антигенсвязывающих сайтов. В качестве положительного контроля использовали высокоактивную олигомерную форму TNFR2-специфического мутанта TNF (143N/145R).

Для выполнения оценки клетки HT1080-Bcl2-TNFR2 стимулировали супернатантами, содержащими концентрации различных конструкций С4, указанных на фиг. 3. На следующий день супернатанты собирали и анализировали с помощью ELISA на содержание в них IL8. Полученные результаты показаны на фиг. 3. Максимальный ответ вызывали высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF, TNF(143N/145R), использованного в качестве положительного контроля; полученные для

него результаты обозначены на графике пунктирной линией.

Как видно из фиг. 3, наиболее активные в анализе варианты антител имели несколько однонаправленно ориентированных (параллельно организованных) N-концевых TNFR2-связывающих сайтов. Самый низкий уровень продуцирования IL-8 наблюдали у вариантов C4-Fab, C4-Fab2 и C4-IgG1(N297A), которые имели два или менее TNFR2-связывающих сайта.

Пример 4: TNFR2-опосредованная гибель клеток в клетках Кум-1 после обработки вариантами С4 с однонаправленно ориентированными (параллельно организованными) N-концевыми TNFR2-связывающими сайтами

Затем оценивали способность форматов антител с N-концевыми TNFR2-связывающими сайтами вызывать гибель клеток в клетках Кум-1, снова используя переменные области легкой и тяжелой цепей клона 4 для придания TNFR2-специфичности. Полученные результаты показаны на фиг. 4, где также использованы сокращения, указанные на фиг. 1, за исключением того, что «С4» обозначает происхождение антигенсвязывающих сайтов.

Клетки Кум-1 стимулировали супернатантами, содержащими концентрации различных конструкций С4, показанных на фиг. 4. На следующий день жизнеспособность клеток определяли путем окрашивания кристаллическим фиолетовым. Полученные результаты показаны на фиг. 4. И в этом случае, высокоактивная олигомерная форма TNFR2-специфического мутанта TNF (143N/145R) служила положительным контролем для захвата TNFR2. Наиболее эффективными вариантами антител в индукции апоптоза оказались варианты scFv:C4-IgG1(N297A) и scFv:C4-IgG1-(N297A)-HC:TNC, результаты для которых показаны на фиг. 4 на средней панели. Результаты связывания молекул на основе связывающих сайтов клонов С19, С27 и С40 представлены на фиг. 6.

Пример 5: TNFR2-опосредованный процессинг р100 в клетках Кум-1 после обработки вариантами С4 с однонаправленно ориентированными (параллельно организованными) N-концевыми TNFR2-связывающими сайтами

Оценивали способность вариантов С4 с однонаправленно ориентированными (параллельно организованными) N-концевыми TNFR2-связывающими сайтами запускать процессинг р100 в р52 и, следовательно, указывать на запуск передачи сигнала через TNFR2. Клетки Кум-1 стимулировали в течение ночи супернатантами, содержащими концентрации различных вариантов С4, представленных на фиг. 5. Структуры использованных вариантов показаны на фиг. 1, где «С4» обозначает «идентификатор клона». Обработку осуществляли в присутствии 20 мкМ ZVAD для предотвращения TNFR2-индуцированной гибели клеток. В качестве положительного контроля использовали неамерный TNFR2-специфический мутант мышинового TNF (олиго TNF80). Вестерн-блоттинг проводили с использованием антител, специфичных к указанным белкам р100 и р52, и β-актину, который использовали в качестве контроля. Полученные результаты показаны на фиг. 5.

Пример 6: Вестерн-блот анализ вариантов С4 с N-концевыми и С-концевыми

организованными TNFR2-связывающими сайтами.

Эксперименты, описанные в примере 2 для вариантов антител с однонаправленно ориентированными (параллельно организованными) N-концевыми TNFR2-связывающими сайтами, также выполняли для вариантов антитела С4, изображенных на фиг. 7, которые имели как N-концевые, так и С-концевые TNFR2-связывающие сайты. Варианты включали метки FLAG в тяжелой и легкой цепях, за исключением тяжелой цепи варианта С4-IgG1(N297A)-HC:scFvC4, которая не содержала метку Flag.

Каждую конструкцию С4 трансфицировали в клетки, и варианты антител очищали из супернатантов клеток. В вестерн-блоттинге использовали 200 нг каждого варианта антитела. Супернатанты, содержащие варианты, меченные Flag, анализировали с помощью вестерн-блоттинга, используя антитела к человеческому IgG и анти-Flag антитела. Полученные результаты показаны на фиг. 8, где все форматы антител успешно экспрессируются и обнаруживаются в супернатанте, выделенном из клеток.

Пример 7: TNFR2-опосредованное продуцирование IL8 в клетках HT1080-Bcl2-TNFR2 после обработки конструкциями С4 с N-концевыми и С-концевыми организованными TNFR2-связывающими сайтами

Эксперименты, эквивалентные экспериментам, изложенным в примере 3, также выполняли с вариантами С4 как с N-концевыми, так и с С-концевыми организованными TNFR2-связывающими сайтами, показанными на фиг. 7. Для сравнения, параллельно с вариантами, имеющими как N-концевые, так и С-концевые TNFR2-связывающие сайты, также тестировали несколько вариантов антител только с N-концевыми TNFR2-связывающими сайтами.

Клетки HT1080-Bcl2-TNFR2 стимулировали супернатантами, содержащими концентрации различных конструкций С4, указанных на фиг. 9. На следующий день супернатанты собирали и анализировали с помощью ELISA на содержание в них IL8. Полученные результаты показаны на фиг. 9. Показанные данные получены из параллельно обработанных экспериментов, которые для лучшего разрешения приведены на трех диаграммах. Максимальный ответ, индуцированный положительным контролем (высокоактивная олигомерная форма TNFR2-специфического мутанта TNF(143N/145R)), показан пунктирной линией.

Как показано на фиг. 9, варианты антител как с N-, так и с С-концевыми TNFR2-связывающими сайтами имели тенденцию давать наиболее положительные результаты, хотя валентность также оказывала влияние. Например, результаты на средней панели показывают, что такие форматы антител вызывают более высокий уровень продуцирования IL-8, чем вариант С4-IgG1 (N297A) только с N-концевыми TNFR2-связывающими сайтами.

Пример 8: TNFR2-опосредованная гибель клеток в клетках Kym-1 после обработки конструкциями С4 с N-концевыми и С-концевыми организованными TNFR2-связывающими сайтами

Эксперименты, эквивалентные экспериментам, выполненным в примере 4, также

выполняли для вариантов антитела С4, содержащего как N-, так и С-концевые TNFR2-связывающие сайты. Клетки Кум-1 стимулировали супернатантами, содержащими концентрации различных конструкций С4, указанных на фиг. 10. На следующий день жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-анализа. В качестве положительного контроля использовали высокоактивную олигомерную форму TNFR2-специфического мутанта TNF (143N/145R). Полученные результаты показаны на фиг. 10.

Пример 9: Связывающие свойства TNFR2-специфических антител в клетках HeLa, экспрессирующих человеческий TNFR2

Связывающие свойства нескольких TNFR2-специфических антител, полученных из различных клонов, оценивали, используя клетки HeLa, экспрессирующие TNFR2. Равновесное связывание GpL-слитых белков анти-TNFR2 антитела с клетками, экспрессирующими TNFR2, при 37°C оценивали с помощью полученных результатов, показанных на фиг. 11А. Для каждого антитела показан уровень специфического, неспецифического и полного связывания. На первом графике показаны результаты по связыванию с TNFR2 для положительного контроля GpL-Flag-TNFwt.

Выполняли дополнительный эксперимент, в котором вместо GpL-меченного антитела использовали GpL-меченный TNF. Клетки HeLa-TNFR2 предварительно обрабатывали указанными количествами анти-TNFR2 антител или оставляли необработанными. Добавляли 5 нг/мл GpL-TNF, и связывание измеряли через 1 час инкубации при 37°C. Затем для получения значений неспецифического связывания анализировали связывание с нетрансфицированными клетками HeLa. Полученные результаты показаны на фиг. 11В.

Пример 10: Конкуренция α TNFR2-антител

Клетки HeLa-TNFR2 предварительно обрабатывали 3-10 мкг анти-TNFR2 антител, показанных на фиг. 12, или оставляли необработанными. Добавляли 50 нг/мл различных вариантов α TNFR2-IgG1(N297A)-LC:GpL, и через 1 час измеряли связывание, как описано в разделе «Материалы и методы» примера 1. Полученные результаты показаны на фиг. 12.

Пример 11: Молекулы TNFR2, занятые четырехвалентными моноклональными антителами, вызывают гораздо более сильную индукцию IL8, чем молекулы TNFR2, занятые обычным двухвалентным вариантом моноклональных антител

TNFR2-негативные клетки HeLa и клетки HeLa-TNFR2 попарно стимулировали в течение 8 часов концентрациями GpL-слитых белков би- и четырехвалентной версии TNFR2-специфического mAb С4, указанными в (А) и (В) на фиг. 13 (см. вставку на схеме). Затем супернатанты HeLa-TNFR2 анализировали на TNFR2-индуцированное продуцирование IL8, результаты показаны на (В). Многократно промытые клетки (HeLa и HeLa-TNFR2) анализировали на клеточно-ассоциированную активность GpL. Специфическое связывание с TNFR2 вычисляли путем вычитания значений неспецифического связывания, полученных для клеток HeLa, из значений общего связывания, полученных для клеток HeLa-TNFR2 с полученными результатами,

показанными на (А). Следует учесть, что активность люциферазы нормализовали по соотношению количества репортерных доменов GpL к количеству TNFR2-связывающих доменов в двух вариантах моноклональных антител (1 против 0,5).

Продуцирование IL8, стимулированное вариантами mAb непосредственно отражали на графике в виде функции их специфического связывания. Последнее преобразовывали в «занятые рецепторы на клетку», исходя из количества клеток в анализе и измеренной удельной активности (RLU/молекула) конструкций GpL. Результаты показаны на (С). Максимальное связывание двух конструкций, полученных из А, обозначено пунктирными вертикальными линиями. Пунктирные линии указывают на линейную регрессию продуцирования IL8 в зависимости от занятости рецептора.

Пример 12: Связывающие свойства TNFR2-специфических антител в клетках HEK293Т, экспрессирующих человеческий TNFR2

Оценивали связывающие свойства анти-TNFR2 антител из разных клонов. Клетки HEK293 временно трансфицировали TNFR2 человека, мыши и яванского макака или пустым вектором. Затем при 37°C определяли равновесное связывание указанных GpL-слитых белков с анти-TNFR2 антителом. Связывание с клетками, трансфицированными пустым вектором, определяли для получения значений неспецифического связывания. Полученные результаты показаны на фиг. 14. Антитело, специфически связывающееся со всеми тремя TNFR2 человека, мыши и яванского макака, представляло собой антитело C19-IgG1-LC-GpL. Антитело C4-IgG1-LC-GpL связывалось с человеческим TNFR2, но не с TNFR2 обезьяны или мыши. Антитело C40-IgG1-LC-GpL связывалось с TNFR2 человека и обезьяны, но не с TNFR2 мыши.

На фиг. 15 представлена архитектура домена TNFR2, на которой показаны внеклеточные части TNFR2, распознаваемые анти-TNFR2 антителами C4, C19, C27 и C40, и полученными из них четырехвалентными вариантами CI-IgG1(N297A)-HC:scFvCI.

Кроме того, на фиг. 35 схематически представлено распознавание внеклеточной части TNFR2 клонами VHH анти-TNFR2: VHH:C18, VHH:C74, VHH:C188 и VHH:C238, и производными от них конструкциями.

Пример 13: Вестерн-блот анализ моно- и биспецифических TNFR2-специфических вариантов CI-IgG-HC:scFvCI

Экспрессировали несколько разных вариантов антител, которые анализировали вестерн-блоттингом, эквивалентным подходу, использованному в примерах 2 и 6. Одиннадцать проанализированных вариантов имели TNFR2-связывающие сайты из разных клонов, разные модификации тяжелых цепей, а некоторые из них также имели С-концевые TNFR2-связывающие сайты; исследованные варианты приведены на фиг. 16. Варианты экспрессировали и анализировали способом, эквивалентным изложенному в примерах 2 и 6.

На верхней панели на фиг. 16 показаны результаты блоттинга с анти-FLAG антителом к метке FLAG, которой метили антитела. Следует отметить, что: i) тяжелые цепи C4-IgG1(N297A), C4-IgG1(N297A)-HC:scFvC4 и C4-IgG1(N297A)-HC:scFvC19 не

содержали метку FLAG; и ii) использованный традиционный вариант C19 представлял собой изоформу мышинового IgG1(D265A). На нижней панели на фиг. 16 показаны результаты вестерн-блоттинга с анти-hIgG.

Пример 14: TNFR2-опосредованное продуцирование IL8 в клетках HT1080-Bcl2-TNFR2

Анализ способности анти-TNFR2 антител стимулировать продуцирование IL-8 в клетках HT1080-Bcl2-TNFR2 осуществляли способом, эквивалентным примерам 3 и 7. Оценивали ряд вариантов моноспецифических антител, а также ряд биспецифических вариантов антител с двумя разными TNFR2-специфичностями. Для проведения оценки клетки HT1080-Bcl2-TNFR2 стимулировали супернатантами, содержащими концентрации различных конструкций, указанных на фиг. 17. На следующий день супернатанты собирали и анализировали с помощью ELISA на содержание в них IL8. Полученные результаты показаны на фиг. 17, где на верхней панели показаны результаты для моноспецифического антитела, а на нижней панели показаны результаты для биспецифического антитела.

На верхней панели показано, что в каждом случае вариант антитела как с N-концевым, так и с C-концевым TNFR2-связывающими сайтами стимулировал более высокий уровень продуцирования TNF, чем соответствующий вариант антитела только с N-концевым TNFR2-связывающим сайтом. Результаты, показанные на верхней панели для связывающей молекулы C40-IgG1(N297A)-HC:scFvC40, оказались особенно положительными.

Пример 15: TNFR2-опосредованная гибель клеток в клетках Кум-1 после обработки моноспецифическими и биспецифическими TNFR2-специфическими вариантами CI-IgG-HC:scFvCI

Способность моноспецифических и биспецифических антител индуцировать гибель клеток оценивали способом, эквивалентным подходу, использованному в примерах 4 и 8. Клетки Кум-1 стимулировали супернатантами, содержащими концентрации различных конструкций C4, указанных на фиг. 18. На следующий день определяли жизнеспособность клеток путем окрашивания кристаллическим фиолетовым. Полученные результаты показаны на фиг. 18. Результаты для моноспецифических антител показаны на верхней панели, а результаты для бипаратопных антител показаны на нижней панели.

Пример 16: TNFR2-опосредованный процессинг p100 в клетках Кум-1 после обработки моноспецифическими и биспецифическими TNFR2-специфическими вариантами CI-IgG-HC:scFvCI

Способность моноспецифических и биспецифических антител вызывать передачу сигнала через TNFR2 оценивали путем изучения процессинга p100 способом, эквивалентным, описанному в примерах 5 и 9. Клетки Кум-1 стимулировали в течение ночи супернатантами, содержащими концентрации различных вариантов C4, указанных на фиг. 19. Обработку проводили в присутствии 20 мкМ ZVAD для предотвращения гибели клеток, индуцированной TNFR2. Неамерный TNFR2-специфический мутант

мышинного TNF (олиго TNF80) использовали в качестве положительного контроля. Вестерн-блоттинг выполняли, используя антитела, специфические к указанным белкам p100, p52 и β -актину, который использовали в качестве контроля. Полученные результаты показаны на фиг. 19.

Пример 17: Очистка и функциональный анализ C4-IgG1(N297A)-HC:scFvC4, C4-IgG1(N297A)-LC:scFvC4 и C4-IgG1(N297A)-LC:scFvC4-HC:scFvC4

Конструкции, показанные на фиг. 20, оценивали методом, который обсуждался в примере 1 и который применялся в предыдущих примерах. Полученные результаты показаны на фиг. 20. (A) Окрашенный серебром гель SDS-PAGE. (B) Гельфильтрационный анализ. (C) Индукция IL8 в клетках HT1080-Vcl2-TNFR2. (D) Индукция гибели клеток Кум-1. (E) Индукция процессинга p100 в клетках Кум-1. ZVAD добавляли для предотвращения гибели клеток.

Пример 18: Активность

В приведенной ниже таблице 7 суммирована активность различных форматов антител, использованных в предыдущих примерах, полученных, как указано в разделе «Материалы и методы» примера 1. Оцениваемые форматы антител представляли собой форматы, содержащие антигенсвязывающие сайты, полученные из клона C4. «B» в таблице указывает количество «северных» и «южных» антигенсвязывающих сайтов антитела. В таблице суммирована активность, наблюдаемая в анализе IL-8 (Активность I - классический путь NF κ B > IL8) или Активность II (истощение TRAF2 > альтернативный путь NF κ B (= процессинг p100) и гибель Кум-1)).

Таблица 7 - Сводная информация об активности форматов антител на основе C4

№.	Формат Ab	B	Активность I (IL8) нг/мл	Активность II (токс.) нг/мл
1	Fab1	1+0	0	0
2	Fab1-scFv	1+1	10	20
3	Fab2	2+0	0	0
4	Fab2-scFv	2+2	50	
5	IgG1	2	0	0
6	irrIgG1-HC:scFv	0+2	0	
7	IgG1-HC:scFv	2+2	5-20	10-20
8	IgG1-LC:scFv	2+2	5-20	10-20
9	IgG1-LC:scFv-HC:scFv	2+4	5-20	10-20
10	IgG1-TNC	6+0	100	Очень низкая
11	IgG1-RGY*	12+0	20-100	низкая
12	LC:scFv-HC:scFv-IgG1	4**+0	10-20	20
13	L/H:scFv-IgG1-LC:scFv	4**+2	5-10	5-10
14	L/H:scFv-IgG1-LC:scFv	4**+2	5-10	5-10
15	L/H:scFv-IgG1-L/H:scFv	4**+4	5-10	5-10
16	LC:scFv-HC:scFv-IgG1-TNC	12**+0	5-10	10
17	scFv-Fc-TNC	12+0	10	

18	scFv-TNC-Fc	12+0	5-20	20
19	IgG1-TNC-НС:scFv	6+6	5-10	10-20
	Star2	9+0	5-20	100-200

Пример 19: Оценка размножения Treg *ex vivo*

Оценивали способность конкретных TNFR2-связывающих молекул стимулировать размножение регуляторных Т-клеток. Четырехвалентные антитела в формате Fab-НС-scFv, где тяжелые цепи областей Fc имели мутацию аминокислоты N297A для устранения функции Fc, и базовый Fab представлял собой Fab IgG1. РВМС выделяли из четырех доноров, при этом клетки каждого донора оценивали отдельно. РВМС культивировали в течение двух дней с плотностью 10^7 клеток/мл. Затем РВМС собирали и высевали в многолуночные планшеты с плотностью 10^6 клеток/мл, по 500000 клеток на лунку. Затем клетки подразделяли на: (а) необработанные контрольные клетки; (б) клетки, обработанные молекулой агониста STAR2 в концентрации 100 нг/мл; (с) клетки, обработанные четырехвалентными антителами, имеющими только одну специфичность (1000-0,3 нг/мл); и (д) клетки, обработанные четырехвалентными антителами с двумя TNFR2-специфичностями (1000-0,3 нг/мл). После культивирования в течение четырех дней оценивали жизнеспособность клеток. Клетки окрашивали антителами, специфичными к CD3, CD8, CD4, CD25 и FoxP3. Затем клетки оценивали с помощью проточной цитометрии. На фиг. 21 на верхней панели показаны результаты, полученные для Foxp3+CD25+ клеток в CD3+CD4+ клетках, для измерения Treg-клеток и их размножения. На нижней панели фиг. 21 показаны клетки Foxp3- в CD3+CD4+ клетках для измерения Tcon клеток. В обоих случаях показан процент изменения относительно количества клеток до четырехдневной инкубации.

Пример 20: Размножение Treg *in vivo*

Способность агонистов TNFR2 стимулировать размножение Treg клеток также оценивали, используя сингенных мышей FoxP3-Luciferase. Мыши FoxP3-Luciferase являются трансгенными мышами, экспрессирующими гибридный белок FoxP3 и люциферазу. Фактически это означает, что можно визуализировать места расположения Treg-клеток *in vivo*. Мышам вводили агонист TNFR2 и ежедневно выполняли биолюминесцентную визуализацию. Через четыре дня мышей умерщвляли и выполняли анализ *ex vivo* клеток, выделенных из селезенки мышей, методом проточной цитометрии для оценки Foxp3, CD3 и CD4. Временная шкала эксперимента представлена на фиг. 22 на верхней панели (А). Результаты анализа *ex vivo* показаны на фиг. 22 на нижней панели (В). Эксперимент повторяли с несколькими мышами в каждой группе обработки, как показано на фиг. 23.

Пример 21: Получение и анализ TNFR2-специфических конструкций TNF

Создавали молекулы на основе TNF-альфа, показанные на фиг. 24, часть (А). Все молекулы включали молекулу TNF80, которая представляет собой мутированную форму TNF-альфа, потерявшую способность связываться с TNFR1, и, таким образом, является TNFR2-специфической. Структуры, показанные слева направо в части (А):

- Fc-TNC-TNF80, содержащая три области Fc, где С-концевая область каждого

полипептида содержит пептид тенасцина (TNC), за которым следует одна последовательность TNF80 (TNF80 соответствует TNFR2-специфическому мутанту TNF(143N/145R)). Пептиды тенасцина образуют тримеры, что, в свою очередь, означает, что присутствуют два тримера мутантного TNF-альфа.

- Fc-TNF80, содержащая три области Fc, где С-концевая область каждого полипептида содержит одну последовательность TNF80, обеспечивая наличие в молекуле двух тримеров мутантного TNF-альфа.

- Fc(DANA)-TNC-TNF80, соответствующая Fc-TNC-TNF80 с модификациями D265A и N297A (DANA) в тяжелой цепи.

- TNF80, соответствующая базовому мутанту TNF80 в тримерной форме.

- TNC-scTNF80, соответствующая одноцепочечным молекулам, содержащим три мутантные молекулы TNF80, где цепи дополнительно содержат пептид TNC, обеспечивая тримеризацию трех одноцепочечных полипептидов.

Для экспрессии молекул использовали мышинные растворимые конструкции на основе TNF80 для каждого из вышеперечисленных типов. Затем конструкции очищали с помощью анти-Flag аффинной очистки с использованием метки Flag, которую имели все конструкции. Затем конструкции анализировали с помощью SDS-PAGE и окрашивали серебром; полученные результаты показаны на фиг. 24, часть (B). После этого выполняли гель-фильтрационный анализ очищенных белков, показанный на фиг. 24, панель (B); полученные результаты показаны на фиг. 24 на панели (C). Результаты гель-фильтрации показывают, что экспрессированные связывающие молекулы не агрегированы и представляют собой гомогенный белок. В этом примере использовали метод, аналогичный изложенному в разделе «Материалы и методы» примера 1 выше.

Пример 21: Агонистическая активность различных форматов растворимого мышинового TNF80.

Затем оценивали способность конструкций, обсуждаемых в примере 20, действовать в качестве агонистов TNFR2 с использованием клеток Кум-1 для определения способности связывающих молекул индуцировать гибель клеток и клеток HT1080-TNFR2 для определения способности связывающих молекул индуцировать продуцирование IL-8. Использовали метод, изложенный выше в разделе «Материалы и методы» примера 1. Полученные результаты показаны на фиг. 25.

На верхней панели на фиг. 25 показаны результаты для клеток Кум-1, экспрессирующих TNFR2, стимулированных указанными концентрациями различных вариантов μ TNF80, которые на следующий день оценивали путем окрашивания кристаллическим фиолетовым для определения способности конструкций индуцировать гибель клеток. Как можно видеть, связывающая молекула TNC-sc(μ)TNF80 вызывала самое высокое снижение жизнеспособности клеток, за которой следовала связывающая молекула Fc(DANA)-TNC-TNF80.

На нижней панели на фиг. 25 показаны результаты для клеток HT1080-Vcl2-TNFR2. Клетки HT1080-Vcl2-TNFR2 стимулировали указанными концентрациями

различных вариантов TNF80, показанных на фиг. 1. На следующий день супернатанты собирали и анализировали с помощью ELISA на содержание IL8. Представленные данные получены из четырех независимых экспериментов. Как можно видеть, базовый мышинный TNF80 давал самый низкий уровень индукции IL-8, тогда как другие связывающие молекулы стимулировали более высокий уровень высвобождения IL-8.

Пример 22: Размножение Treg *in vivo* путем стимуляции Fc(DANA)-TNC-muTNF80

Чтобы продемонстрировать способность связывающих молекул, содержащих TNF80, действовать в качестве агонистов TNFR2, выполняли эксперименты *in vivo* на мышах, используя связывающую молекулу Fc(DANA)-TNC-muTNF80. Полученные результаты показаны на фиг. 26. Мышам с люциферазой под контролем промотора Foxp3 вводили внутривенно одну инъекцию указанного количества Fc(DANA)-TNC-muTNF80 и ежедневно анализировали с помощью биолюминесцентной визуализации (BLI), и на 4-й день оценивали частоту Treg с помощью анализа FACS. Результаты анализа BLI показаны на верхней панели на фиг. 26. Изображения BLI в день 0 и день 4 показаны на фиг. 26 на средней панели. Результаты анализа FACS, выполненного в день 4, показаны на нижней панели фиг. 26.

Пример 22: Демонстрация специфического связывания TNFR2

Выполняли эксперимент для проиллюстрации способности представленных связывающих молекул связывать TNFR2, но не TNFR1. Клетки HEK293 временно трансфицировали: (i) TNFR2-экспрессирующей плазмидой; (ii) экспрессионной плазмидой, кодирующей внеклеточный домен TNFR1 с якорным доменом GPI; или (iii) пустым вектором (ev). На следующий день различные связывающие молекулы с меткой GrpL оценивали на их способность связывать TNFR2, без существенного связывания TNFR1. Полученные результаты показаны на фиг. 27. Белки, представленные на фиг. 27, добавляли к клеткам HEK293 в указанной концентрации. После инкубации в течение 1 часа при 37°C с последующими двумя промывками PBS определяли оставшуюся активность GrpL, связанного с клетками. GrpL-TNF служил положительным контролем связывания с обоими типами рецепторов TNF.

Пример 23: Переформатирование известного антитела 005-B08

Для иллюстрации того, что «переформатирование» известных анти-TNFR2 антител для помещения их в обсуждаемые здесь форматы приводит к получению полезных агонистов против TNFR2, даже если известные антитела представляют собой анти-TNFR2 антитела-антагонисты, известный антагонист TNFR2 переформатировали в некоторые из представленных четырехвалентных форматов. Антитело 005-B08, раскрытое в WO2020/089474, переформатировали в несколько описанных в настоящем описании форматов. Таким образом, получали антитела в форматах IgG1(N297A)-HC:scFv, IgG1(N297A)-HC:TNC и IgG1(N-RGY), где все антигенсвязывающие сайты происходили из антитела 005-B08. Клетки HT1080-Bcl2-TNFR2 стимулировали супернатантами, содержащими антитела. На следующий день супернатанты анализировали с помощью

ELISA на содержание IL8 в качестве меры агонистической активности. Полученные результаты представлены графически на фиг. 28. Максимальный ответ, индуцированный C4-IgG1(N297A)-HC:C4 в качестве положительного контроля, обозначен на графике пунктирной линией. Несмотря на то, что исходное антитело 005-B08 является антагонистом TNFR2, неожиданно было обнаружено, что все переформатированные четырехвалентные конструкции продемонстрировали хорошую агонистическую активность, что свидетельствует о влиянии формата антитела.

Пример 24: Изменение длины линкера и положения scFv в четырехвалентных форматах

Возможное влияние длины линкера в scFv и того, связываются ли «Southern» группы scFv с C-концом легкой цепи или тяжелой цепи, изучали для «северных» и «южных» структур антитела, показанных на фиг. 29А. Разные варианты антител различались длиной линкера, соединяющего переменные тяжелую и легкую цепи scFv, при этом присутствовали либо три ((G4S)3), либо четыре ((G4S)4) повтора базового линкера GGGS (G4S), а также тем, присоединялись ли группы scFv к легкой или тяжелой цепи остова антитела.

Выполняли гель-фильтрацию очищенных C4-IgG1(Durv)-HC:scFvC4(G4S)4 и C4-IgG1(Durv)-LC:scFvC4(G4S); полученные результаты показаны на фиг. 29В. Способность конструкций служить в качестве агонистов TNFR2 также изучали по высвобождению IL-8, служившего в качестве меры агонистической активности; полученные результаты показаны на фиг. 29С. Для получения этих результатов клетки HT1080-Bcl2-TNFR2 стимулировали супернатантами клеток НЕК293, трансфицированных указанными конструкциями. На следующий день супернатанты анализировали с помощью ELISA на содержание IL8. Максимальный ответ, индуцированный высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF(143N/145R), использованного в качестве положительного контроля, показан пунктирной линией. Четырехвалентные конструкции работали хорошо независимо от длины линкера и того, связывались ли группы scFv с тяжелыми или легкими цепями, что свидетельствует о стабильной природе предоставленных форматов четырехвалентных антител.

Пример 25: Сравнение последовательностей вариантов C4 в форматах C4-IgG1(Durv)-HC/LC:scFvC4

Варианты переменной области C4 создавали *in silico*, оптимизируя последовательности с точки зрения гуманизации, деиммунизации и удаления уязвимостей РТМ с целью дальнейшей оптимизации последовательностей. Варианты последовательности C4 использовали в форматах C4-IgG1(Durv)-HC/LC:scFvC4. Белки получали, используя клетки НЕК293, и очищали с помощью белка А и эксклюзионной хроматографии. Очищенные варианты оценивали с помощью гель-фильтрационной хроматографии (результаты показаны на фиг. 30, панель А) и по высвобождению IL-8 в качестве меры активности агониста TNFR2 (результаты показаны на фиг. 30, панель В). Для измерения высвобождения IL-8 клетки HT1080-Bcl2-TNFR2 стимулировали

указанными конструкциями. Для сравнения включали родительскую конструкцию С4-IgG1(N297A)-HC:scFvC4. На следующий день супернатанты анализировали с помощью ELISA на содержание IL8. Максимальный ответ, индуцированный высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF(143N/145R), использованной в качестве положительного контроля, обозначен пунктирной линией. Как можно видеть из результатов, показанных на фиг. 30, варианты С4 были высокоэффективными в анализе IL-8.

Пример 26: Получение и оценка антител VHH

Для обеспечения дополнительных опций для получения анти-TNFR2 антител, инициировали кампанию по обнаружению VHH. Два целевых белка TNFR2 (Human-ECD-Fc и Murine-ECD-Flag-Fc) и контрольный белок использовали для скрининга библиотеки однодоменных антител (VHH) (Creative Biolabs CaVHHL-4) методом фагового дисплея. Альтернативные биопаннинги выполняли для обеих мишеней в четырех раундах, и для обеих мишеней идентифицировали специфические VHH, удаляя при этом связывающие агенты для контрольной метки Fc с отрицательным результатом. Секвенирование ДНК выполняли для 153 клонов и идентифицировали 14 уникальных положительных последовательностей.

Восемь из 14 клонов продемонстрировали специфическое связывание с человеческим TNFR2, экспрессируемым на поверхности клеток. Способность антител VHH связывать TNFR2 изучали, используя белки формата VHH-Fc-GpL, каждый из которых отличался присутствием специфического VHH; полученные результаты показаны на фиг. 31. Репортерный домен GpL клонировали на С-конце домена Fc антител. Анализ равновесного связывания для TNFR2-специфических конструкций sdAb VHH-Fc-GpL выполняли на клетках, экспрессирующих человеческий TNFR2, при 37°C, при этом клетки HEK293 использовали в качестве нетрансфицированных контрольных клеток. Полученные результаты показаны на фиг. 31. Специфическое связывание (светлые кружки) получали путем вычитания значений неспецифического связывания (клетки HeK293 - крестики) из значений связывания для трансфектантов, экспрессирующих человеческий TNFR2 (общее связывание - темные кружки). Специфическое связывание анализировали с помощью функции «нелинейной регрессии кривой для одного специфического связывающего сайта», с помощью программного обеспечения GraphPad Prism5. Как можно видеть на фиг. 31, варианты показали хорошее специфическое связывание с TNFR2.

Аналогичный эксперимент также выполняли для TNFR2 от разных видов, а именно от *Mus musculus* (мышь), *Macaca fasciata* (обезьяна-крабоед) и *Chlorocebus sabaeus* (африканская зеленая мартышка) для изучения способности областей VHH связываться с TNFR2 от разных видов. Изучение способности перекрестно реагировать на TNFR2 разных видов может оказаться полезной, поскольку позволяет исследовать антитела на различных моделях перед оценкой у пациентов-людей. Результаты, полученные в экспериментах, представлены в таблице 8 ниже, где «n.s.b.» в Таблице указывает на

отсутствие специфического связывания.

Таблица 8: Связывание антител VHH с белками TNFR2 разных видов

VHH	Сродство (нг/мл)		
	Мышь	Обезьяна-крабоед	Зеленая мартышка
C12	n.s.b.	n.s.b.	80
C18	> 3000	50	60
C36	n.s.b.	90	80
C74	n.s.b.	n.s.b.	60
C118	n.s.b.	50	100
C178	n.s.b.	n.s.b.	60
C188	950	450	150
C238	1050	200	170

Пример 27: Шестивалентные антитела, содержащие домены VHH антител

Для изучения влияния формата антител на сродство связывания использовали антитела с доменами VHH для получения шестивалентных антител формата 3xVHH-Fc-GpL, созданных для нескольких доменов VHH антител. Все домены VHH в данном шестивалентном антителе были одинаковыми. Затем изучали равновесное связывание этих антител с помощью того же подхода, что и в примере 26. На фиг. 32 показаны результаты равновесного связывания указанных TNFR2-специфических конструкций 3xVHH-Fc-GpL sdAb с клетками, экспрессирующими человеческий TNFR2, при 37°C. Репортерный домен GpL клонировали на С-конце домена Fc. Поразительно, но полученные результаты показали, что антитела шестивалентного формата демонстрируют высокое сродство связывания, при этом вариация Kd между различными VHH обычно намного ниже по сравнению с результатами для двухвалентных антител, показанных на фиг. 31. Предполагается, что результат, обеспечиваемый наличием множества связывающих сайтов, находящихся в непосредственной пространственной близости в шестивалентном формате и формате с более высокой валентностью, может быть более важным, чем, обеспечиваемый специфическим (двухвалентным) VHH, если речь идет о сродстве связывания, что свидетельствует о стабильной природе связывания шестивалентного формата.

Пример 28: Оценка блокирования связывания TNF α с TNFR2

Антитела шестивалентного формата VHH-Fc(DANA) с доменами VHH: VHH:C18, VHH:C74, VHH:C188 или VHH:C238, в качестве связывающих сайтов сравнивали на их способности блокировать связывание TNF α с TNFR2. Полученные результаты показаны на фиг. 33. Клетки HT1080-Bcl2-TNFR2 предварительно обрабатывали указанными количествами TNFR2-специфических конструкций sdAb или CD40-специфической конструкции 3xVHH:CD40(V12t)-Fc(DANA), использованной в качестве отрицательного контроля, поскольку эта конструкция является специфической к CD40, а не к TNFR2. Ко

всем образцам добавляли 5 нг/мл GpL-TNF и затем измеряли связывание через 1 час инкубации при 37°C. В крайнем левом столбце на фиг. 33 показаны результаты для положительного контроля, т.е. в отсутствие другой конструкции и, следовательно, при 100% связывании TNF α с TNFR2. В последующих столбцах показаны результаты для указанных конструкций с активностью, выраженной в процентах от значения отрицательного контроля. Все варианты 3xVHH-Fc(DANA) VHH:C18, VHH:C74, VHH:C188 и VHH:C238 в формате шестивалентного антитела продемонстрировали способность эффективно блокировать связывание TNF с рецептором TNFR2. V12t CD40-VHH описан в «A Bispecific Antibody Antagonizes Prosurvival CD40 Signaling and Promotes Vg9Vd2 T cell-Mediated Antitumor Responses in Human B-cell Malignancies A. C Iris de Weerd, Roeland Lameris, George L. Scheffer, Jana Vree, Renate de Boer, Anita G. Stam, Rieneke van de Ven, Mark-David Levin, Steven T. Pals, Rob C. Roovers, Paul W.H.I. Parren, Tanja D. de Gruijl, Arnon P. Kater, and Hans J. van der Vliet».

Пример 29: Способность шестивалентных конструкций специфически связывать TNFR2, не связываясь с TNFR1

Клетки HEK293 временно трансфицировали векторами экспрессии, кодирующими TNFR1 и TNFR2, а затем анализировали на связывание различных шестивалентных конструкций; полученные результаты показаны на фиг. 34. Оцениваемые шестивалентные конструкции показаны на фиг. 34. Связывание с клетками, трансфицированными пустым вектором, служило отрицательным контролем неспецифического связывания. TNF-GpL служил положительным контролем для успешного связывания TNFR1. Сравнивая результаты на левых графиках, демонстрирующих связывание TNFR1, с соответствующим графиком справа для связывания TNFR2, можно увидеть, что все шестивалентные конструкции продемонстрировали специфическое связывание с TNFR2 по сравнению с TNFR1, что обеспечивает избирательность нацеливания TNFR2.

Пример 30: VHH:C18, VHH:C188 и VHH:C238 связываются с CRD4 TNFR2, а VHH:C74 связывается с CRD3

Черные 96-луночные планшеты покрывали белком G, а затем загружали версиями 3xVHH-Fc(DANA) указанного TNFR2-специфического VHH. После удаления несвязавшихся белков иммобилизованные конструкции антител анализировали на связывание GpL-меченных мутантов TNFR2(ed) с делециями, как показано на вестерн-блоте на правой панели. Наконец, выполняли количественное определение связывания этих GpL-слитых белков, как показано на фиг. 35. Связывание клонов VHH с различными доменами CRD схематически представлено на фиг. 15.

Пример 31. Конструкции на основе четырехвалентного N-концевого VHH являются сильными агонистами TNFR2

Затем изучали способность четырехвалентных «только северных» TNFR2-специфических вариантов sdAb действовать в качестве агонистов TNFR2; полученные результаты показаны на фиг. 36. Клетки HT1080-Bcl2-TNFR2 стимулировали супернатантами, содержащими указанные моно- или бипаратопные конструкции. На

следующий день супернатанты анализировали с помощью ELISA на содержание IL8. Максимальный ответ, индуцированный высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF TNF(143N/145R) (верхняя панель) или C4-IgG1(N297A)-HC:C4 (средняя и нижняя панели), служил положительным контролем и обозначен пунктирной линией. Четырехвалентные «только северные» конструкции являются сильными агонистами.

Пример 32: Шестивалентные только N-концевые TNFR2-специфические варианты sdAb являются сильными агонистами TNFR2

Затем изучали способность шестивалентных «только северных» антител VNH действовать в качестве агонистов TNFR2, используя в качестве маркеров высвобождение IL-8 и жизнеспособность клеток. Полученные результаты показаны на фиг. 37. Для получения результатов, показанных на панели (A), клетки HT1080-Vcl2-TNFR2 стимулировали указанными конструкциями. На следующий день супернатанты анализировали с помощью ELISA на содержание IL8. Максимальный ответ, индуцированный высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF(143N/145R), использованного в качестве положительного контроля, обозначен пунктирной линией. Для получения результатов, показанных на панели (B), клетки Кум-1 стимулировали различными шестивалентными вариантами и жизнеспособность клеток определяли на следующий день с помощью МТТ-анализа. Максимальная гибель, индуцированная 200 нг/мл высокоактивной олигомерной формы TNFR2-специфического мутанта TNF (143N/145R), также показана пунктирной линией. Этот анализ позволяет измерить активацию и передачу сигналов TNFR2 по отдельному пути, которые оценивали по высвобождению IL-8. В целом результаты показывают, что шестивалентный «только северный» формат демонстрирует сильную активность TNFR2 с доменами VNH.

Пример 33: Параллельное сравнение агонистической активности VNH:C188-Fc, 2xVNH:C188-Fc-GpL и 3xVNH:C188-Fc.

Сравнивали способность разных форматов антител, содержащих один и тот же домен VNH. Сравнивали форматы VNH:C188-Fc, 2xVNH:C188-Fc-GpL и 3xVNH:C188-Fc, в каждом из которых использовались домены VNH C188; полученные результаты показаны на фиг. 38. На фиг. 38 на панелях (A) и (B) показаны результаты очищенных белков, проанализированных с помощью SDS-PAGE (A) и гель-фильтрации (B). На панели (C) показаны результаты высвобождения IL-8. Клетки HT1080-Vcl2-TNFR2 стимулировали указанными конструкциями. На следующий день супернатанты анализировали с помощью ELISA на содержание IL8. Максимальный ответ, индуцированный высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF(143N/145R), использованной в качестве положительного контроля, обозначен пунктирной линией. На панели (D) показаны результаты жизнеспособности клеток Кум-1, стимулированных различными указанными вариантами VNH:C188. После стимуляции на следующий день определяли жизнеспособность клеток с помощью МТТ-анализа. Максимальная гибель, индуцированная C4-IgG1(N297A)-HC:scFvC4, показана

пунктирной линией. Самым эффективным из трех форматов был формат шестивалентных антител 3xVНН:С188-Fc, показавший самый высокий уровень стимуляции высвобождения IL-8 и снижения жизнеспособности клеток.

Пример 34: Параллельное сравнение активности IL8 и индуцирующей гибель клеток активности вариантов VНН-Fc-GpL, 2xVНН-Fc-GpL и 3xVНН-Fc-GpL C18 и C74

Дальнейшее сравнение разных форматов антител с одним и тем же связывающим доменом VНН выполняли для вариантов VНН-Fc-GpL, 2xVНН-Fc-GpL и 3xVНН-Fc-GpL C18 и C74 с помощью тех же анализов IL-8 и жизнеспособности клеток, как в предыдущих примерах. Полученные результаты показаны на фиг. 39. Клетки HT1080-Bcl2-TNFR2 стимулировали указанными конструкциями. На панели (А) показаны результаты супернатантов, проанализированных с помощью ELISA на содержание IL8. На панели (В) показаны результаты анализа жизнеспособности клеток, при котором клетки Кум-1 стимулировали различными вариантами, а на следующий день определяли жизнеспособность клеток с помощью МТТ-анализа. Указаны максимальные ответы, индуцированные высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF(143N/145R). Интересно, что в обоих анализах наиболее активным был шестивалентный формат варианта C18. Шестивалентный формат C74 был лучшим форматом для стимуляции высвобождения IL-8, но ни один из форматов не вызывал заметного снижения жизнеспособности клеток. Предполагается, что это указывает на то, что VНН антитела C74 не запускает ни один из этих двух TNFR2-опосредованных сигнальных путей, а только стимулирует передачу сигналов по ним, что вызывает высвобождение IL-8.

Пример 35: Длина линкера между доменами VНН вариантов 3xVНН:С188-IgG1(Durv) не влияет на агонизм TNFR2

Затем изучали влияние разделения доменов VНН с помощью линкеров с постепенно увеличивающейся длиной, используя формат антител 3xVНН:С188-IgG1(Durv) с линкерами с постепенно увеличивающейся длиной. Разные сравниваемые антитела имели между доменами VНН либо один линкер G4S (GSSSS), либо три линкера (G4S)₃, либо пять линкеров (G4S)₅. Полученные результаты показаны на фиг. 40. На панели (А) показана доменная архитектура конструкций. На панели (В) показан анализ SDS-PAGE очищенных конструкций, а на панели (С) показаны результаты гель-фильтрационного анализа. На панели (D) показаны результаты анализа высвобождения IL-8, при этом клетки HT1080-Bcl2-TNFR2 стимулировали супернатантами, содержащими указанные конструкции. На следующий день супернатанты анализировали с помощью ELISA на содержание IL8. Максимальный ответ, индуцированный высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF (143N/145R) обозначен пунктирной линией. Исходную молекулу 3xVНН:С188-Fc(DANA) включали для сравнения. Как можно видеть на фиг. 40 на панели (D), увеличение общей длины линкера не оказывало никакого влияния на агонизм TNFR2, измеренный по высвобождению IL-8,

что еще раз иллюстрирует стабильную природу шестивалентного формата.

Пример 36: Конструкции разной доменной архитектуры с 2, 3, 4, 6 или 9 доменами VHH:C188 вызывают сильный агонизм TNFR2

Разные форматы антител дополнительно сравнивали, используя домен VHH C188. Полученные результаты показаны на фиг. 41. На панели (A) показана архитектура домена антител. TNC относится к домену тримеризации тенасцина-С. На панелях (B) показаны результаты агонистической активности TNFR2, измеренной по высвобождению IL-8. Клетки HT1080-Vcl2-TNFR2 стимулировали указанными конструкциями. На следующий день супернатанты анализировали с помощью ELISA на содержание IL8. Максимальный ответ, индуцированный высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF (143N/145R), обозначен пунктирной линией. Конструкции, содержащие по меньшей мере четыре домена VHH, как правило, давали наилучшие результаты, особенно для тех антител, в которых в одном и том же полипептиде присутствовали по меньшей мере два домена VHH.

Пример 37: Белок G усиливает агонистическую активность вариантов моноклонального анти-TNFR2 антитела C4 с оптимизированной последовательностью

Как показано на фиг. 42, повышенную активность в присутствии белка G получали для вариантов Ab C4, что указывает на наличие латентного агонизма, который может быть реализован путем мультимеризации моноклональных антител. (A) Вестерн-блот анализ супернатантов культуры клеток HEK293, временно трансфицированных экспрессионными плазмидами, кодирующими легкую и тяжелую цепи указанных вариантов антитела, выполненный с использованием антитела к человеческому IgG1. (B) Клетки HT1080-TNFR2 стимулировали указанными концентрациями вариантов C4 в присутствии и в отсутствие 500 нг/мл белка G. На следующий день клеточные супернатанты анализировали на продуцирование IL8 с помощью ELISA. Максимальный ответ, индуцированный высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF (143N/145R), обозначен пунктирной линией.

Пример 38: Агонизм TNFR2 вариантов 3xVHH:C188-Fc(Durv) с оптимизированной последовательностью

Создавали *in silico* пятнадцать вариантов с оптимизированными последовательностями с точки зрения гуманизации, деиммунизации и удаления уязвимостей РТМ. Для одного варианта (вариант 14) также создавали конструкции с изменяющейся длиной линкера между разными VHH. Как показано на фиг. 43 на панели (A), успешно получали все варианты конструкций: вестерн-блот анализ супернатантов культур клеток HEK293, временно трансфицированных экспрессионными плазмидами, кодирующими указанные варианты 3xVHH:C188-Fc(Durv), выполненный с использованием антитела к человеческому IgG1. Все варианты в формате 3xVHH:C188-Fc(Durv) были биоактивными, как можно видеть на панели (B), показывающей результаты анализа высвобождения IL-8, в котором клетки HT1080-Vcl2-TNFR2 стимулировали

супернатантами, содержащими указанные конструкции: клетки HT1080-TNFR2 подвергали заражению указанными концентрациями вариантов 3xVHH:C188-Fc(Durv) и родительской молекулы 3xVHH:C188-Fc(DANA). На следующий день клеточные супернатанты анализировали на продуцирование IL8 с помощью ELISA. Максимальный ответ, индуцированный высокоактивной олигомерной формой TNFR2-специфического мутанта TNF (143N/145R), обозначен пунктирной линией.

Пример 39: Агонисты TNFR2 увеличивают количество Treg в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC)

Оценивали способность конкретных TNFR2-связывающих молекул стимулировать размножение регуляторных Т-клеток, используя разные TNFR2-связывающие сайты для размножения мононуклеарных клеток периферической крови. Результаты, полученные с использованием четырехвалентных антител в формате Fab-НС-scFv (C4-IgG1(N297A)-НС:scFvC4, C19-IgG1(N297A)-НС:scFvC19 и C40-IgG1(N297A)-НС:scFvC40), и шестивалентных конструкций VHH в формате 3xVHH-Fc (3xVHH:C188-Fc(Durv)), показаны на фиг. 44 и представляют собой расширение данных, показанных на фиг. 21. PBMC выделяли из количества доноров, указанного для каждого состояния, и клетки от каждого донора оценивали отдельно. PBMC культивировали в течение двух дней с плотностью 10^7 клеток/мл. Затем PBMC собирали и высевали в многолуночные планшеты с плотностью 10^6 клеток/мл, по 500000 клеток на лунку. После культивирования в течение четырех дней клетки окрашивали антителами, специфичными к CD3, CD8, CD4, CD25 и FoxP3, для анализа методом проточной цитометрии. На фиг. 44 показана кратность изменения частоты Treg мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC) через 4 дня стимуляции указанным TNFR2-агонистом по сравнению с необработанным контролем того же донора. Образцы измеряли с помощью проточной цитометрии, и Treg определяли как FoxP3⁺CD4⁺CD3⁺ Т-клетки. Количество отдельных доноров обозначено буквой n. Значимость проверяли с помощью t-критерия для одной выборки с гипотетическим значением 1 и обозначали *P=0,05, **P=0,01, ***P=0,001, ****P <0,0001.

Пример 40: C4-IgG1(N297A)-НС:scFvC4 активировывает Treg

Дополнительно изучали способность антител формата IgG1(N297A)-НС:scFv с TNFR2-связывающими сайтами C4 активировать Treg. Полученные результаты показаны на фиг. 45. PBMC человека стимулировали в течение 4 дней 100 нг/мл C4-IgG1(N297A)-НС:scFvC4 и экспрессию маркеров, связанных с активностью Treg, измеряли с помощью проточной цитометрии. Показана кратность изменения экспрессии по сравнению с необработанным контролем того же донора. Treg определяли как FoxP3⁺CD4⁺CD3⁺ Т-клетки. Показано среднее значение ± стандартное отклонение, а каждая точка представляют отдельного донора.

Пример 41: 3xVHH:C188(G4S)1-Fc(Durv) активировывает Treg

Способность шестивалентного формата антитела, содержащего домены VHH, активировать Treg, изучали с использованием антитела формата 3xVHH:C188(G4S)1-Fc(Durv). Полученные результаты показаны на фиг. 46. PBMC человека стимулировали в

течение 4 дней указанной концентрацией 3xVHHC188(G4S)1-Fc(Durv) и экспрессию маркеров, связанных с активностью Treg, измеряли с помощью проточной цитометрии. Показана кратность изменения экспрессии по сравнению с необработанным контролем того же донора. Treg определяли как FoxP3⁺CD4⁺CD3⁺ Т-клетки. Показано среднее значение ± стандартное отклонение, а каждая точка представляет отдельного донора.

Пример 42: Агонисты TNFR2 стимулируют увеличение количества CD4 Т-клеток, экспрессирующих человеческий TNFR2 *in vitro*

Обогащенные Т-клетки CD4, полученные от мышей с нокинном человеческого TNFR2, стимулировали различными концентрациями (А) C4-C4 (C4-IgG1(N297A)-HC:scFvC4) или (В) 3xVHH:C188-Fc(DANA), что приводило к увеличению частоты Treg через 4 дня культивирования с соответствующими агонистами. Данные на фиг. 47 представлены в виде кратного увеличения Т-клеток CD25^{high}FoxP3^{high} CD4 по сравнению с необработанными (изотипический контроль) образцами.

Пример 43: Удерживание Fc(DANA)-TNC-muTNF80 в сыворотке

Затем изучали удерживание Fc(DANA)-TNC-muTNF80 в сыворотке; полученные результаты показаны на фиг. 48. Концентрации IL-8 измеряли с помощью ELISA для супернатантов клеточных культур HT1080-Bcl2-TNFR2, стимулированных сывороткой, выделенной в заданных временных точках из периферической крови мышей дикого типа, которым в 0 часов вводили 75 мкг Fc(DANA)-TNC-muTNF80 или изотипического контрольного антитела. Данные показаны на фиг. 48.

Пример 44: Агонисты TNFR2 на основе лиганда увеличивают количество Treg *in vivo* и активируют маркеры активации

Затем изучали способность агонистов TNFR2 на основе лиганда стимулировать размножение Treg *in vivo* и активировать маркеры активации; полученные результаты показаны на фиг. 49. (А) Частота Treg в жизнеспособных клетках в селезенке, выделенных через четыре дня после стимуляции 75 мкг Fc(DANA)-TNC-muTNF80 у мышей дикого типа. (В) Кратность изменения выбранных внеклеточных маркеров, определенная в виде средней интенсивности флуоресценции (MFI), измеренной для Treg и нормализованной по образцам изотипических контрольных антител. Данные показаны на фиг. 49.

Пример 45: Агонист TNFR2 увеличивает уровень Treg в селезенке *in vivo*

Частоту Treg определяли в селезенке мышей, экспрессирующих huTNFR2, выделенных через четыре дня после обработки мышей 3xVHH:C188-Fc(DANA) или изотипическим контрольным антителом, или C4-IgG1(N297A)-HC:scFv:C4. Кратность изменения вычисляли относительно изотипического контроля или необработанного контроля в том же эксперименте. Как показано на фиг. 50, агонист TNFR2 может увеличивать *in vivo* Treg в селезенке мышей KI, экспрессирующих человеческий TNFR2. Сравнение средних значений между группами обработки и контролем выполняли с помощью непарного t-теста. * p≤0,05, ns=нет.

Пример 46: Агонисты TNFR2 увеличивают выживаемость после острой реакции «трансплантат против хозяина», индуцированной трансплантацией

аллогенных гемопоэтических клеток (алло-НСТ)

Изучали влияние агонистов TNFR2 на модели реакции «трансплантат против хозяина» (GvHD); полученные результаты показаны на фиг. 51. На панели (А) показаны частоты выживаемости после экспериментальной острой GvHD, индуцированной алло-НСТ у мышей (FVB/N H-2q→C57BL/6 H-2^b, модель основного несоответствия МНС). Статистическую значимость оценивали с помощью теста Log-Rank между каждой группой, обработанной агонистом TNFR2, и группой, обработанной изотипическим контрольным антителом, * $p \leq 0,05$. На панели (В) показана оценка патологии образцов кишечника, полученных на 6-й день после алло-НСТ, на основе инфильтратов иммунных клеток и повреждения крипт кишечника.

Пример 47: Агонист TNFR2 увеличивает количество Treg из мононуклеарных клеток периферической крови африканской зеленой мартышки (PBMC)

Замороженные мононуклеарные клетки периферической крови африканской зеленой мартышки размораживали, культивировали по 2×10^5 клеток на лунку и либо оставляли необработанными, либо обрабатывали 1, 10, 100, 1000 нг/мл C4-IgG1(N297A)-НС:scFvC4 в течение 5 дней при 37°C. Образцы измеряли с помощью проточной цитометрии, и Treg характеризовали как CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺ Т-клетки. Как показано на фиг. 52, обработка агонистом TNFR2 приводит к дозозависимому увеличению количества Treg в PBMC африканской зеленой мартышки.

Пример 48: Клоны C188 и C4 конкурируют с TNF за связывание с человеческим TNFR2

Клетки HT1080-Vcl2-TNFR2 предварительно обрабатывали указанными количествами TNFR2-специфических конструкций VHH или CD20-специфическим mAb ритуксимабом, использованным в качестве отрицательного контроля, или оставляли необработанными. Добавляли 5 нг/мл GpL-TNF и измеряли связывание через 1 час инкубации при 37°C. Наличие клона C188 в формате C188-VHH-IgG1(N297A) VHH-Fc и клона C4 в формате антитела C4-IgG1(N297A) уменьшали степень связывания TNF-GpL с клетками HT1080-Vcl2-TNFR2, как показано на панели В фиг. 35.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Связывающая молекула, которая специфически связывает TNFR2, но не TNFR1, где связывающая молекула представляет собой FcγR-независимый агонист TNFR2 и имеет валентность для связывания TNFR2, равную по меньшей мере двум.

2. Связывающая молекула по п.1, где связывающая молекула имеет валентность, равную по меньшей мере четырем.

3. Связывающая молекула по п. 1 или п. 2, где:

(а) связывающая молекула имеет валентность для TNFR2, равную шести; или

(b) связывающая молекула имеет валентность для TNFR2, равную четырем.

4. Связывающая молекула по любому из предшествующих пунктов, где по меньшей мере один TNFR2-специфический антигенсвязывающий домен связывающей молекулы представляет собой однодоменное TNFR2-специфическое связывающее вещество (sdB), предпочтительно однодоменное TNFR2-специфическое антитело (sdAb).

5. Связывающая молекула по п.4, где по меньшей мере одно TNFR2-специфическое sdB_T (однодоменный связывающий агент) представляет собой VHH.

6. Связывающая молекула по любому из предшествующих пунктов, содержащая шесть TNFR2-специфических антигенсвязывающих сайтов, каждый из которых представляет собой TNFR2-специфический антигенсвязывающий домен VHH.

7. Связывающая молекула по п.6, где:

(а) связывающая молекула содержит шесть антигенсвязывающих доменов VHH и область Fc, где предпочтительно связывающая молекула представляет собой шестивалентное антитело;

(b) связывающая молекула содержит два полипептида, где каждый полипептид содержит три TNFR2-специфических связывающих домена VHH, где предпочтительно связывающая молекула представляет собой шестивалентное антитело;

(c) связывающая молекула содержит два полипептида, где каждый полипептид содержит три TNFR2-специфических связывающих домена VHH, где каждый полипептид дополнительно содержит на своей С-концевой части последовательность константной области тяжелой цепи, содержащую CH2-CH3, но не CH1, предпочтительно, где связывающая молекула представляет собой шестивалентное антитело; или

(d) связывающая молекула содержит два полипептида, где каждый полипептид содержит три TNFR2-специфических связывающих домена VHH, где каждый полипептид дополнительно содержит на своей С-концевой части последовательность константной области тяжелой цепи, содержащую CH2-CH3, но не CH1, и модификации, означающие, что домен Fc имеет пониженную эффекторную функцию, где предпочтительно связывающая молекула представляет собой шестивалентное антитело.

8. Связывающая молекула по любому из предшествующих пунктов, где:

(а) связывающая молекула содержит антигенсвязывающий сайт, содержащий домен VHH, содержащий набор из трех CDR, выбранных из наборов SEQ ID NO: 213/214/215; 216/217/218; 219/220/221; 222/223/224; 225/226/227; 228/229/230; 231/232/233;

234/235/236; 237/238/239; 240/241/242; 243/244/245; 246/247/248; 249/250/251; 252/253/254; или вариант набора CDR любого из этих наборов, содержащий в общей сложности до пяти изменений аминокислотной последовательности, при этом вариант антигенсвязывающего сайта сохраняет способность связывать TNFR2;

(b) связывающая молекула содержит антигенсвязывающий сайт, содержащий домен VHH, содержащий три CDR с SEQ ID NO: 154/155/156 или вариант набора этих трех CDR в общей сложности с пятью изменениями аминокислотной последовательности, при этом вариант антигенсвязывающего сайта сохраняет способность связывать TNFR2;

(c) связывающая молекула содержит антигенсвязывающий сайт, содержащий набор из трех CDR, выбранных из 154/155/156; 160/161/162; 163/164/165; 166/167/168; 169/170/171; 181/182/183; 187/188/189; 193/194/195, или вариант набора любых из них, содержащий до пяти изменений аминокислотной последовательности, при этом антигенсвязывающий сайт сохраняет способность связывать TNFR2;

(d) связывающая молекула является шестивалентной и содержит шесть антигенсвязывающих сайтов VHH, все из которых являются одинаковыми и представляют собой антигенсвязывающий сайт, определенный в любом из (a)-(c);

(e) связывающая молекула является шестивалентной и содержит два полипептида, каждый из которых содержит три антигенсвязывающих сайта VHH, где все шесть антигенсвязывающих сайтов представляют собой одни и те же антигенсвязывающие сайты, определенные в любом из (a)-(c);

(f) связывающая молекула является шестивалентной и содержит шесть антигенсвязывающих сайтов VHH, где по меньшей мере два из антигенсвязывающих сайтов VHH имеют разную TNFR2-специфичность, где по меньшей мере одна из этих специфичностей обеспечивается антигенсвязывающим сайтом VHH, определенным в любом из (a)-(c);

(g) связывающая молекула является шестивалентной и содержит шесть антигенсвязывающих сайтов VHH, где по меньшей мере три из антигенсвязывающих сайтов VHH имеют разную TNFR2-специфичность, где по меньшей мере одна из этих специфичностей обеспечивается антигенсвязывающим сайтом VHH, определенным в любом из (a)-(c); или

(h) связывающая молекула является шестивалентной и содержит шесть антигенсвязывающих сайтов VHH, где все шесть антигенсвязывающих сайтов VHH имеют разную TNFR2-специфичность, где по меньшей мере одна из этих специфичностей обеспечивается антигенсвязывающим сайтом VHH, определенным в любом из (a)-(c).

9. Связывающая молекула по любому из пп. 1-8, где:

(a) связывающая молекула содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий домен VHH с SEQ ID No: 198-211 или его вариант, идентичный на по меньшей мере 90%, который все еще способен связывать TNFR2;

(b) связывающая молекула содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий домен VHH, выбранный из SEQ ID No: 140 или любого из ее вариантов, идентичного на

по меньшей мере 90%;

(с) связывающая молекула содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий домен VHH, выбранный из SEQ ID No: 140, 142-145, 149, 151, 153 или любого из их вариантов, идентичных на по меньшей мере 90%, которые все еще способны связывать TNFR2;

(d) связывающая молекула содержит два полипептида, каждый из которых содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий домен VHH, определенный в пунктах (a), (b)-(c);

(e) связывающая молекула содержит два полипептида, каждый из которых содержит три антигенсвязывающих домена VHH, определенных в (a), (b) или (c);

(f) связывающая молекула содержит два полипептида, каждый из которых содержит три антигенсвязывающих домена VHH, определенных в (a), (b) или (c), где все TNFR2-специфические антигенсвязывающие домены связывающей молекулы являются одинаковыми; или

(g) связывающая молекула содержит два полипептида, каждый из которых содержит три антигенсвязывающих домена VHH, определенных в (a), (b) или (c), где не все TNFR2-специфические антигенсвязывающие домены VHH связывающей молекулы являются одинаковыми.

10. Связывающая молекула по любому из пп. 1-7, где:

(a) связывающая молекула содержит два полипептида, каждый из которых имеет:

(i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197, за исключением того, что домен VHH, соответствующий SEQ ID NO: 140 в этой последовательности, вместо этого представляет собой последовательность одной из SEQ ID NO: 198-211; или

(ii) вариант аминокислотной последовательности, который на по меньшей мере 90% является идентичным последовательности (i) и который все еще способен связывать TNFR2;

(b) связывающая молекула содержит два полипептида, каждый из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197 или вариант аминокислотной последовательности, идентичный на по меньшей мере 90%, который все еще способен связывать TNFR2, где предпочтительно каждый полипептид содержит три таких VHH-связывающие домена;

(c) связывающая молекула содержит два полипептида, каждый из которых имеет:

(i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197, за исключением того, что домен VHH, соответствующий SEQ ID NO: 140 в этой последовательности, вместо этого представляет собой последовательность одной из SEQ ID NO: 140, 142-145, 149, 151, или 153;

(ii) аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% является идентичной последовательности (i) и которая все еще способна связывать TNFR2;

(d) любой из (a)-(c), где вариант аминокислотной последовательности имеет от

одного до пяти изменений аминокислотной последовательности по сравнению со специфической последовательностью, и связывающая молекула сохраняет способность связывать TNFR2, где предпочтительно вариант имеет только одно, два или три и более предпочтительно одно изменение аминокислотной последовательности по сравнению со специфической последовательностью; или

(е) любой из (а)-(с), где вариант аминокислотной последовательности имеет последовательность аминокислот 302-405 SEQ ID NO: 197, замененную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 327.

11. Связывающая молекула по любому из пп. 1-7, где:

(а) связывающая молекула содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 330 или ее вариант, идентичный на по меньшей мере 90%, который все еще способен связывать TNFR2;

(b) связывающая молекула содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 331 или ее вариант, идентичный на по меньшей мере 90%, который все еще способен связывать TNFR2; или

(с) связывающая молекула содержит три полипептида (а) или три полипептида (b).

12. Связывающая молекула по любому из пп.1-3, где связывающая молекула представляет собой антитело с валентностью четыре, имеющее как «N-концевую», так и «С-концевую» ориентацию TNFR2-связывающих сайтов.

13. Связывающая молекула по любому из пп. 1-3 или п. 12, где:

(а) связывающая молекула содержит антигенсвязывающий сайт, содержащий набор из шести CDR, где:

(i) CDR легкой цепи выбирают из набора CDR1/CDR2/CDR3, выбранного из SEQ ID NO: 266/267/268; 269/270/271; 272/273/274; 275/276/277, и CDR тяжелой цепи выбирают из набора CDR1/CDR2/CDR3, выбранного из 282/283/284; 285/286/287; 288/289/290; или 291/292/293; или

(ii) набор из шести CDR представляет собой вариант набора из шести CDR из (i) с не более чем пятью аминокислотными заменами по сравнению со специфическими шестью CDR, и где антигенсвязывающий сайт сохраняет способность связывать TNFR2;

(b) связывающая молекула содержит антигенсвязывающий сайт, содержащий набор из шести CDR, где:

(i) CDR1/CDR2/CDR3 легкой цепи представляют собой SEQ ID NO: 69/70/71, и CDR1/CDR2/CDR3 тяжелой цепи представляют собой SEQ ID NO: 102/103/104;

(ii) набор из шести CDR представляет собой вариант набора из шести CDR из (i) с не более чем пятью аминокислотными заменами по сравнению со специфическими шестью CDR и где антигенсвязывающий сайт сохраняет способность связывать TNFR2;

(с) связывающая молекула содержит антигенсвязывающий сайт, содержащий набор из трех CDR легкой цепи и/или набор из трех CDR тяжелой цепи из представленных в таблице 5;

(d) связывающая молекула содержит набор из шести CDR из набора из шести,

представленных в таблице 5, или вариант набора из шести CDR с не более чем пятью изменениями аминокислотной последовательности, где вариант сохраняет способность связывать TNFR2;

(f) связывающая молекула содержит четыре антигенсвязывающих сайта, как указано в любом из (a)-(d), где все четыре антигенсвязывающих сайта являются одинаковыми;

(g) связывающая молекула содержит четыре антигенсвязывающих сайта, как указано в любом из (a)-(d), где все четыре антигенсвязывающих сайта являются одинаковыми, и где антитело является четырехвалентным для TNFR2; или

(h) связывающая молекула содержит четыре антигенсвязывающих сайта, как указано в любом из (a)-(d), где все четыре антигенсвязывающих сайта являются одинаковыми, и где антитело является четырехвалентным для TNFR2, с двумя антигенсвязывающими сайтами с N-концевой ориентацией и двумя антигенсвязывающими сайтами с C-концевой ориентацией.

14. Связывающая молекула по любому из пп. 1-3 или п. 12, где связывающая молекула представляет собой антитело, содержащее:

(a) два полипептида легкой цепи, которые представляют собой:

(i) два полипептида легкой цепи, где каждый полипептид легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую последовательность SEQ ID NO: 261, за исключением того, что аминокислотная последовательность, соответствующая SEQ ID NO: 295, заменена последовательностью, выбранной из одной из SEQ ID NO: 262-265; или

(ii) два варианта полипептида легкой цепи, каждый из которых является на по меньшей мере 90% идентичным последовательности (i); и

(b) два полипептида тяжелой цепи, которые представляют собой:

(iii) два полипептида тяжелой цепи, где каждый полипептид тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую последовательность SEQ ID NO: 259, за исключением того, что аминокислотная последовательность, соответствующая SEQ ID NO: 296, заменена последовательностью, выбранной из одной из SEQ ID NO: 278-281; или

(iv) два варианта полипептида тяжелой цепи, каждый из которых является на по меньшей мере 90% идентичным последовательности (iii).

15. Связывающая молекула по любому из пп. 1-3 или п. 12, где связывающая молекула представляет собой антитело, содержащее:

(a) два полипептида легкой цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 261 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 261; или

(b) два полипептида тяжелой цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 259 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 259.

16. Связывающая молекула по любому из пп. 1-3 или п. 12, где связывающая

молекула:

(а) содержит легкую цепь SEQ ID NO: 332 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 333 или их варианты, идентичные на по меньшей мере 90%, где связывающая молекула все еще способна действовать как агонист TNFR2;

(b) содержит легкую цепь SEQ ID NO: 334 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 335 или их варианты, идентичные на по меньшей мере 90%, где связывающая молекула все еще способна действовать как агонист TNFR2;

(с) содержит легкую цепь SEQ ID NO: 336 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 337 или их варианты, идентичные на по меньшей мере 90%, где связывающая молекула все еще способна действовать как агонист TNFR2; или

(d) содержит две легкие и две тяжелые цепи, определенные в (а), (b) или (с).

17. Связывающая молекула по любому из предшествующих пунктов, которая способна:

(а) олигомеризовать TNFR2 на поверхности клетки, экспрессирующей TNFR2, предпочтительно кластеризовать шесть или более молекул TNFR2 на поверхности клетки;

(b) запускать передачу сигналов TNFR2; и/или

(с) стимулировать пролиферацию лейкоцитов, предпочтительно Т-клеток, более предпочтительно Treg клеток.

18. Связывающая молекула по п. 1, где:

(а) связывающая молекула содержит фрагмент, который изменяет период полувыведения из сыворотки, предпочтительно, где фрагмент выбирают из группы, состоящей из хвоста Fc, сывороточного альбумина, фрагмента, который является связывающим агентом сывороточного альбумина, и ПЭГ;

(а) связывающая молекула является двухвалентной для связывания TNFR2;

(b) связывающая молекула является трехвалентной для связывания TNFR2;

(с) связывающая молекула является четырехвалентной для связывания TNFR2; или

(d) связывающая молекула, которая имеет валентность для связывания TNFR2, равную по меньшей мере четырем.

19. Связывающая молекула по п. 1, где:

(а) связывающая молекула представляет собой антитело;

(b) связывающая молекула представляет собой антитело, которое содержит лиганд TNFR2;

(с) связывающая молекула содержит по меньшей мере часть константной области антитела, предпочтительно область Fc; или

(d) связывающая молекула содержит лиганд TNFR2, где предпочтительно лиганд получен из TNF α или лимфотоксина-альфа,

где предпочтительно связывающая молекула представляет собой:

(а) антитело, которое содержит TNFR2-связывающий сайт как на N-конце, так и на C-конце одной или более тяжелых цепей антитела; или

(b) антитело, которое содержит TNFR2-связывающий сайт как на N-конце, так и на

C-конце одной или более легких цепей антитела.

20. Связывающая молекула по п. 19, где:

- (a) антитело представляет собой двухвалентное антитело;
- (b) антитело представляет собой трехвалентное антитело;
- (c) антитело представляет собой четырехвалентное антитело;
- (d) антитело представляет собой шестивалентное антитело;
- (e) антитело представляет собой антитело, содержащее только тяжелые цепи;
- (f) антитело представляет собой однодоменное антитело, такое как однодоменное

Ab (sdAb), VHH или нанотело;

(g) антитело представляет собой мультимер по меньшей мере из двух антител;

(h) антитело содержит или связано с мультимеризующим фрагментом, предпочтительно пептидом тенасцина-с (TNC), где предпочтительно антитело представляет собой мультимер по меньшей мере из двух антител, связанных через последовательность пептида тенасцина-с;

(i) антитело связано с одной или более молекулами, полученными из лиганда TNFR2, предпочтительно полученного из TNF- α или лимфотоксина альфа.

21. Связывающая молекула по п. 19 или п. 20, где:

(a) в антителе отсутствует область Fc;

(b) антитело содержит модифицированную область Fc, которая не способна связывать рецепторы Fc; или

(c) антитело содержит константные области тяжелой цепи, лишенные СН1.

22. Связывающая молекула по п. 1, где связывающая молекула представляет собой антитело в формате антитела, выбранном из:

- IgG с модификацией Fc, устраняющей связывание рецептора Fc;

- scFv:IgG, где IgG имеет модификацию Fc, устраняющую связывание с рецептором Fc;

- IgG-NC:TNC, где IgG имеет модификацию, устраняющую связывание с рецептором Fc;

- scFv:IgG-NC:TNC, где IgG имеет модификацию, устраняющую связывание с рецептором Fc;

- гексамерный IgG;

- 3(VHH-TNC);

где:

- NC представляет собой тяжелую цепь IgG;

- LC представляет собой легкую цепь IgG;

- scFv:IgG представляет собой scFv, либо связанный с молекулой IgG, либо образующий ее часть;

- NC:TNC указывает на то, что тяжелая цепь (NC) содержит или связана с пептидом домена тримеризации тенасцина-с (TNC);

- VHH-TNC указывает на то, что тенасцин связан или соединен с VHH.

23. Связывающая молекула по п. 1, где связывающая молекула представляет собой антитело в формате антитела, выбранного из группы, состоящей из:

- Fab-LC:scFv;
- IgG-HC:scFv, где IgG имеет модификацию, устраняющую связывание с рецептором Fc, предпочтительно N297A;
- IgG-LC:scFv, где IgG имеет модификацию, устраняющую связывание с рецептором Fc, предпочтительно N297A;
- IgG-LC:scFv-HC:scFv;
- LC:scFv-HC:scFv-IgG-HC:scFv;
- LC:scFv-HC:scFv-IgG-LC:scFv;
- LC:scFv-HC:scFv-IgG-LC:scFv-HC:scFv; и
- IgG-HC-TNC-scFv;
- sdAb/VHH;
- 3(VHH-TNC),

где:

- HC представляет собой тяжелую цепь IgG;
 - LC представляет собой легкую цепь IgG;
 - LC:scFv указывает на scFv, связанный с легкой цепью или образующий ее часть;
 - HC:scFv указывает на scFv, связанный с тяжелой цепью или образующий ее часть;
 - HC:TNC указывает на тяжелую цепь (HC), содержащую тенасцин (TNC) или связанную с ним;
 - TNC-scFv указывает на тенасцин, связанный или соединенный с scFv;
 - TNC-VHH указывает на тенасцин, связанный или соединенный с VHH;
 - sdAb указывает на однодоменное антитело;
 - VHH указывает на переменную область верблюжьего антитела;
 - VHH-TNC указывает на тенасцин, связанный или соединенный с VHH,
- где предпочтительно связывающая молекула представляет собой антитело и имеет формат антитела, выбранный из:

- Fab-scFv;
- IgG-HC:scFv;
- LC:scFv-HC:scFv-IgG1; и
- LC:scFv-HC:scFv-IgG1-TNC.

24. Связывающая молекула по п. 1, где:

(а) связывающая молекула содержит по меньшей мере два антигенсвязывающих сайта с разной TNFR2-специфичностью;

(б) все TNFR2-специфические антигенсвязывающие сайты связывающей молекулы обладают разной TNFR2-специфичностью;

(с) связывающая молекула содержит два полипептида, где каждый полипептид содержит три TNFR2-специфических антигенсвязывающих домена VHH, где по меньшей мере два из этих трех антигенсвязывающих доменов VHH обладают разной TNFR2-

специфичностью; или

(d) связывающая молекула содержит два полипептида, где каждый полипептид содержит три TNFR2-специфических антигенсвязывающих домена VHH, где три антигенсвязывающих домена VHH обладают разной TNFR2-специфичностью.

25. Связывающая молекула, которая специфически связывает TNFR2, но не TNFR1, где связывающая молекула представляет собой Fc γ R-независимый агонист TNFR2, имеет валентность для связывания TNFR2, равную по меньшей мере двум, и содержит полипептиды, содержащие мутантный TNF-альфа, связывающий TNFR2, но не TNFR1, и область Fc, или пептидную последовательность тенасцина, или и то, и другое, которые олигомеризуют полипептиды,

где предпочтительно связывающая молекула представляет собой молекулу:

(a) которая не содержит последовательностей антител;

(b) которая содержит полипептиды, содержащие мутантный TNF-альфа, связывающий TNFR2, но не TNFR1, и пептид тенасцина;

(c) где мутанты TNF-альфа представляют собой TNF80; и/или

(d) имеет валентность для TNFR2, равную по меньшей мере трем, предпочтительно имеет валентность для TNFR2, равную шести.

26. Связывающая молекула по любому из предшествующих пунктов для применения в качестве лекарственного средства.

27. Связывающая молекула по любому из пп. 1-25 для применения в способе лечения или профилактики аутоиммунного расстройства или воспалительного расстройства,

где предпочтительно:

(a) расстройство представляет собой реакцию «трансплантат против хозяина» (GvHD), где предпочтительно связывающая молекула предназначена для использования в способе, в котором ее вводят до, одновременно или после трансплантации клетки, ткани или органа; или

(b) расстройство включает дисфункцию или нежелательную пролиферацию лейкоцитов, предпочтительно Т-клеток, более предпочтительно Treg клеток; или

(c) расстройство выбирают из воспалительного заболевания кишечника (такого как язвенный колит, болезнь Крона или глютенная болезнь), атеросклероза, волчанки, рассеянного склероза, диабета 1 типа, миастении, обыкновенной пузырчатки и буллезного пемфигоида.

28. Способ стимуляции пролиферации клеток, включающий приведение в контакт клетки-мишени, экспрессирующей TNFR2, со связывающей молекулой по любому из пп. 1-25.

29. Фармацевтическая композиция, содержащая связывающую молекулу по любому из пп. 1-25 и фармацевтически приемлемый носитель.

30. Способ детектирования TNFR2, включающий приведение в контакт тестируемого образца со связывающей молекулой по любому из пп. 1-25 и

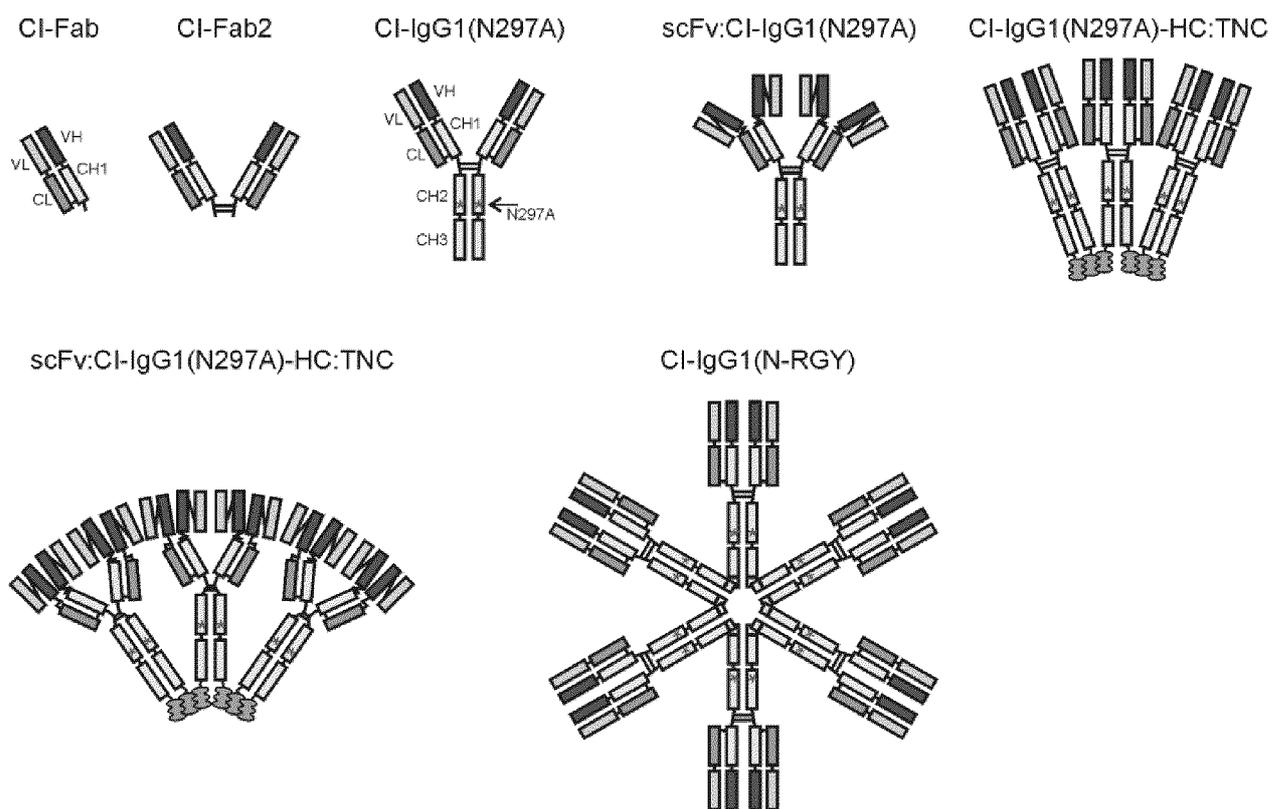
детектирование связывания связывающей молекулы с TNFR2,

где предпочтительно связывающая молекула является меченной и связывание связывающей молекулы с TNFR2 детектируют с помощью метки.

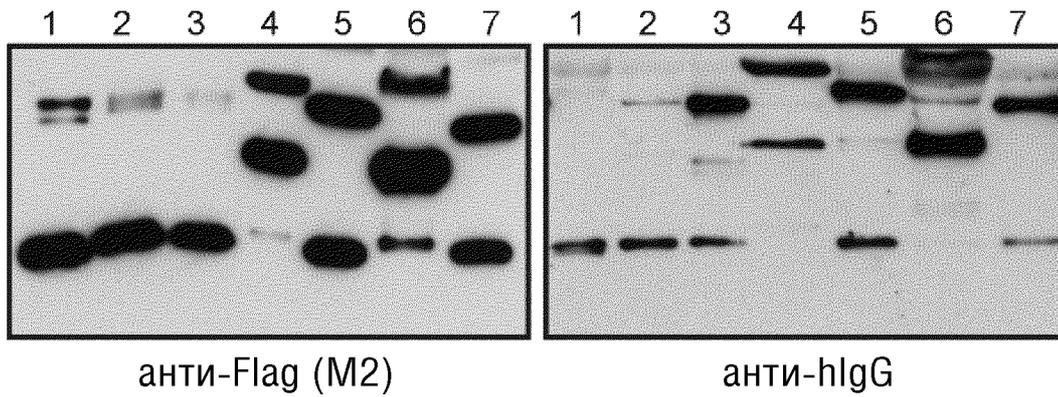
31. Связывающая молекула по любому из пп. 1-25 для применения в способе диагностики, где способ включает введение субъекту связывающей молекулы по любому из пп. 1-23 и детектирование связывания связывающей молекулы с TNFR2,

где предпочтительно связывающая молекула является меченной и связывание связывающей молекулы с TNFR2 детектируют с помощью метки.

ФИГ.1

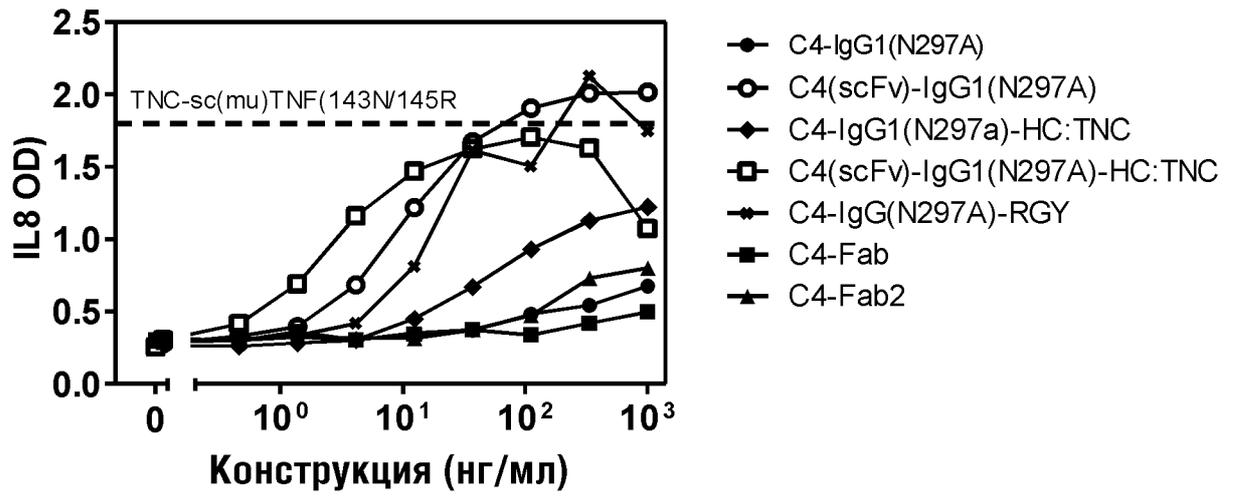


ФИГ.2

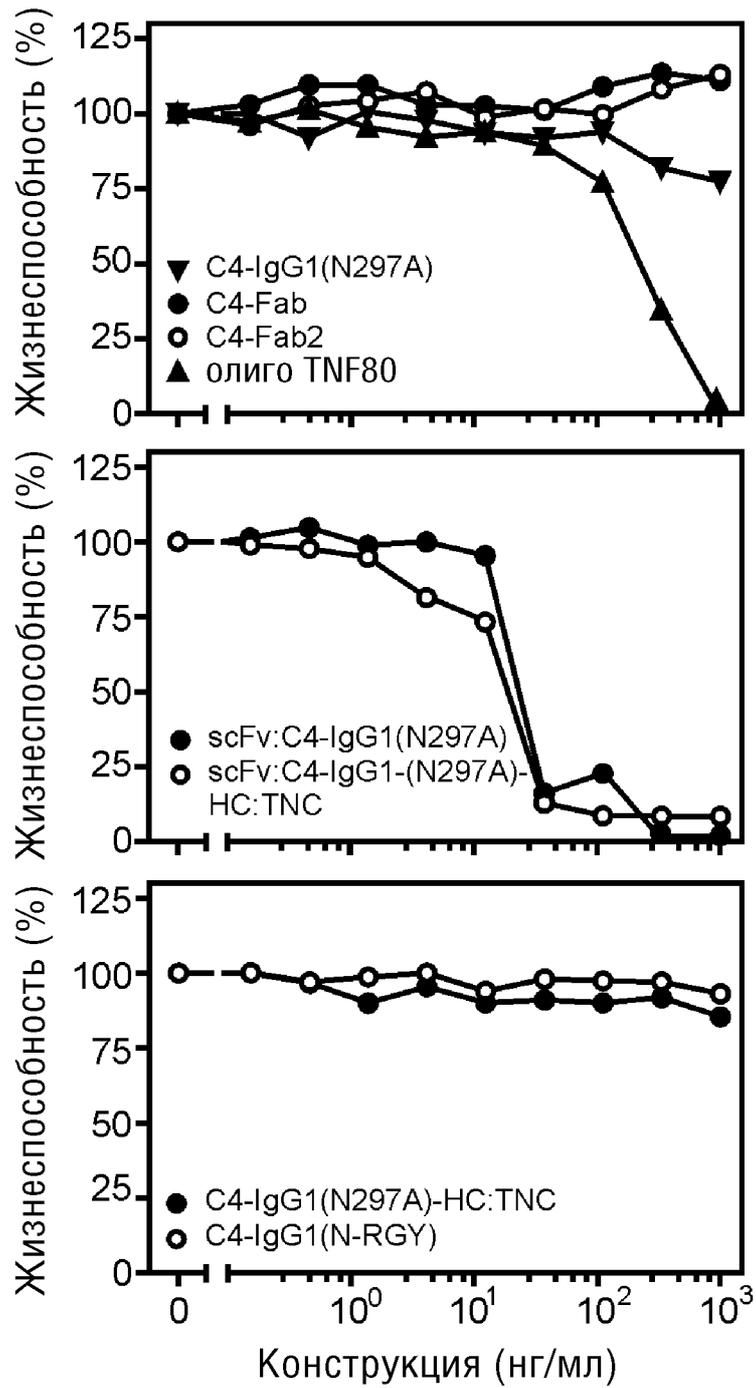


- | | |
|------------------------|-------------------------------|
| 1. C4-Fab | 5. C4-IgG1(N297A)-HC:TNC |
| 2. C4-Fab2 | 6. scFv:C4-IgG1(N297A)-HC:TNC |
| 3. C4-IgG1(N297A) | 7. C4-IgG1(N-RGY) |
| 4. scFv:C4-IgG1(N297A) | |

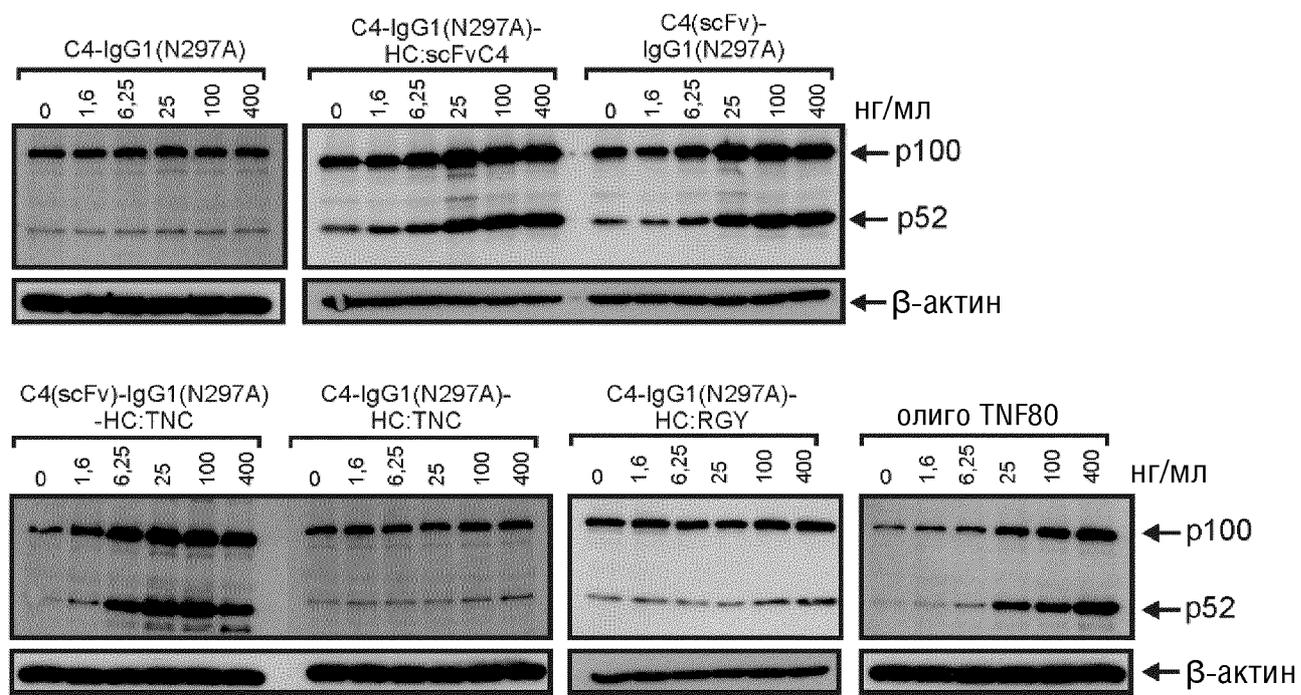
ФИГ.3



ФИГ.4

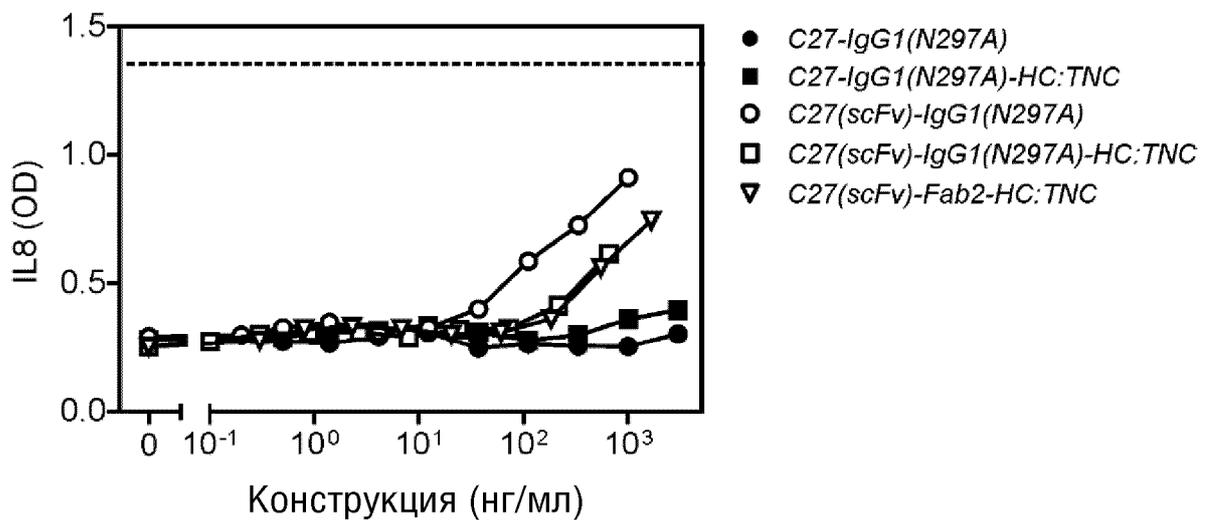
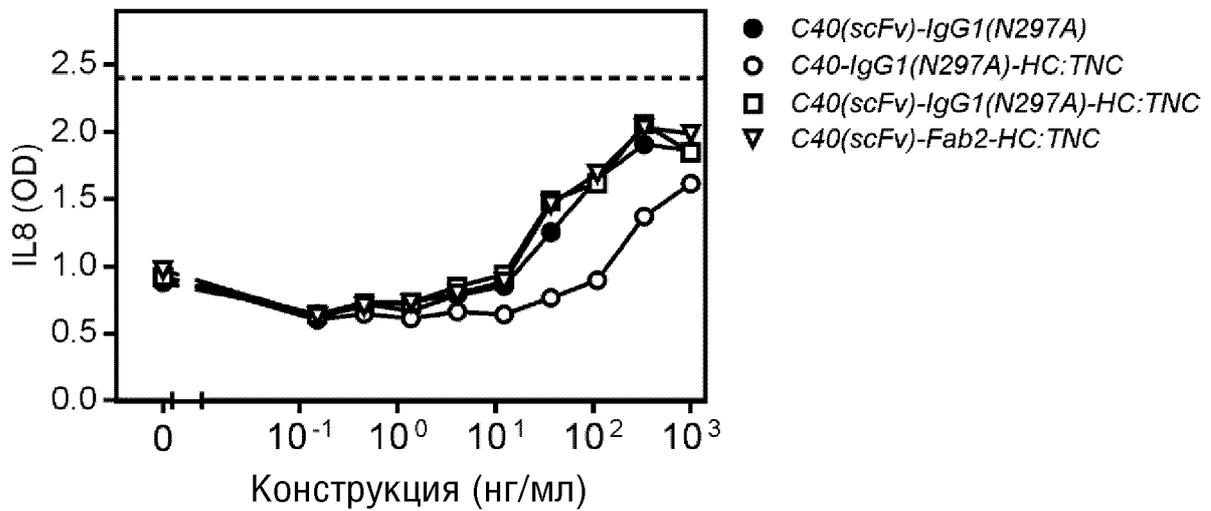
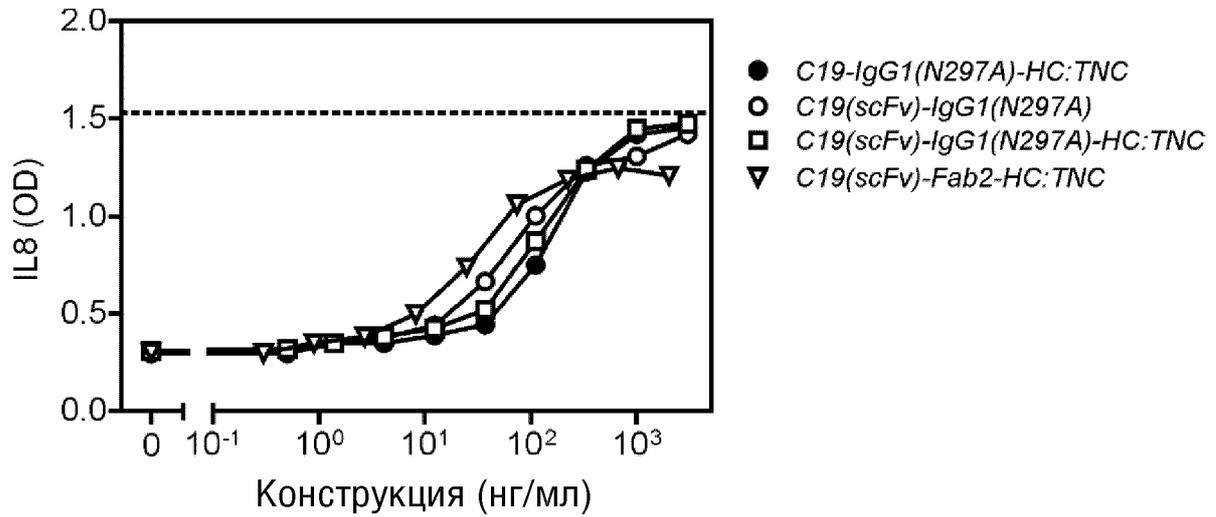


ФИГ.5



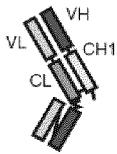
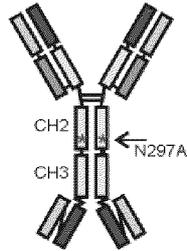
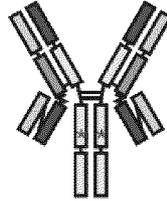
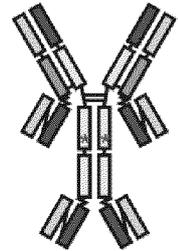
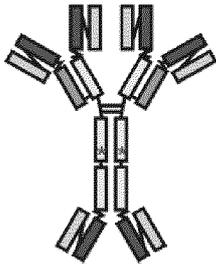
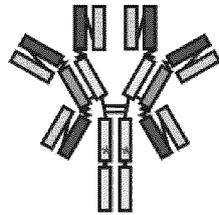
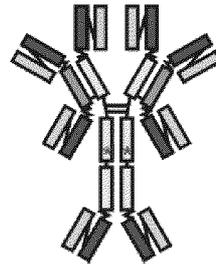
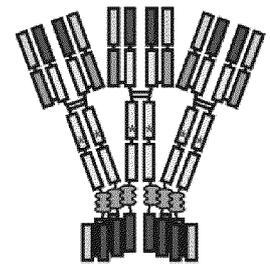
Patent-figure-5-lea-v1

ФИГ.6

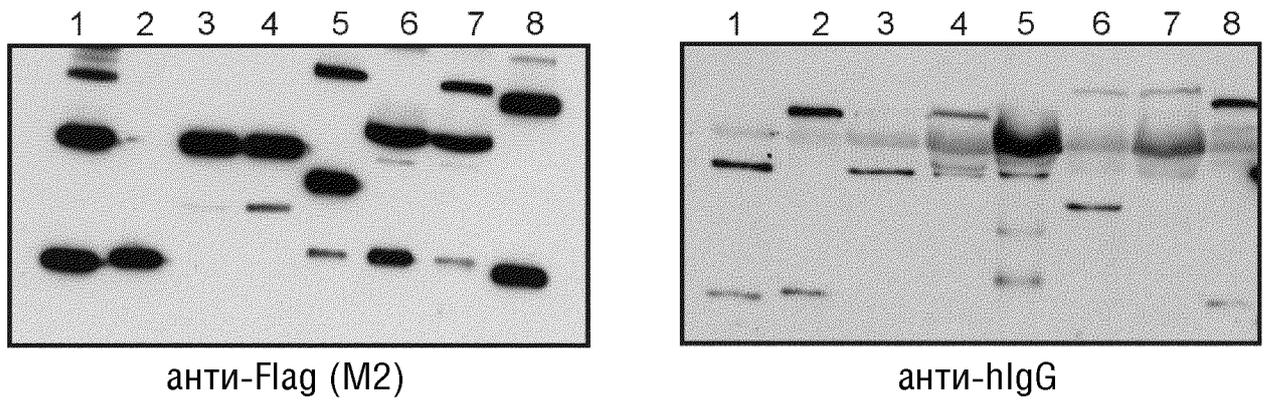


ΦΙΓ.7

CI-Fab-LC:scFvCI

CI-IgG1(N297A)-
HC:scFvCICI-IgG1(N297A)-
LC:scFvCICI-IgG1(N297A)-
LC:scFvCI-HC:scFvCILC:scFvCI-HC:scFvCI-LC:scFvCI-HC:scFvCI-
IgG1(N297A)-
HC:scFvCILC:scFvCI-HC:scFvCI-
IgG1(N297A)-
LC:scFvCILC:scFvCI-HC:scFvCI-
IgG1(N297A)-
LC:scFvCI-HC:scFvCICI-IgG1(N297A)-
HC:TNC-scFvCI

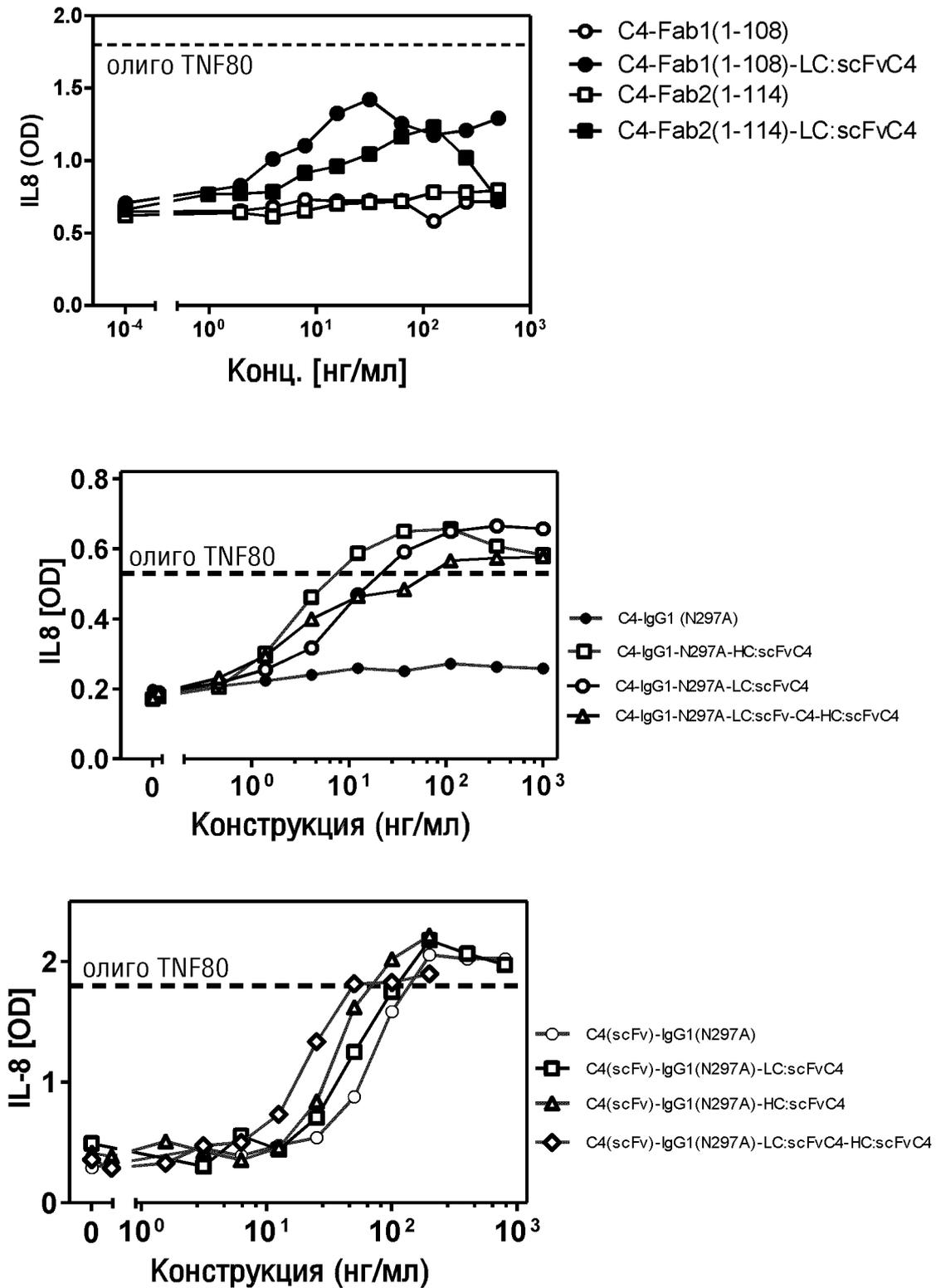
ФИГ.8



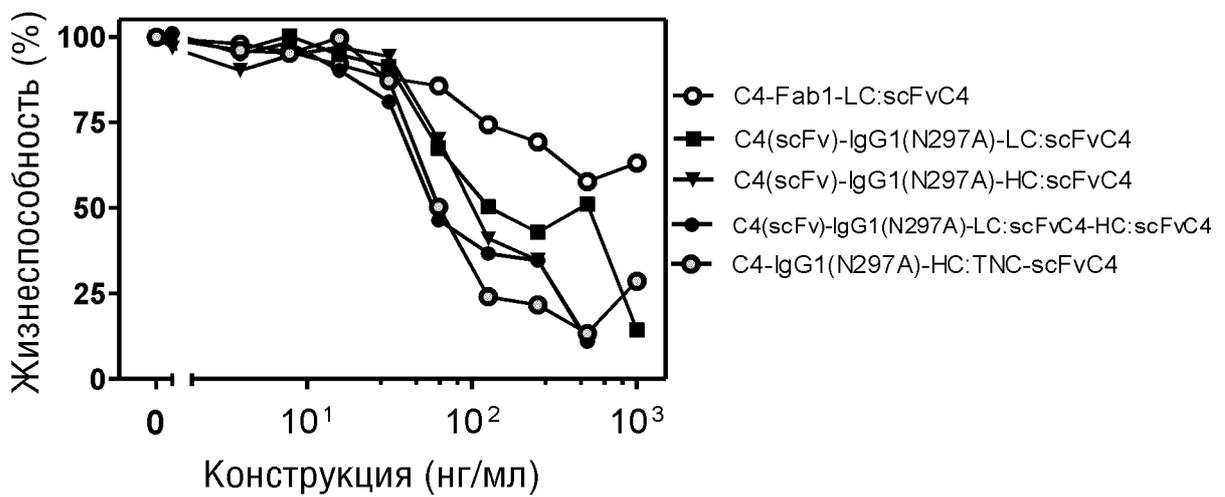
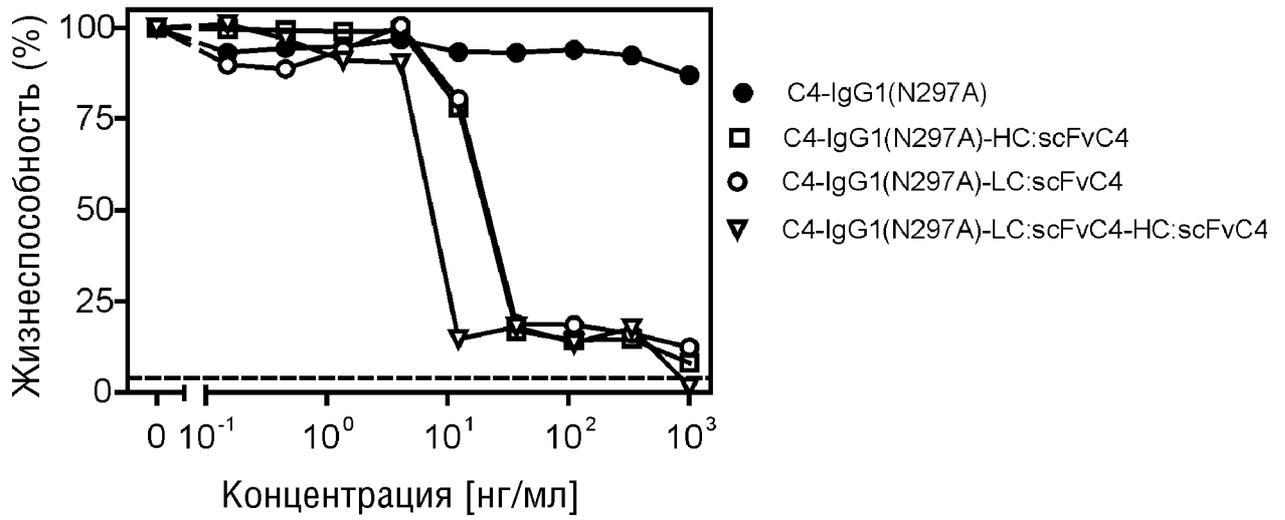
1. C4-Fab1-LC:scFvC4
2. C4-IgG1(N297A)-HC:scFvC4
3. C4-IgG1(N297A)-LC:scFvC4
4. C4-IgG1(N297A)-LC:scFvC4-HC:scFvC4

5. scFv:C4-IgG1(N297A)-HC:scFv:C4
6. scFv:C4-IgG1(N297A)-LC:scFvC4
7. scFv:C4-IgG1(N297A)-LC:scFvC4-HC:scFvC4
8. scFv:C4-IgG1(N297A)-HC:TNC-scFvC4

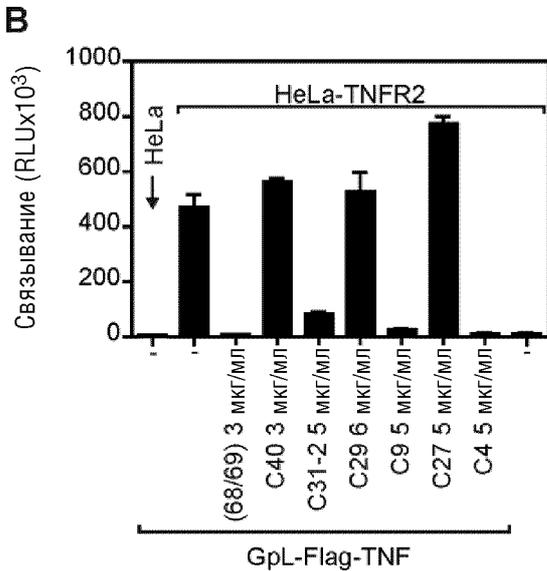
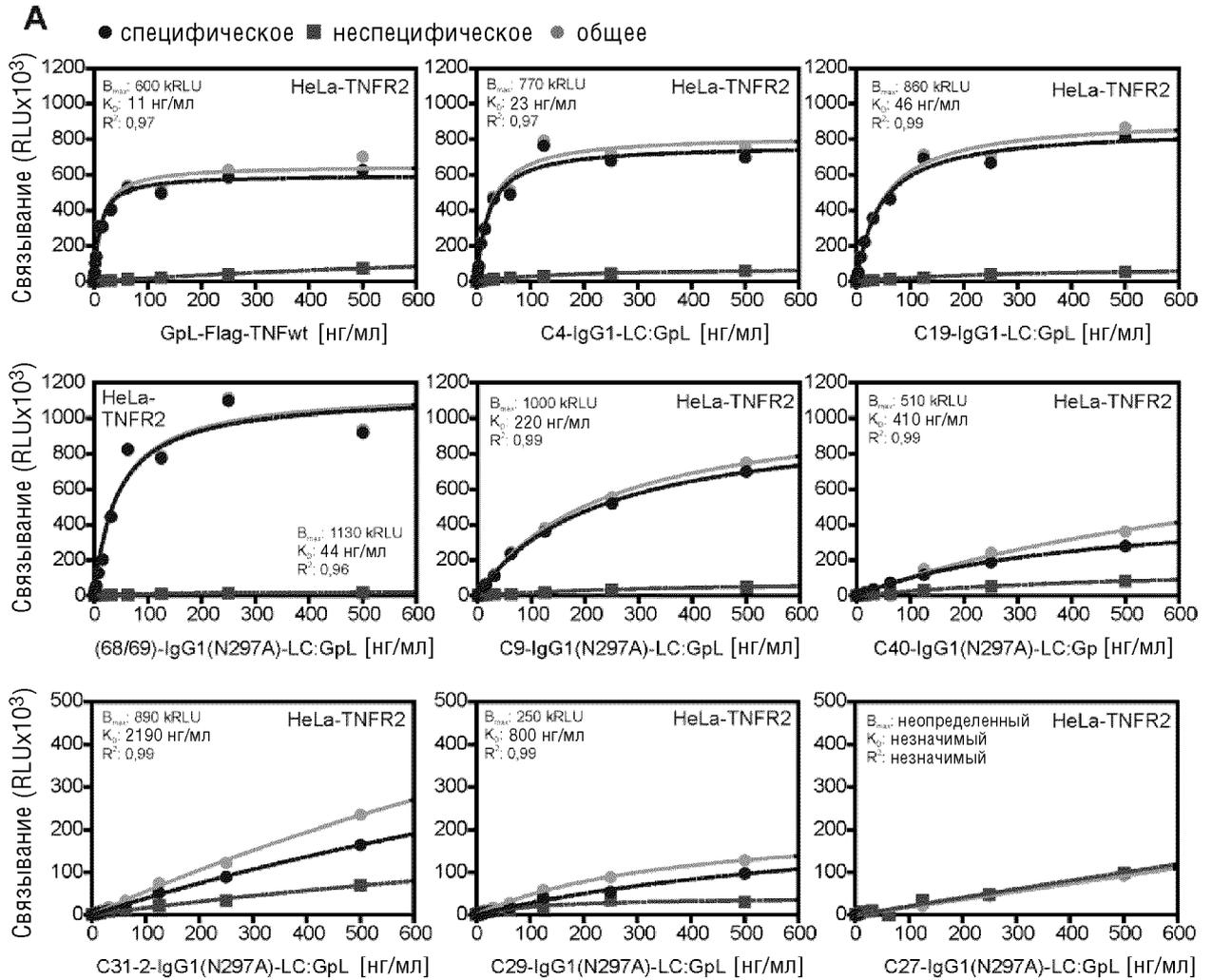
ФИГ.9



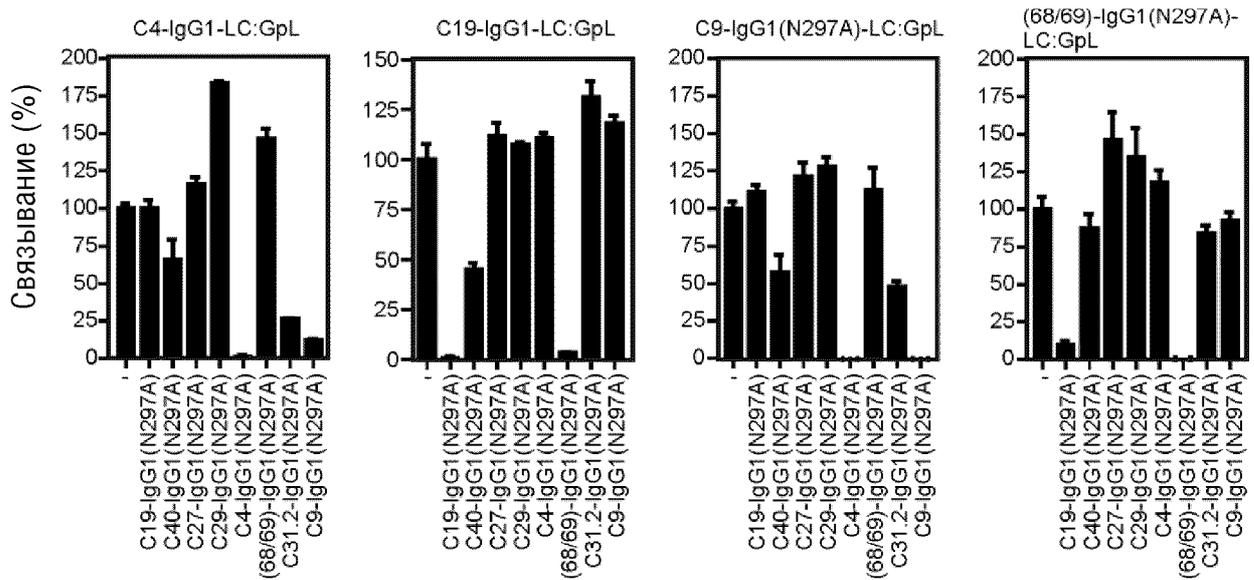
ФИГ.10



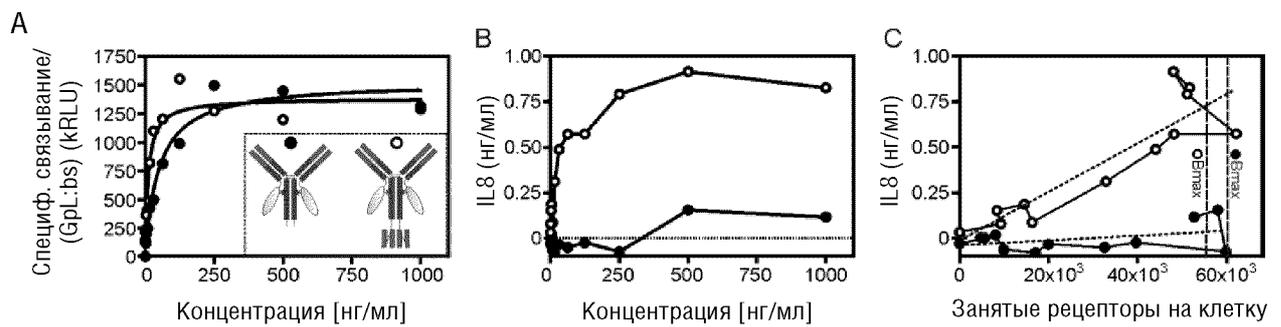
ФИГ.11



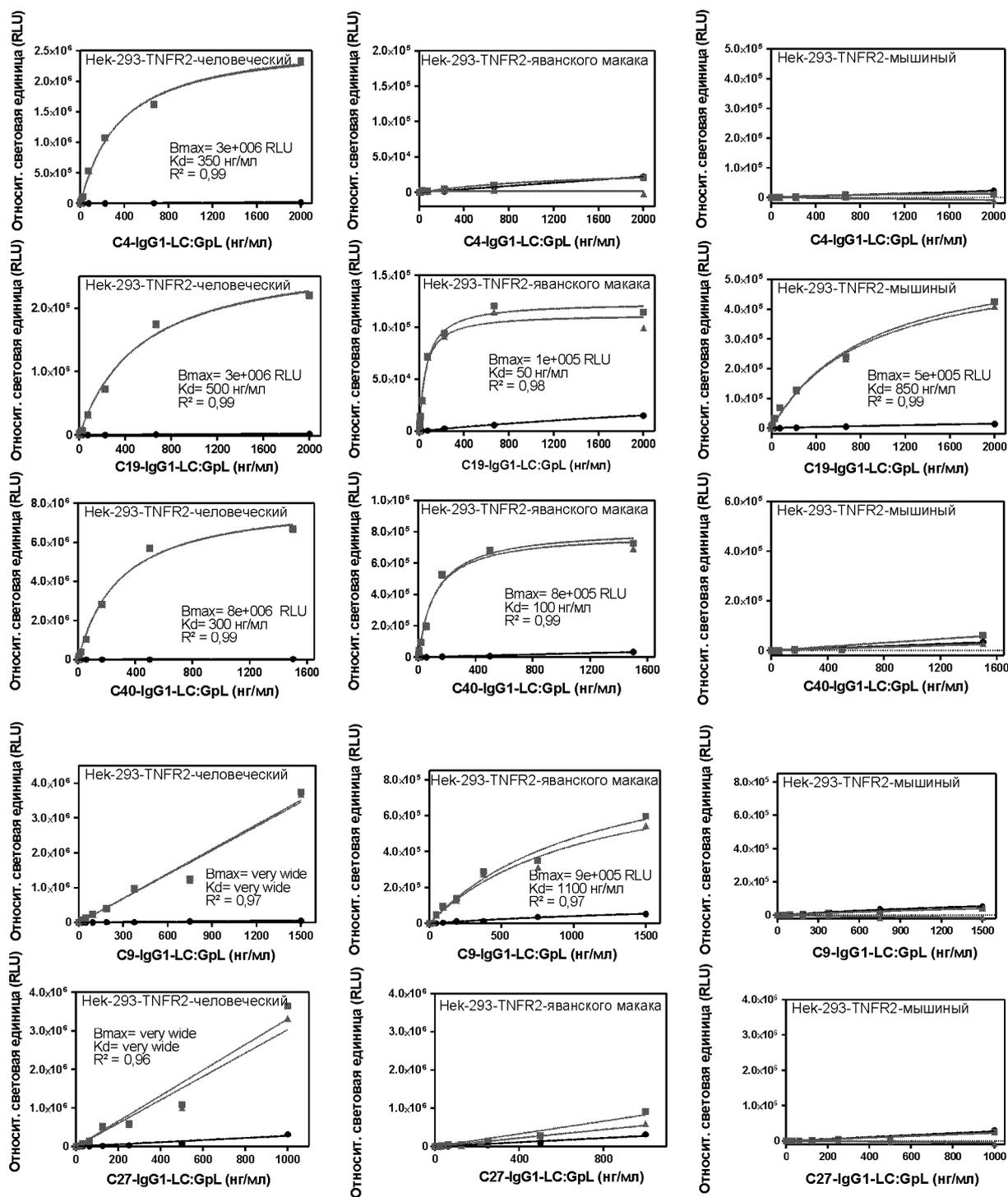
ФИГ.12



ФИГ.13

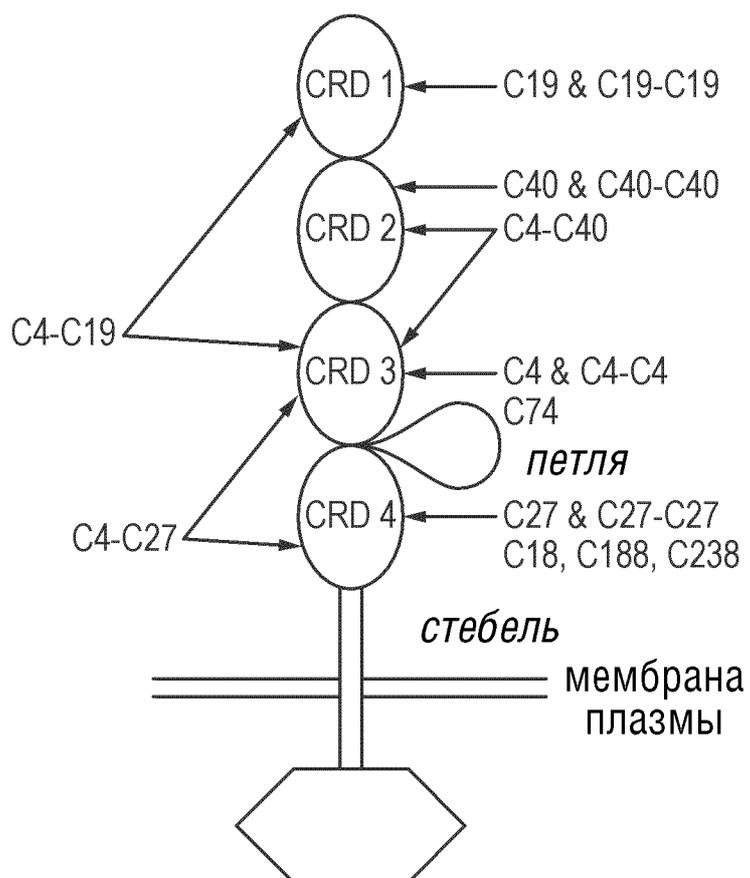


ФИГ.14

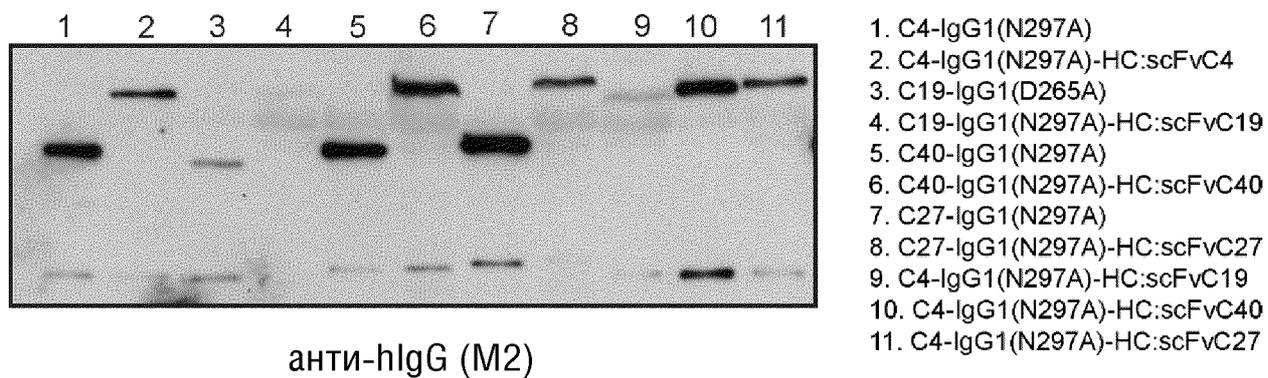
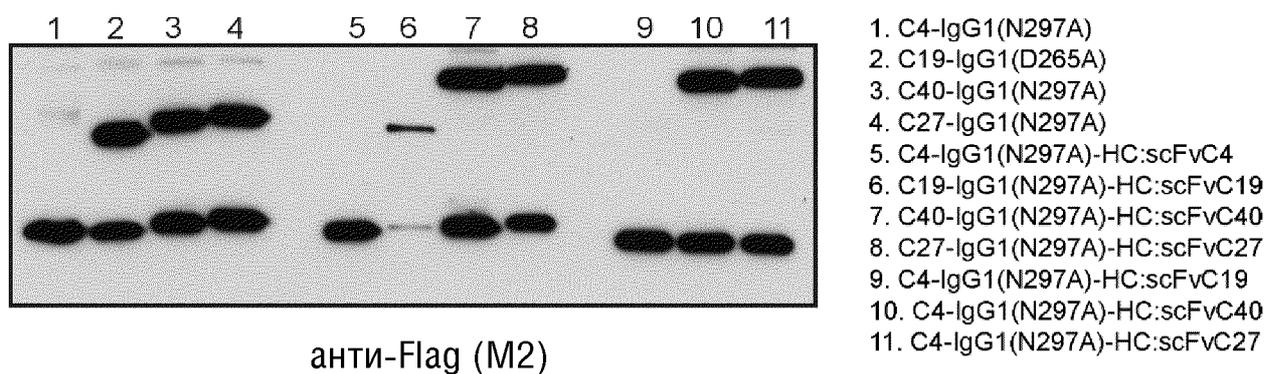


● неспецифическое связывание (HEK293-ve) ■ общее связывание ▲ специфическое связывание

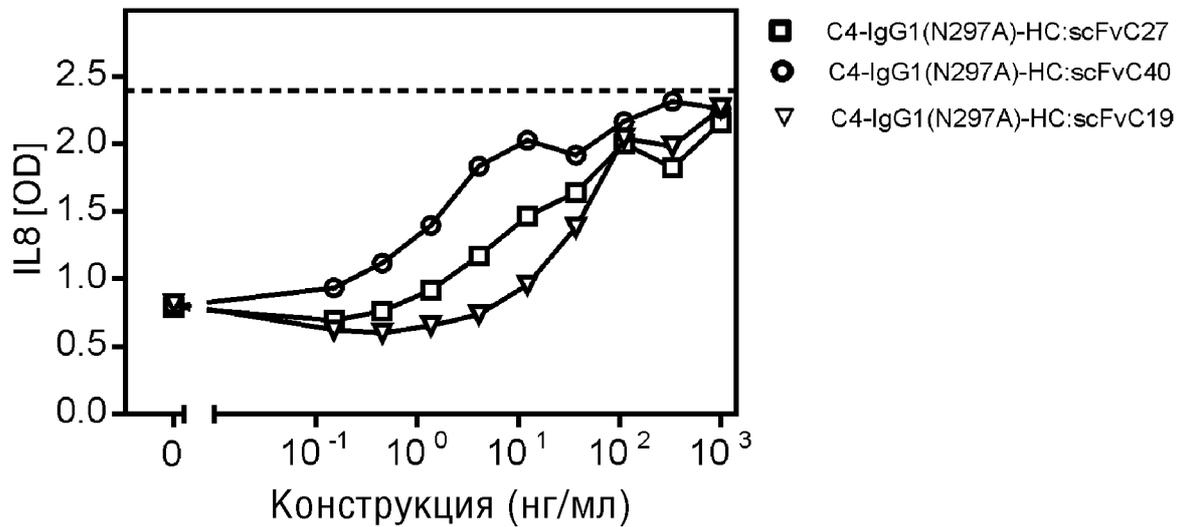
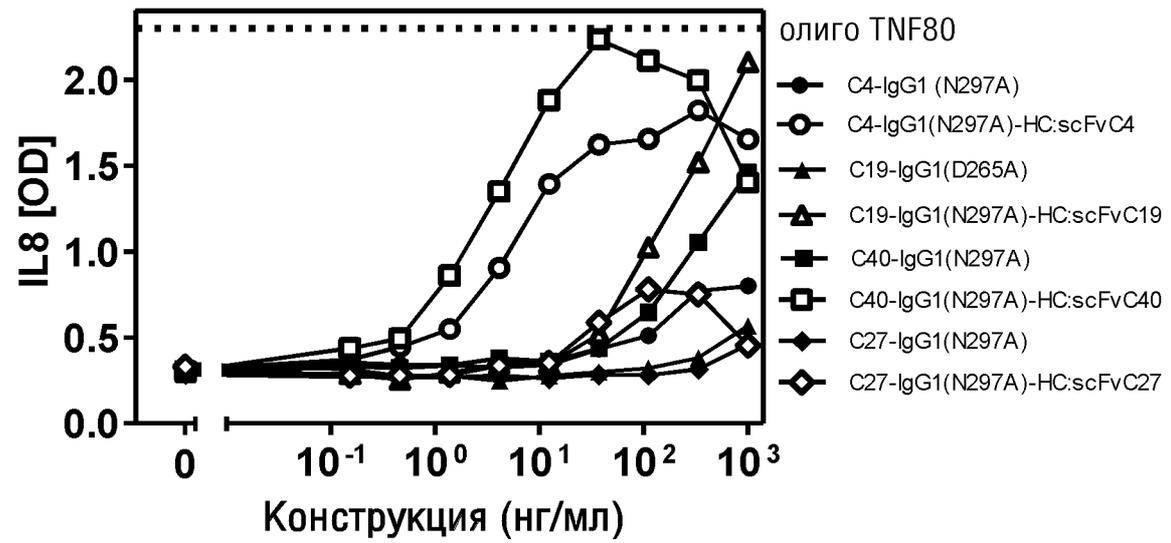
ФИГ.15



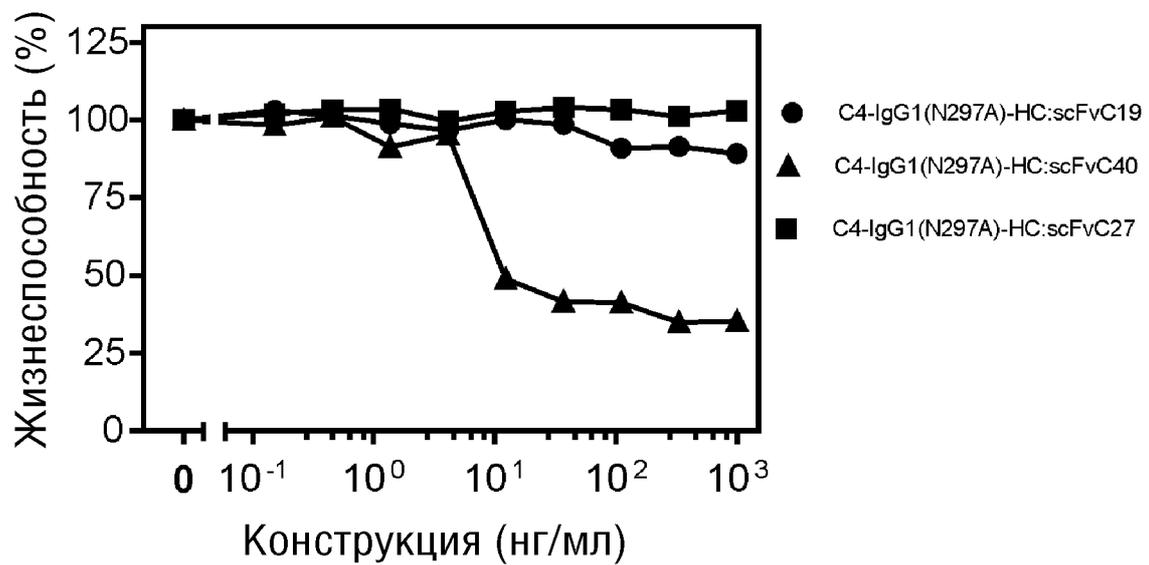
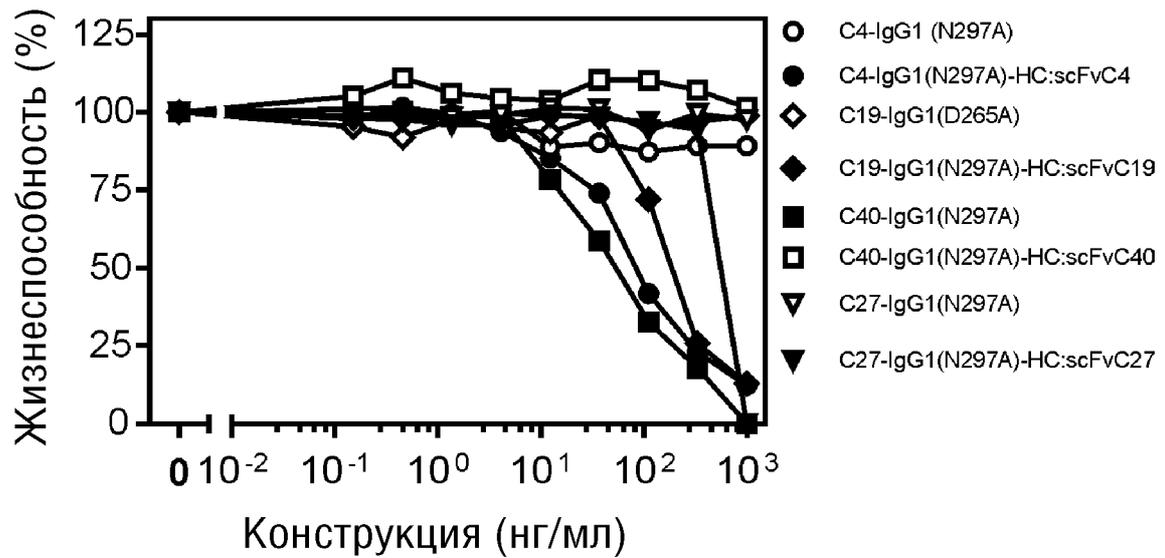
ФИГ.16



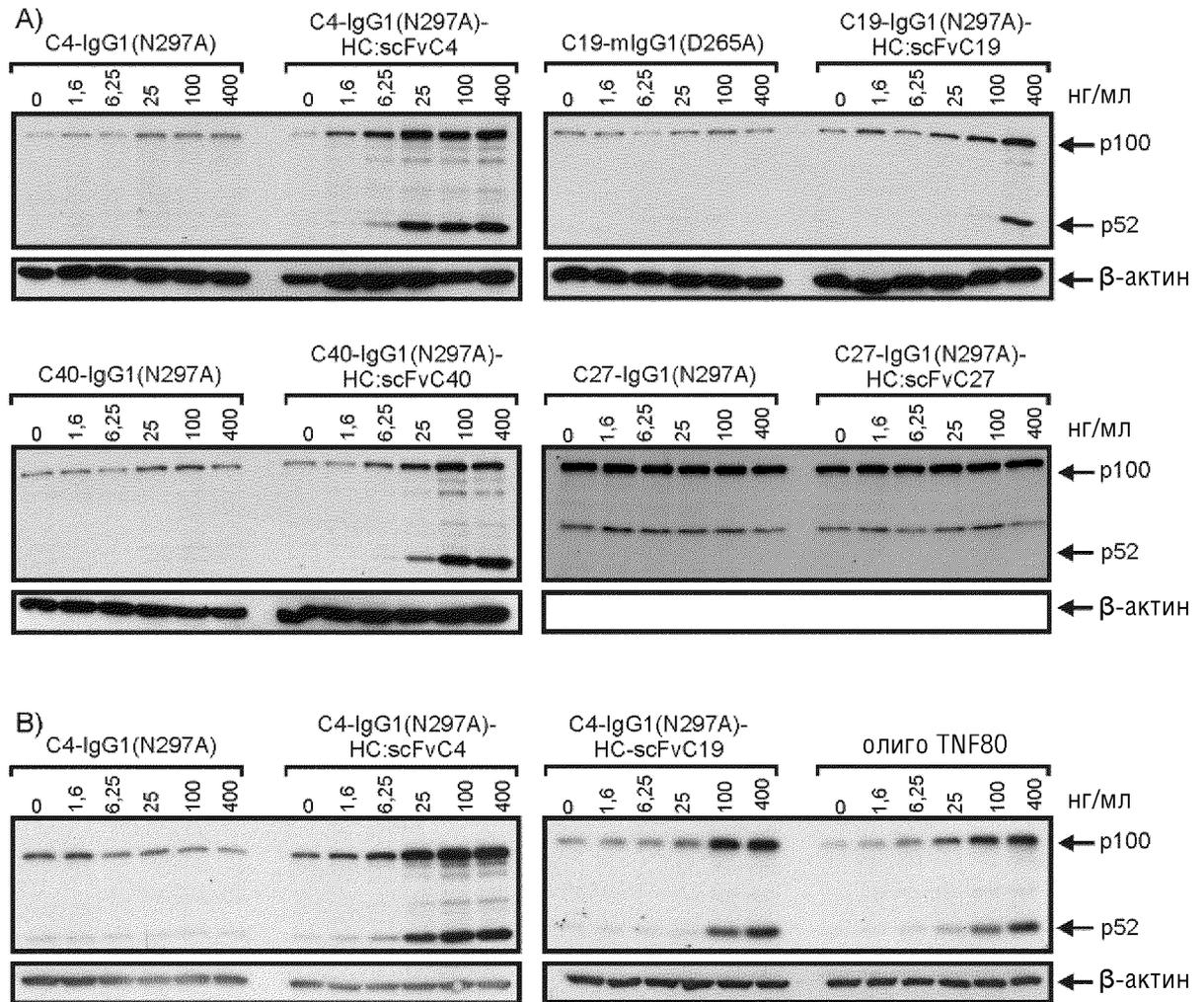
ФИГ.17



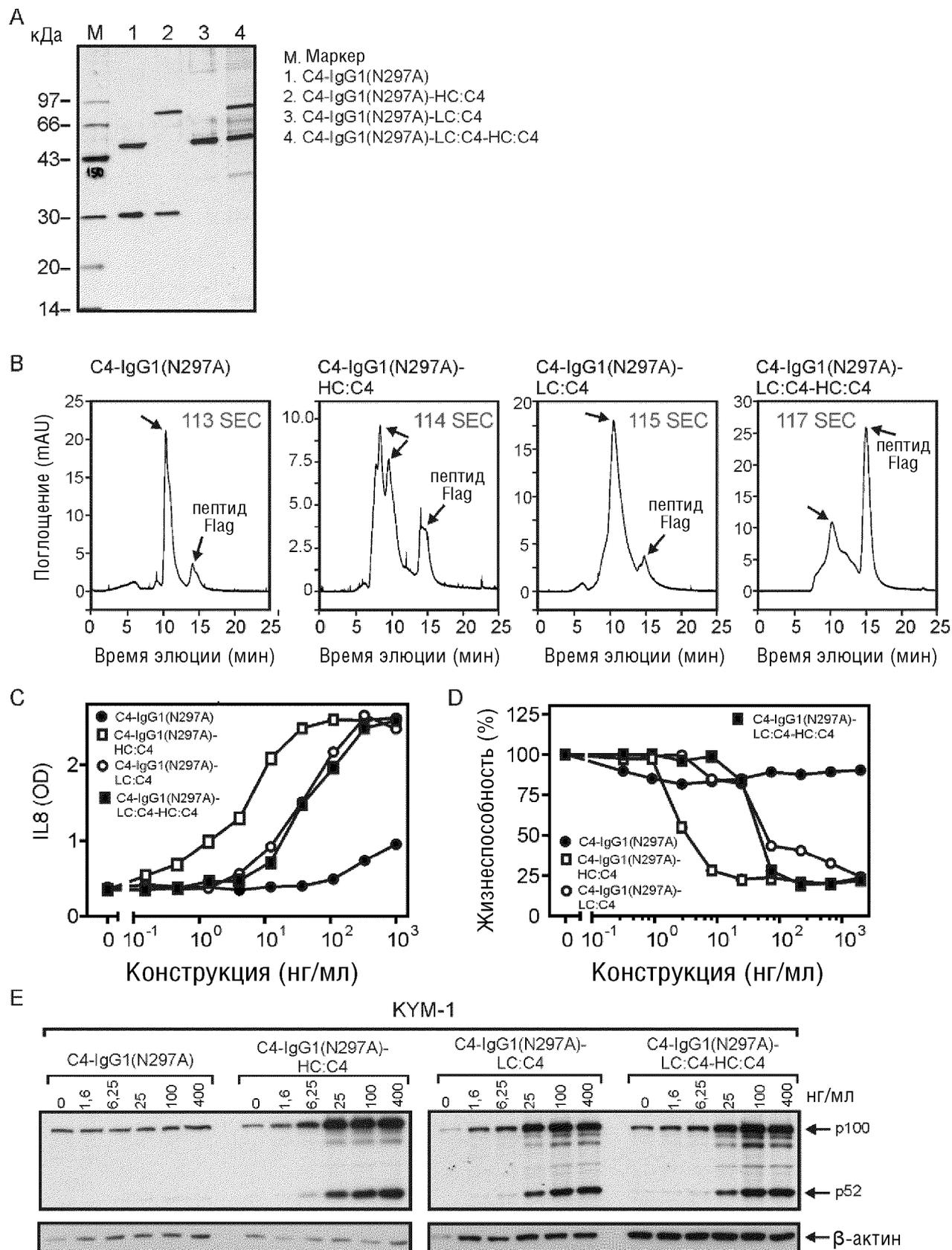
ФИГ.18



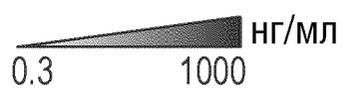
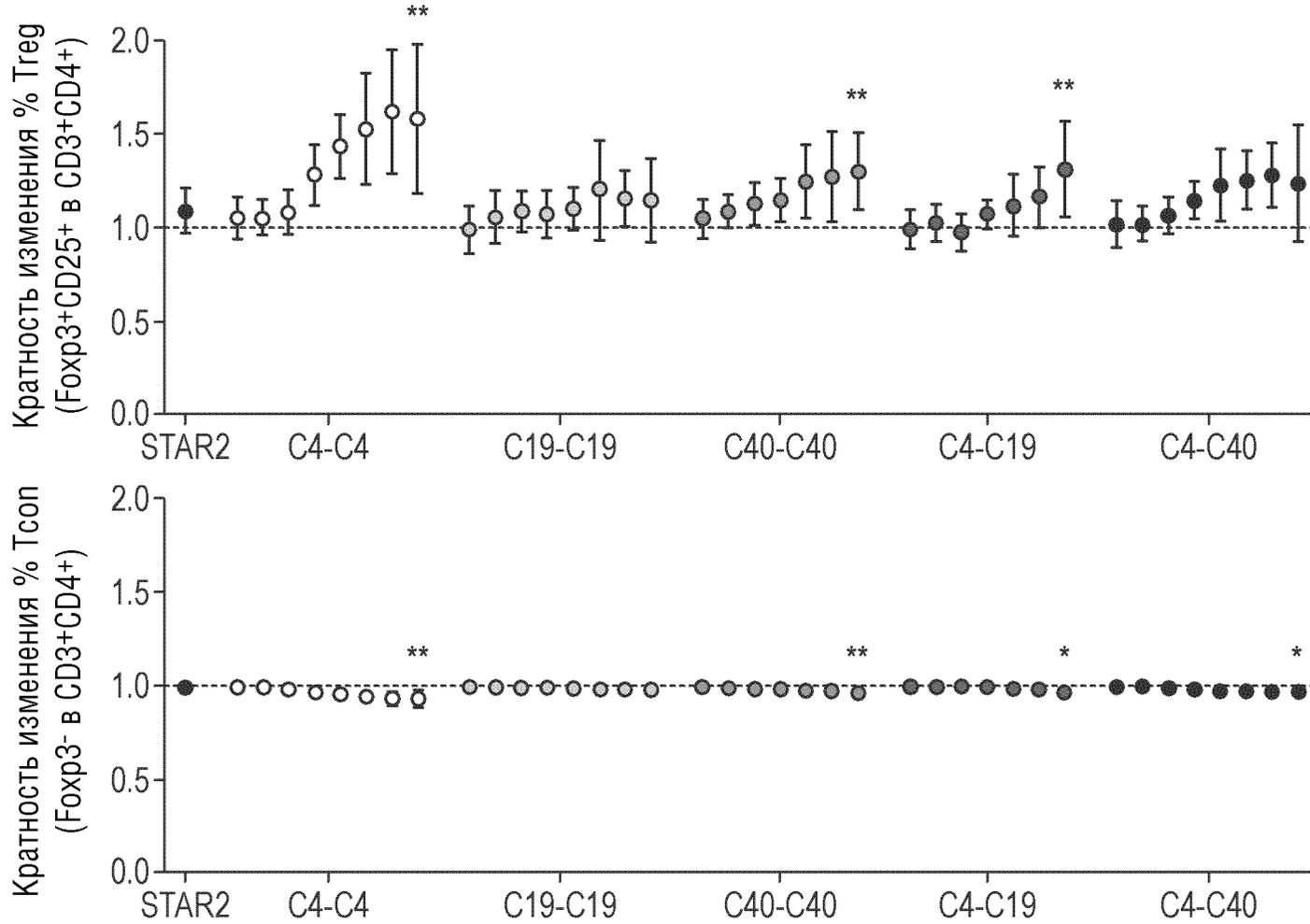
ФИГ.19



ФИГ.20



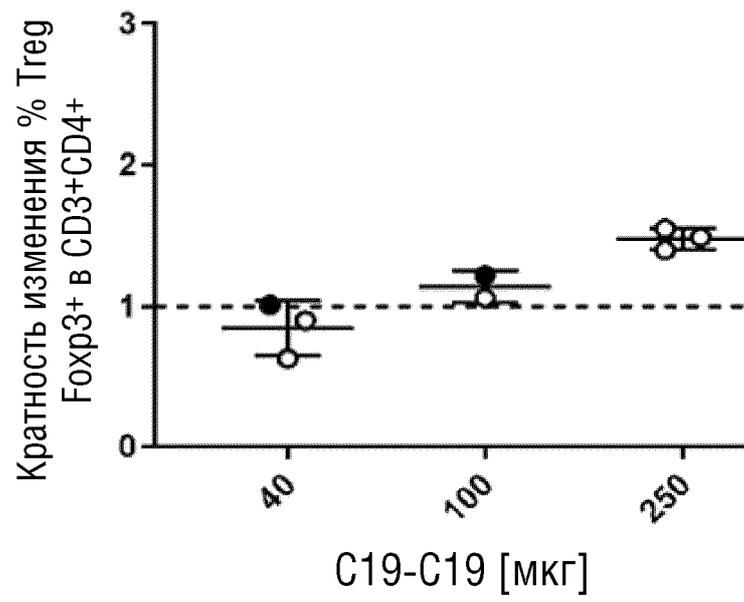
ФИГ.21



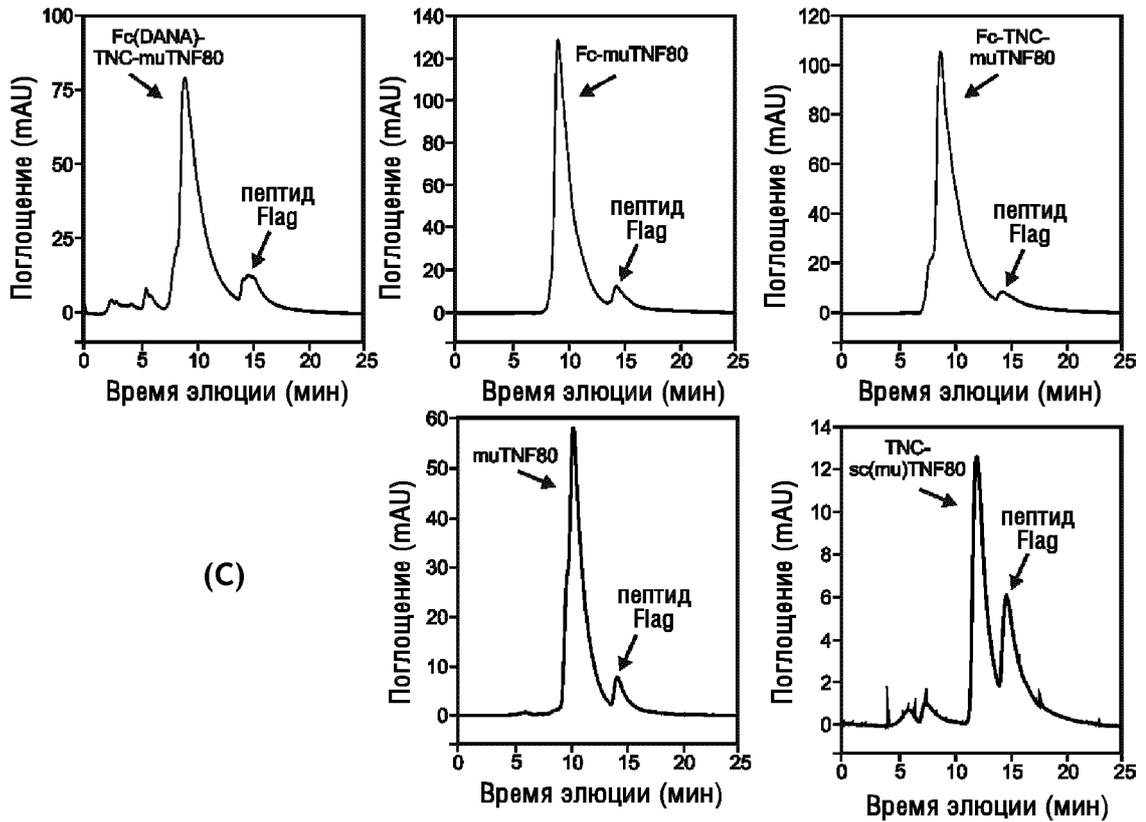
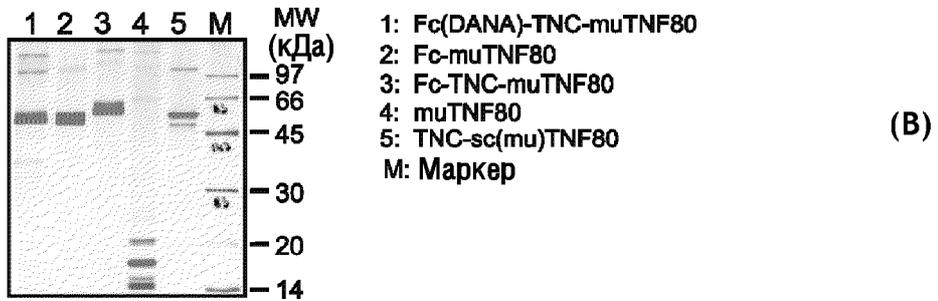
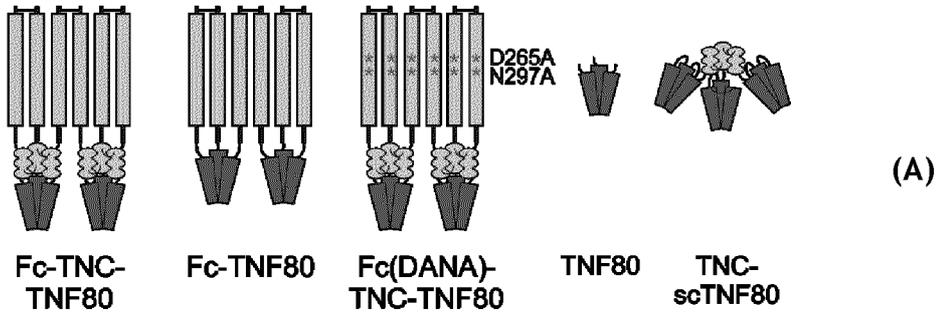
n=8 доноров из двух независимых экспериментов, в каждом n=4

нормализовано к необработанному контролю: среднее значение ± SD
 двустороннее парное сравнение Стьюдента:
 самая высокая концентрация не обработана
 *p<0.05: **p<0.01

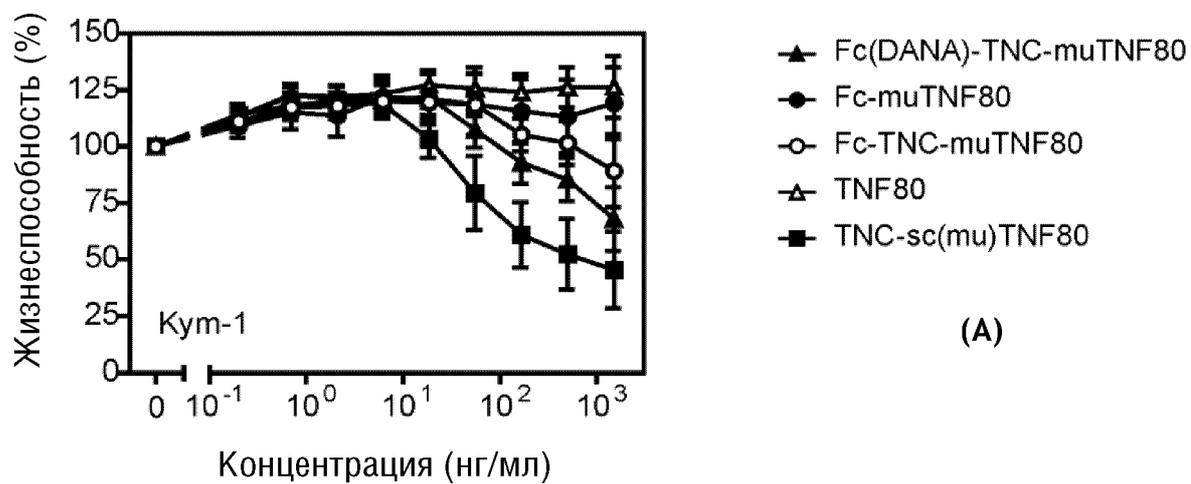
ФИГ.23



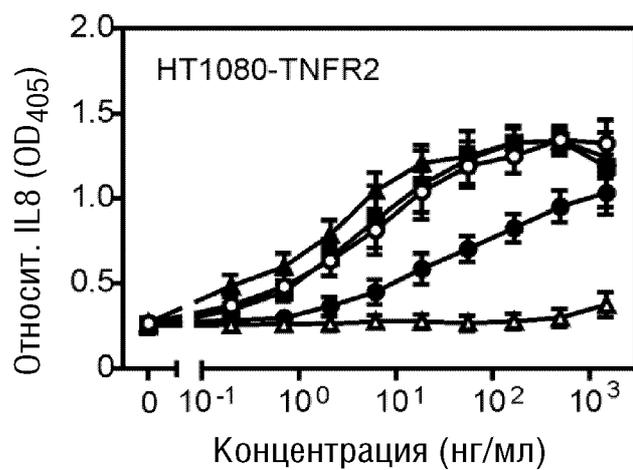
ФИГ.24



ФИГ.25

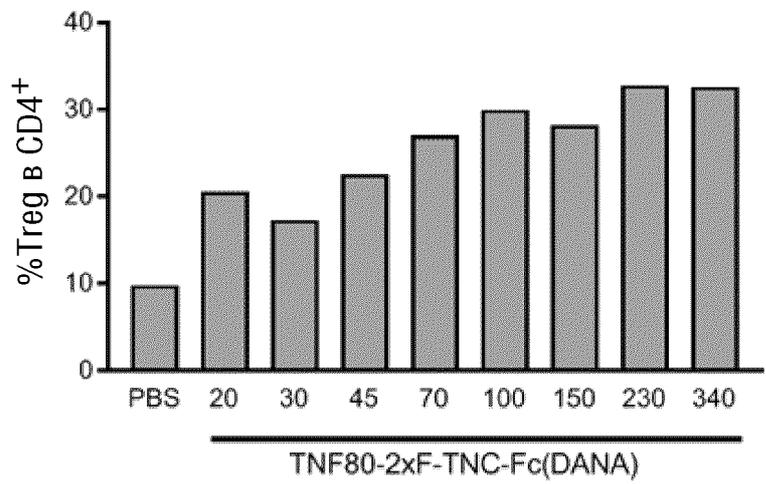
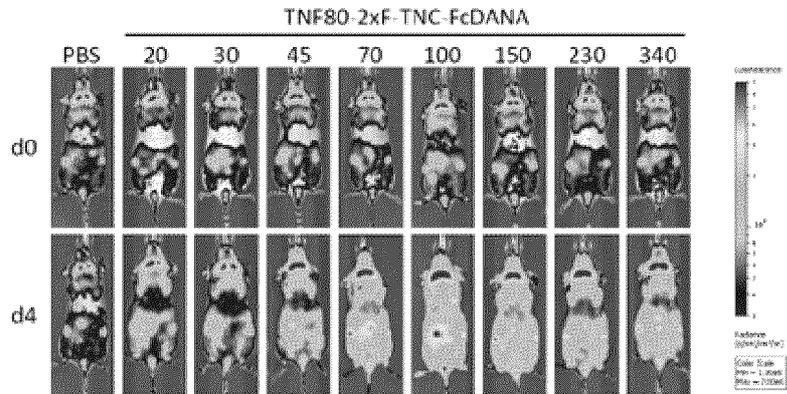
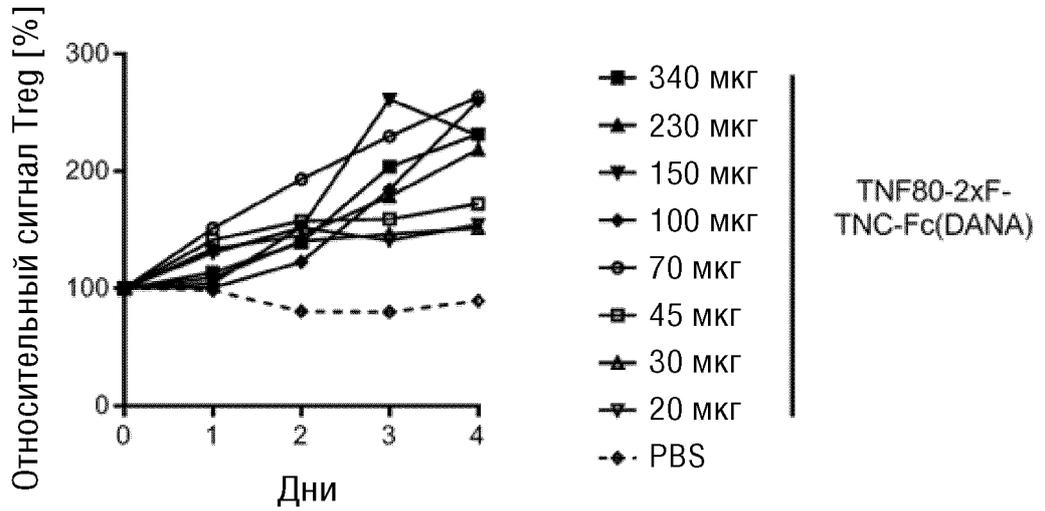


(A)

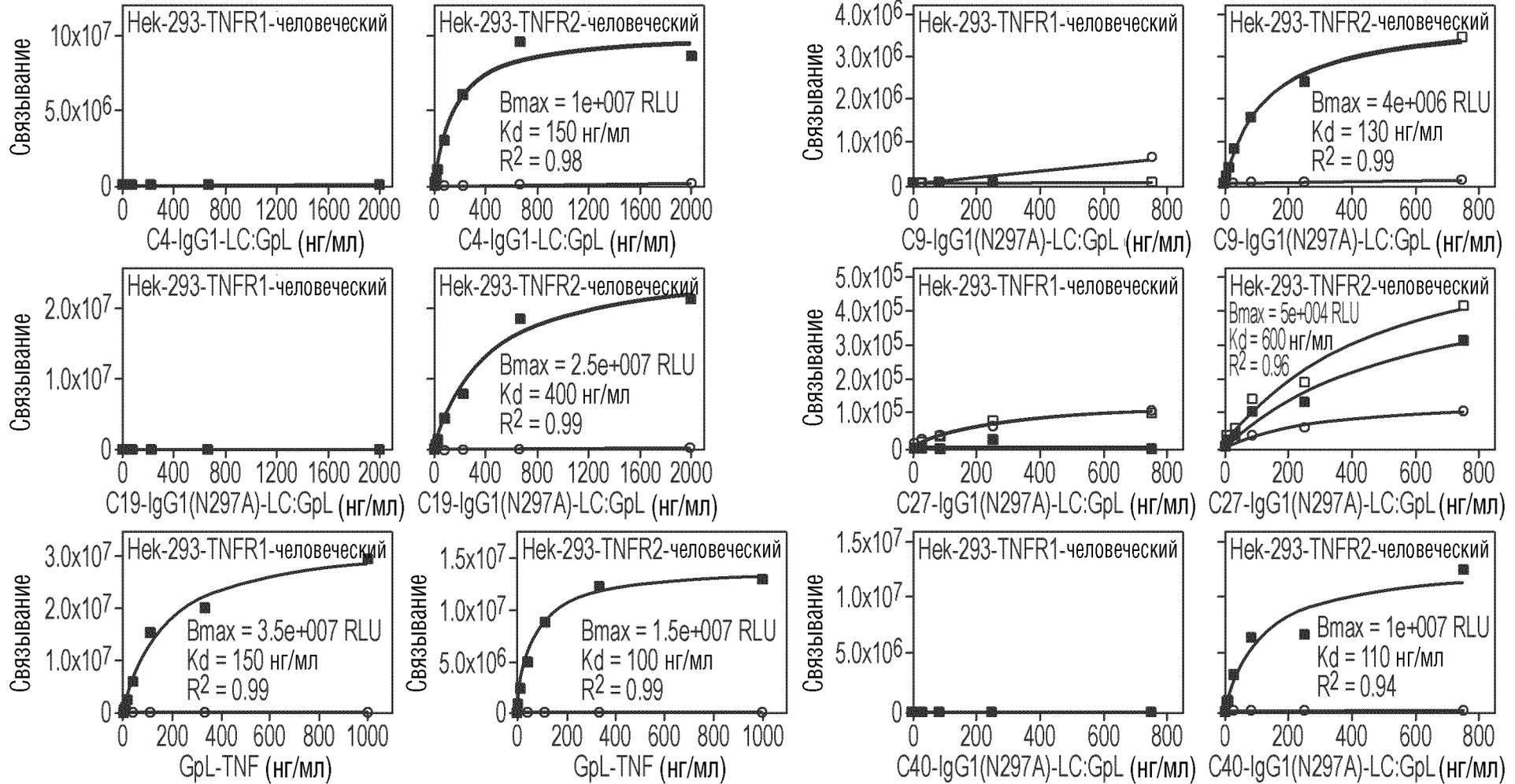


(B)

ФИГ.26

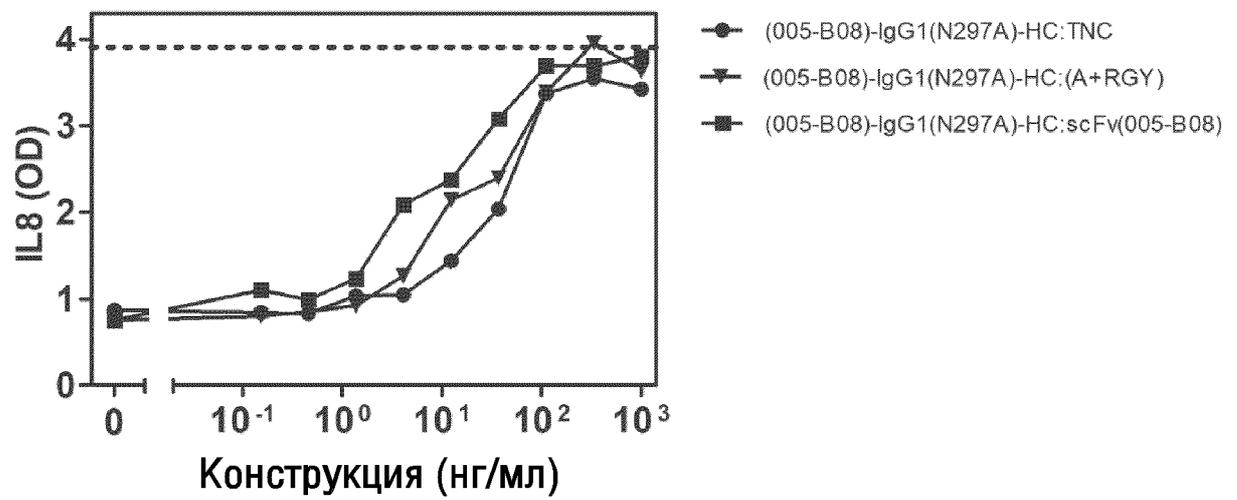


ФИГ.27



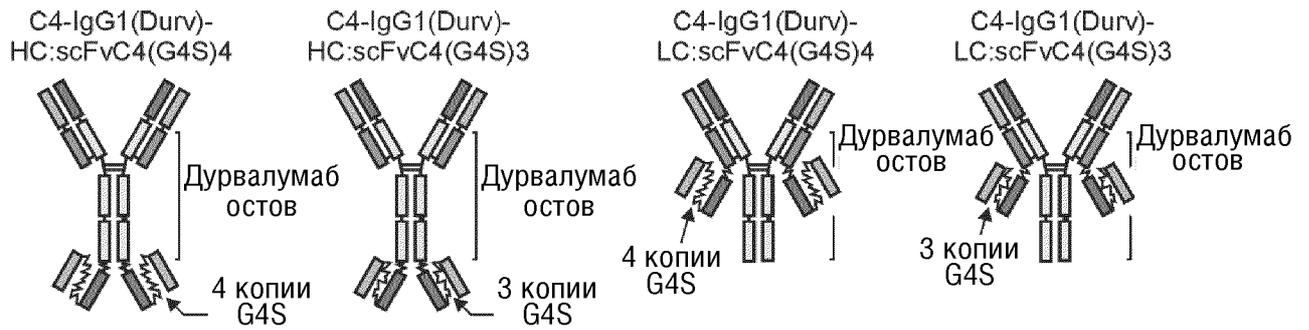
○ неспецифическое связывание (HeK293-ve) □ общее связывание (HeK293-TNFR2) ■ специфическое связывание

ФИГ.28

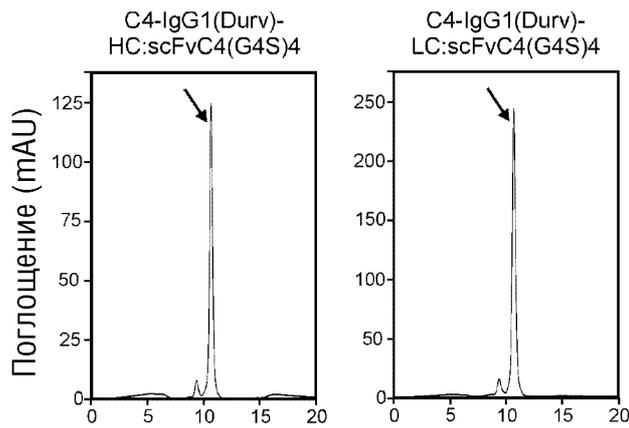


ФИГ.29

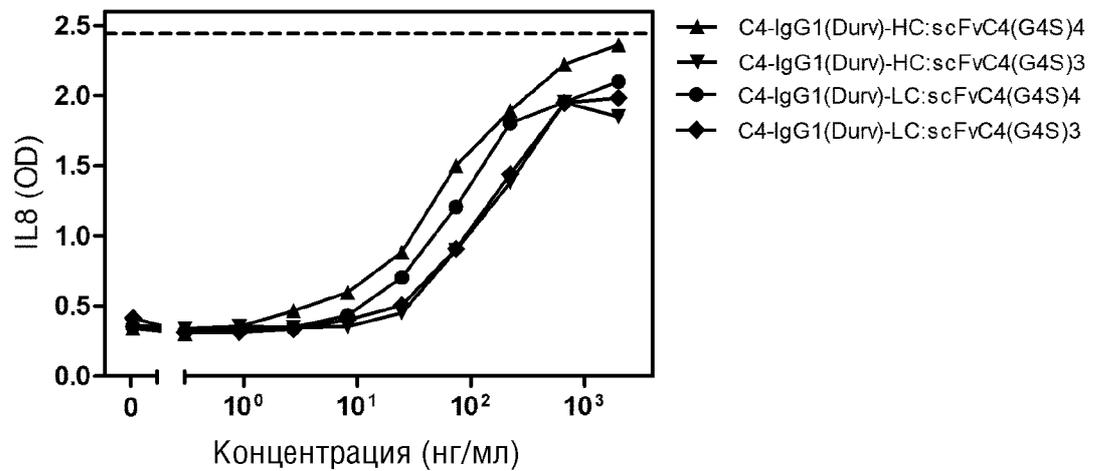
(A)



(B)

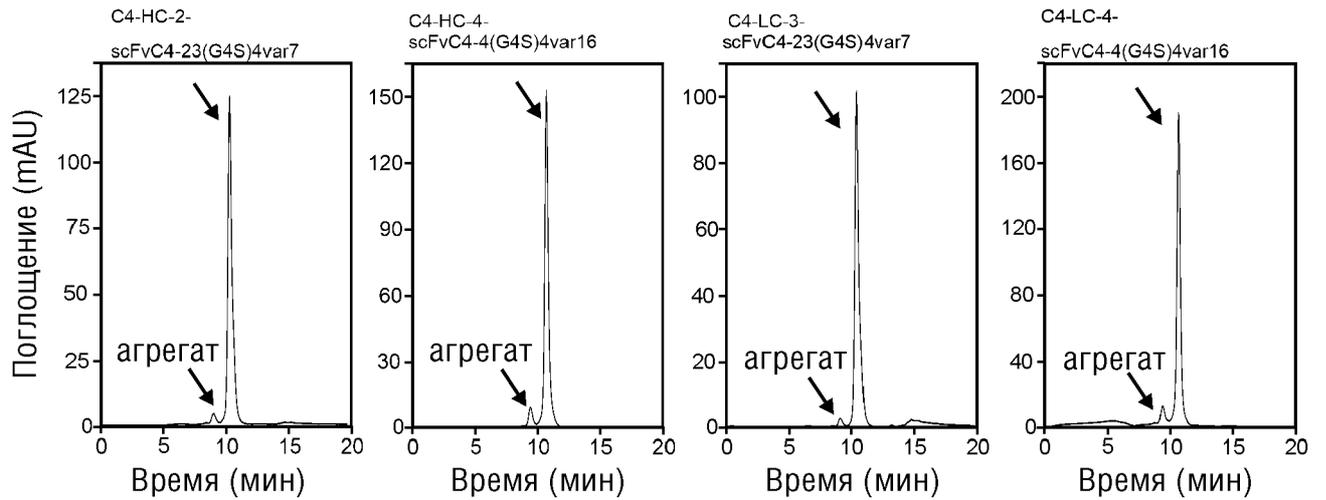


(C)

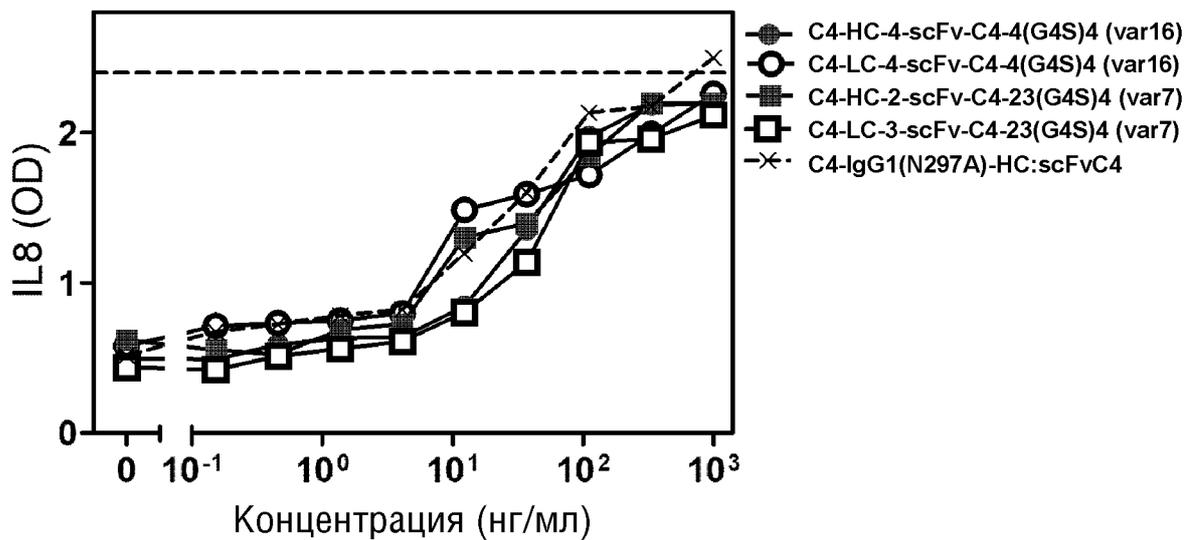


ФИГ.30

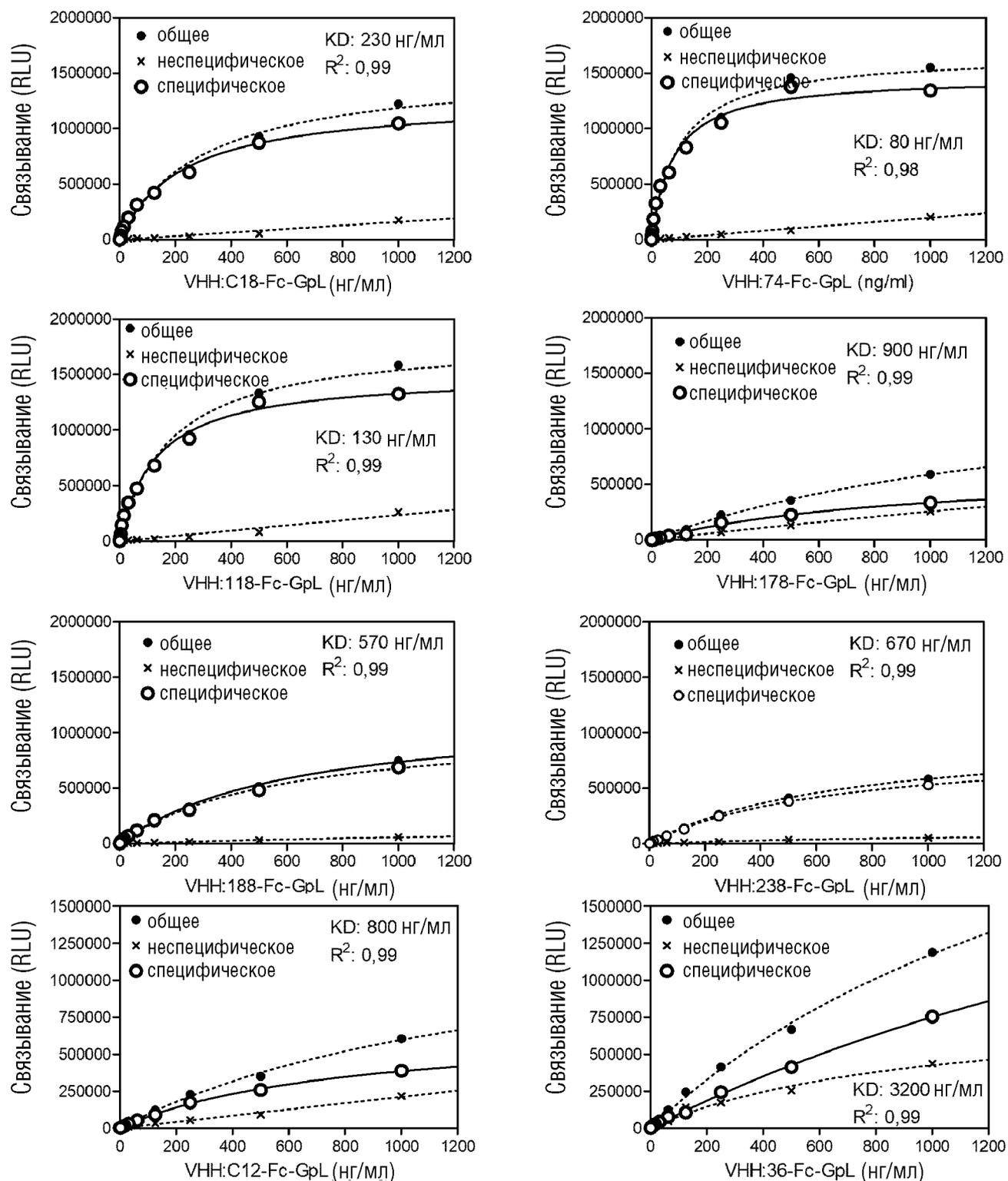
(A)



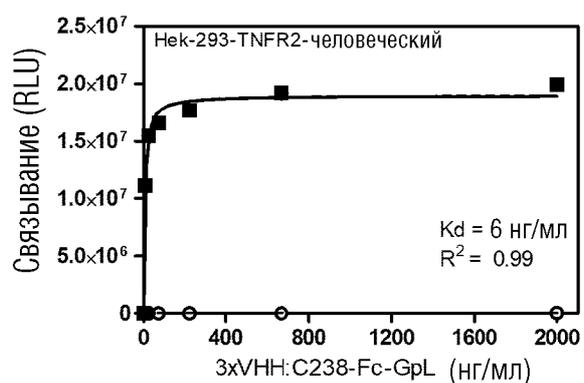
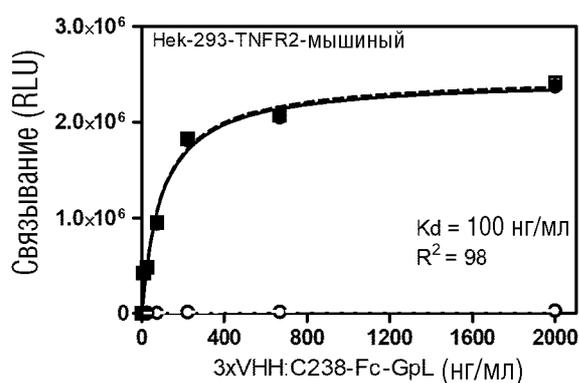
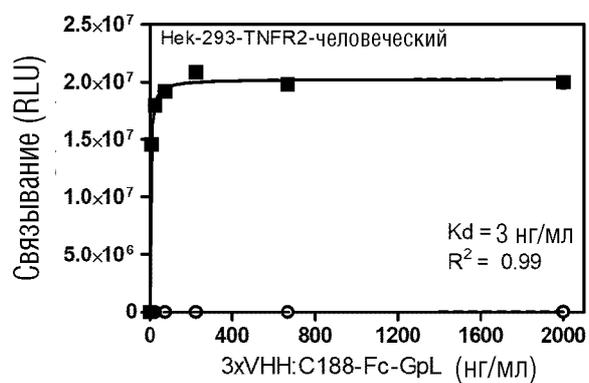
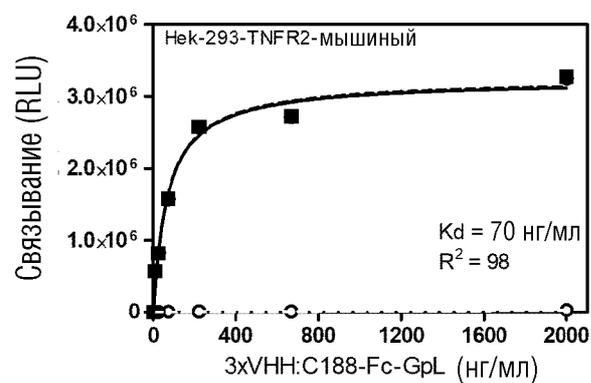
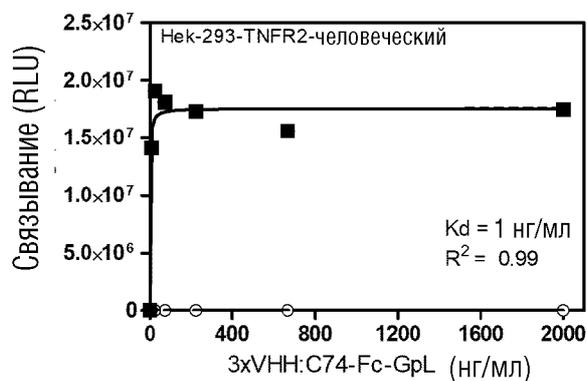
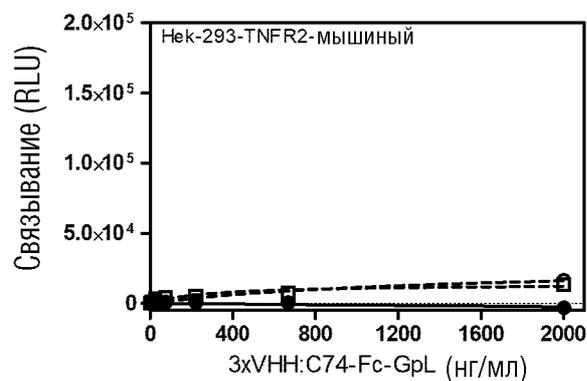
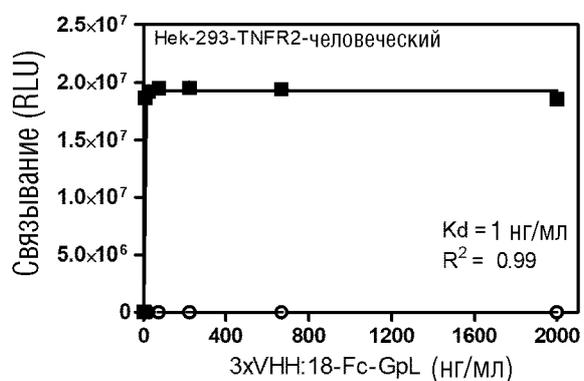
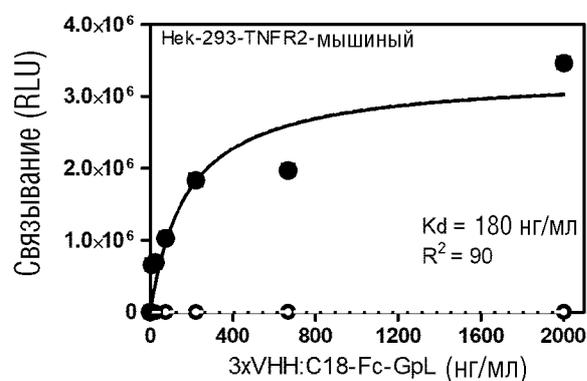
(B)



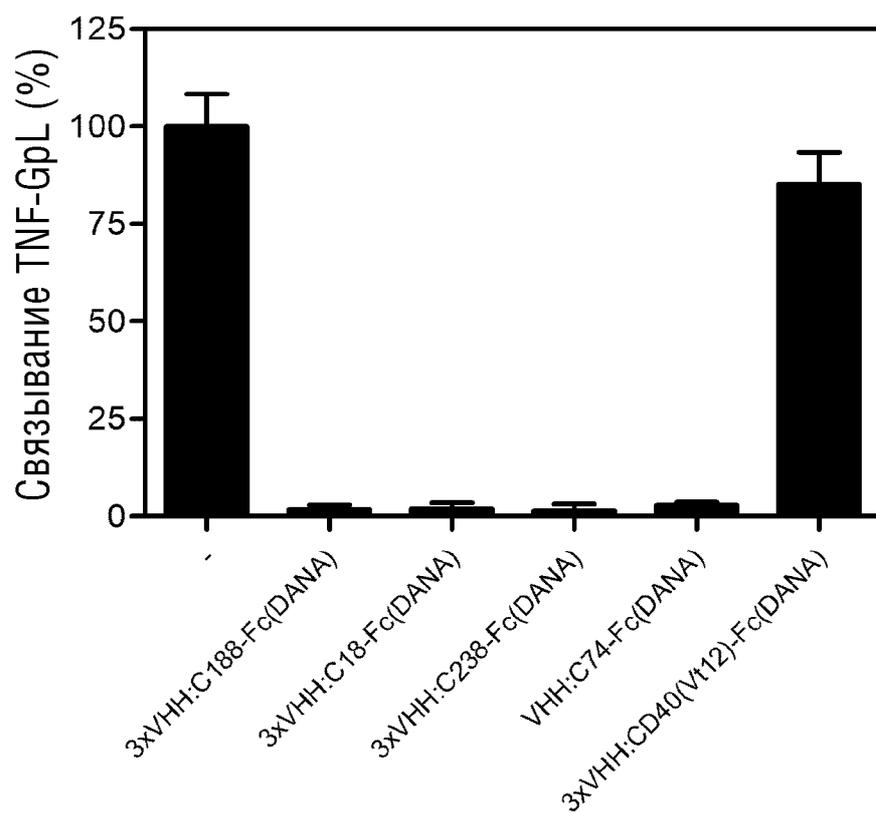
ФИГ.31



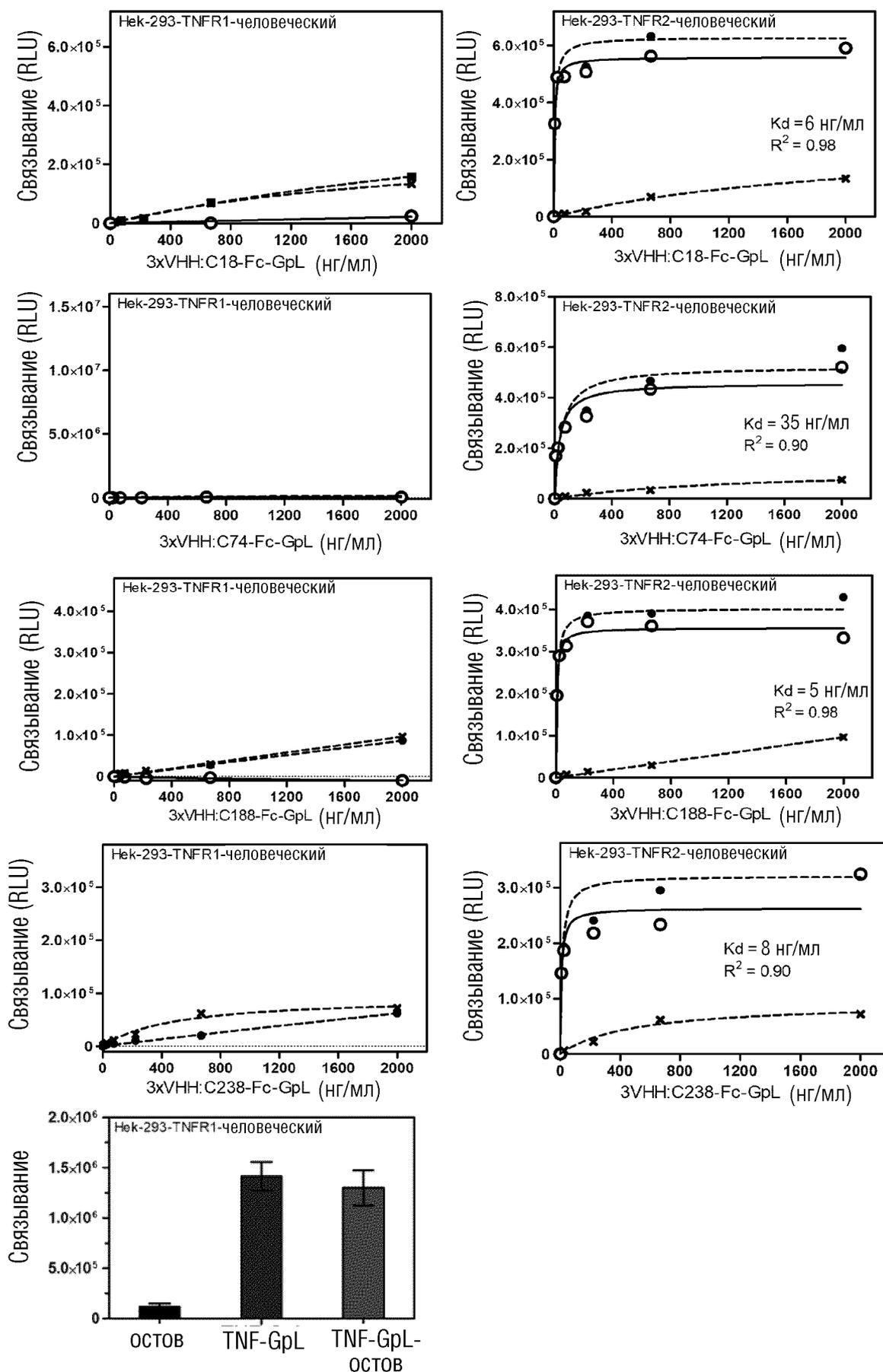
ФИГ.32



ФИГ.33

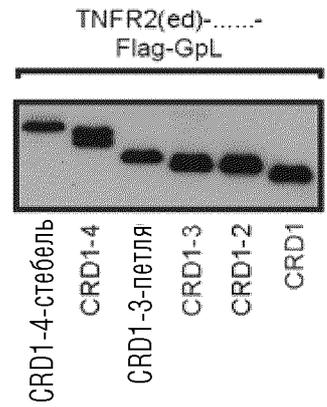
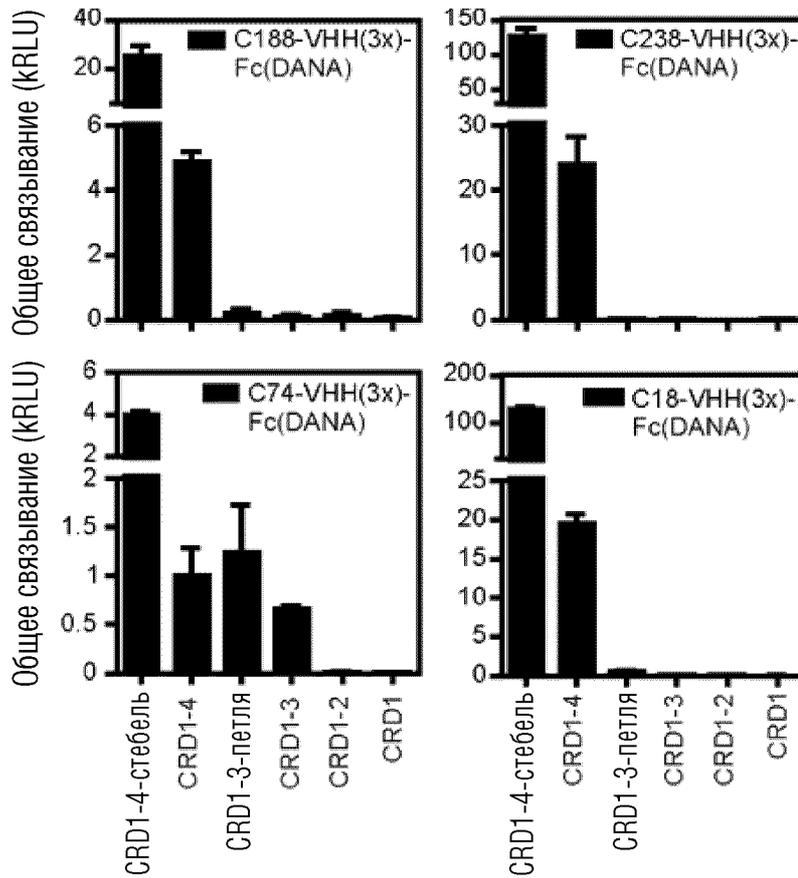


ФИГ.34

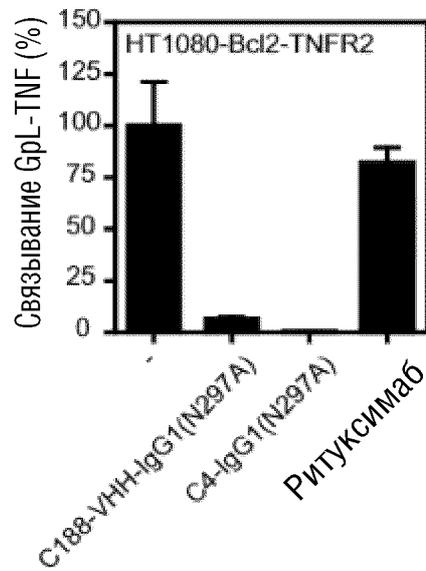


ФИГ.35

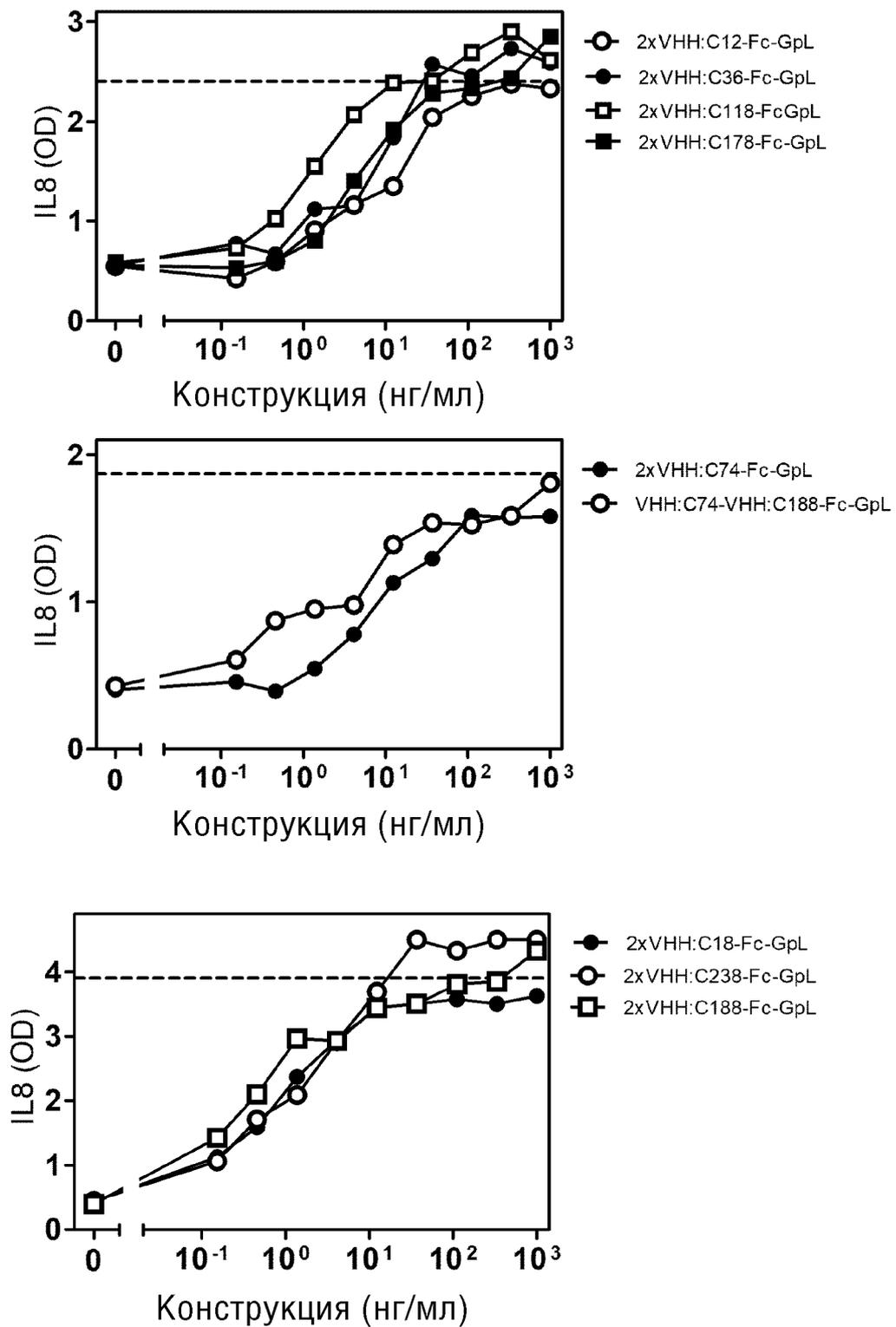
(A)



(B)

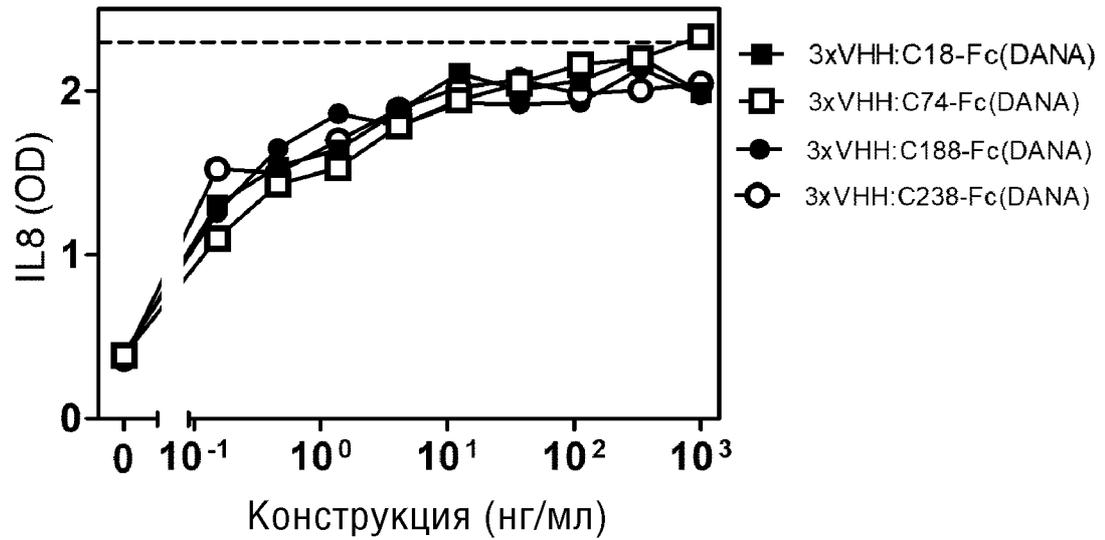


ФИГ.36

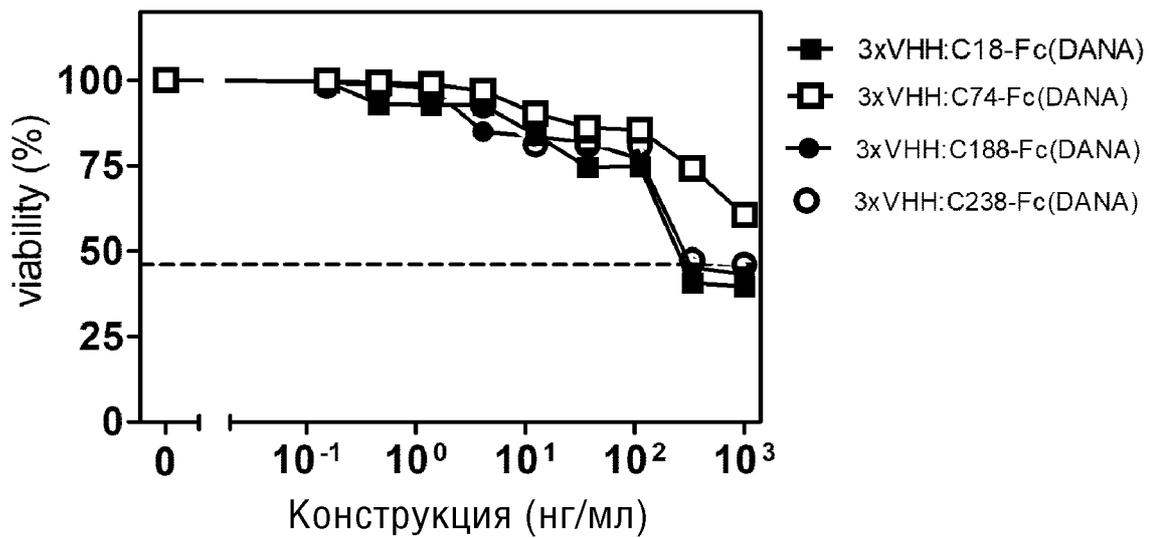


ФИГ.37

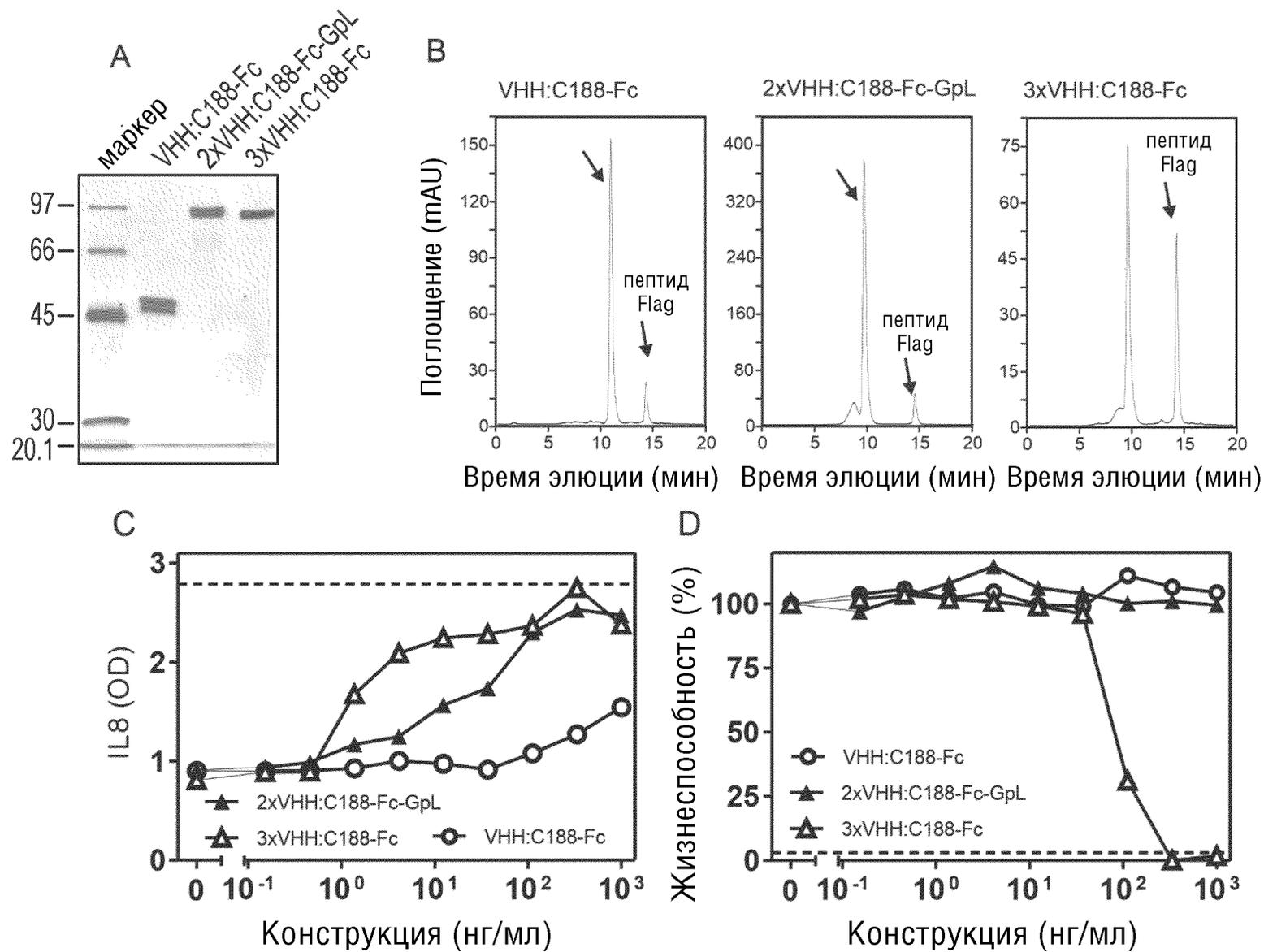
(A)



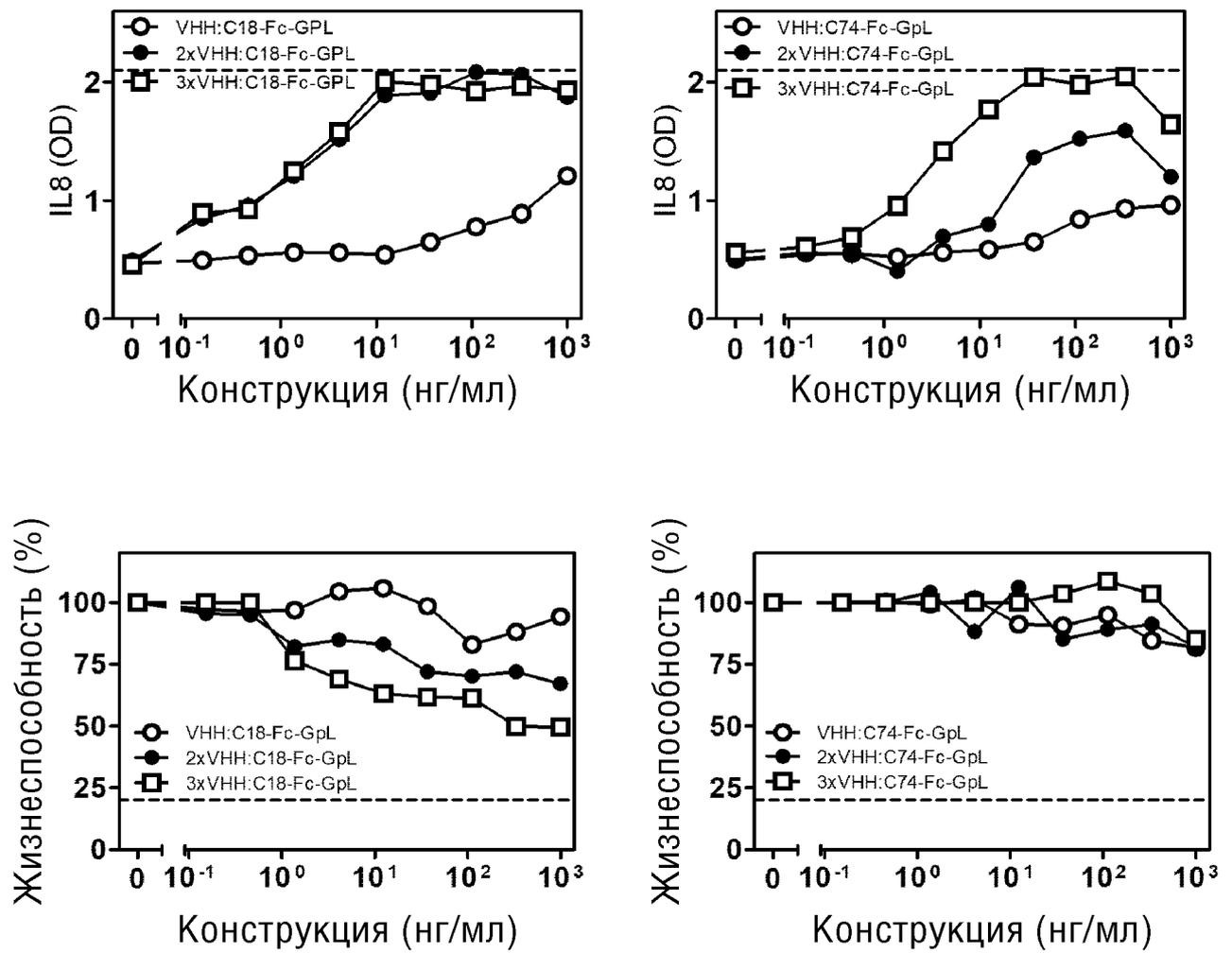
(B)



ФИГ.38

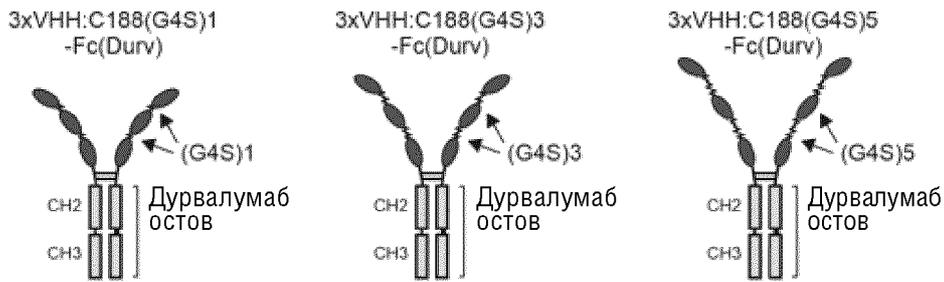


ФИГ.39

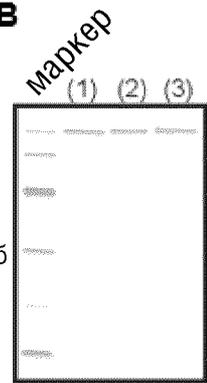


ФИГ.40

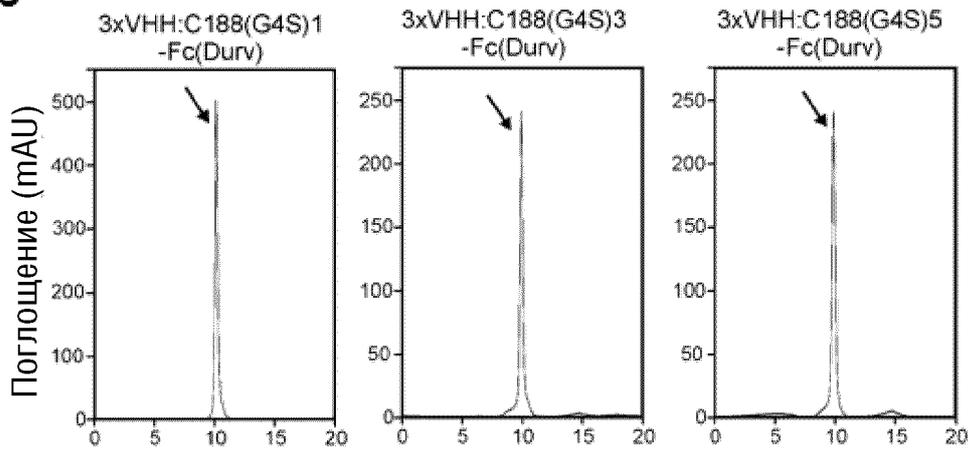
A



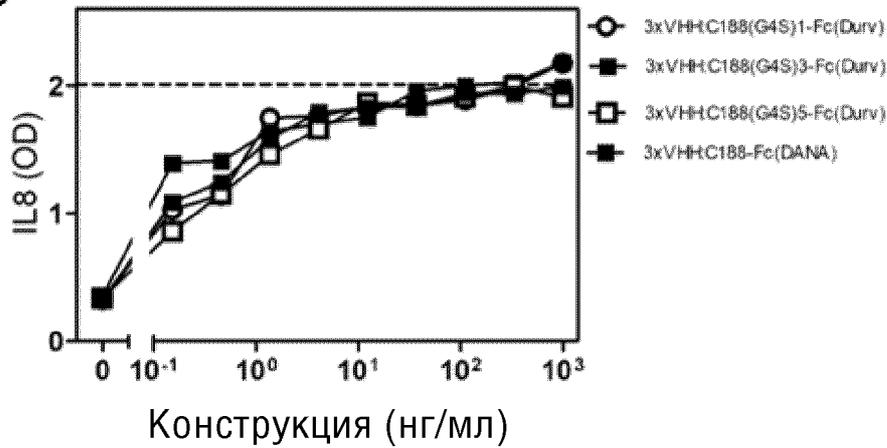
B



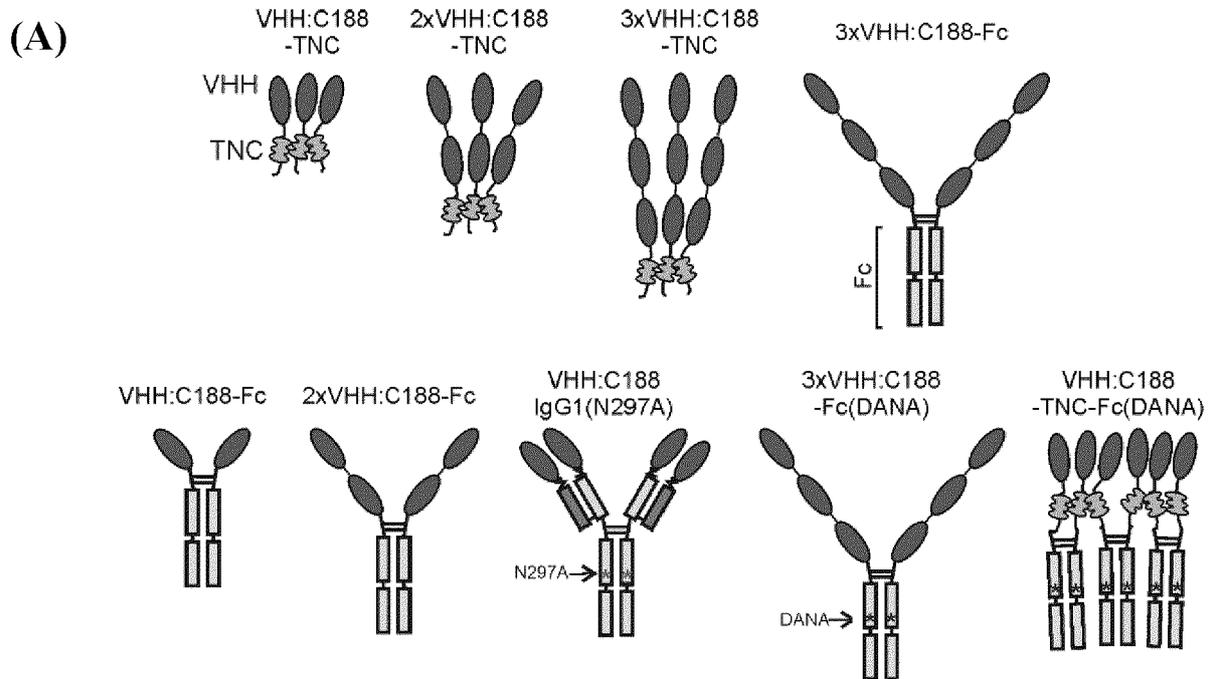
C



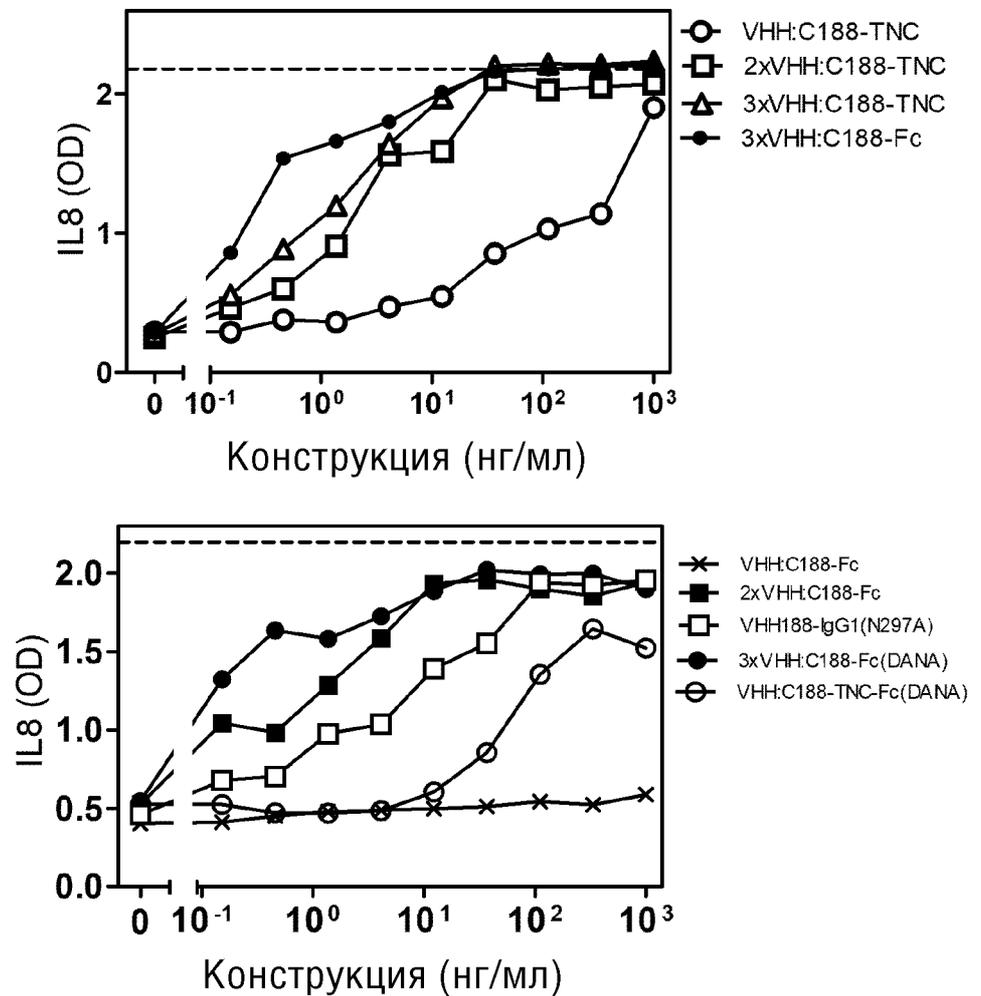
D



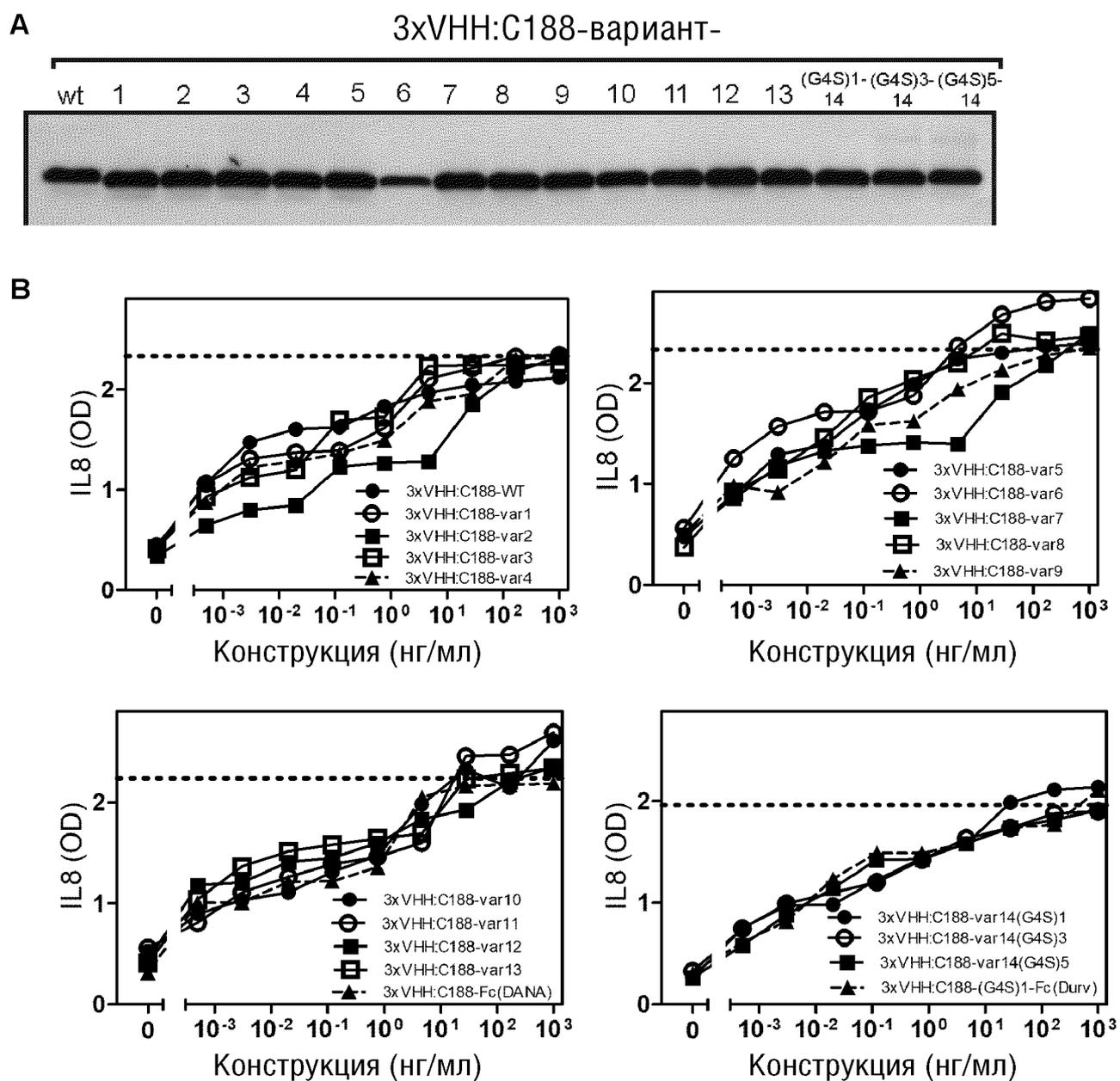
ФИГ.41



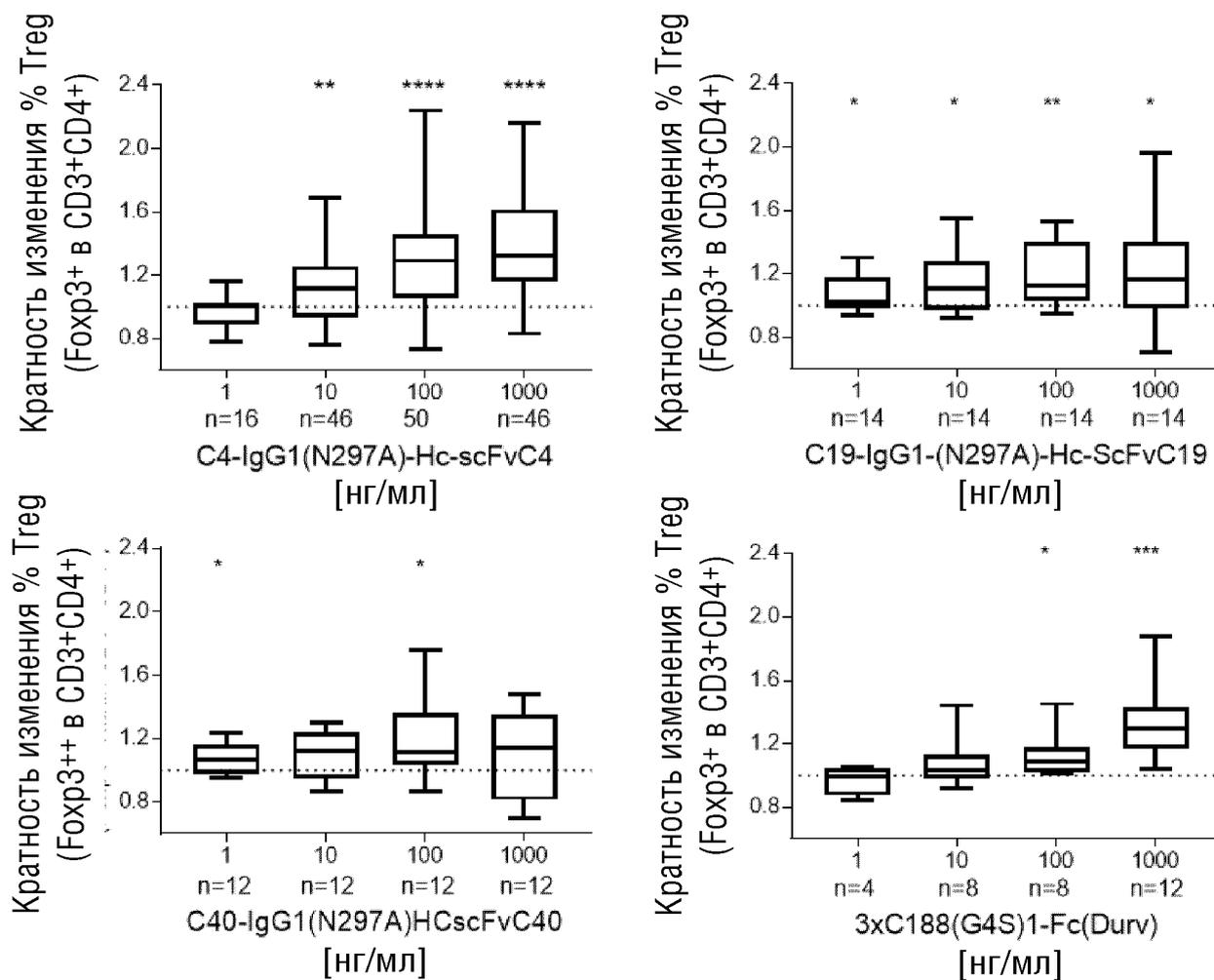
(B)



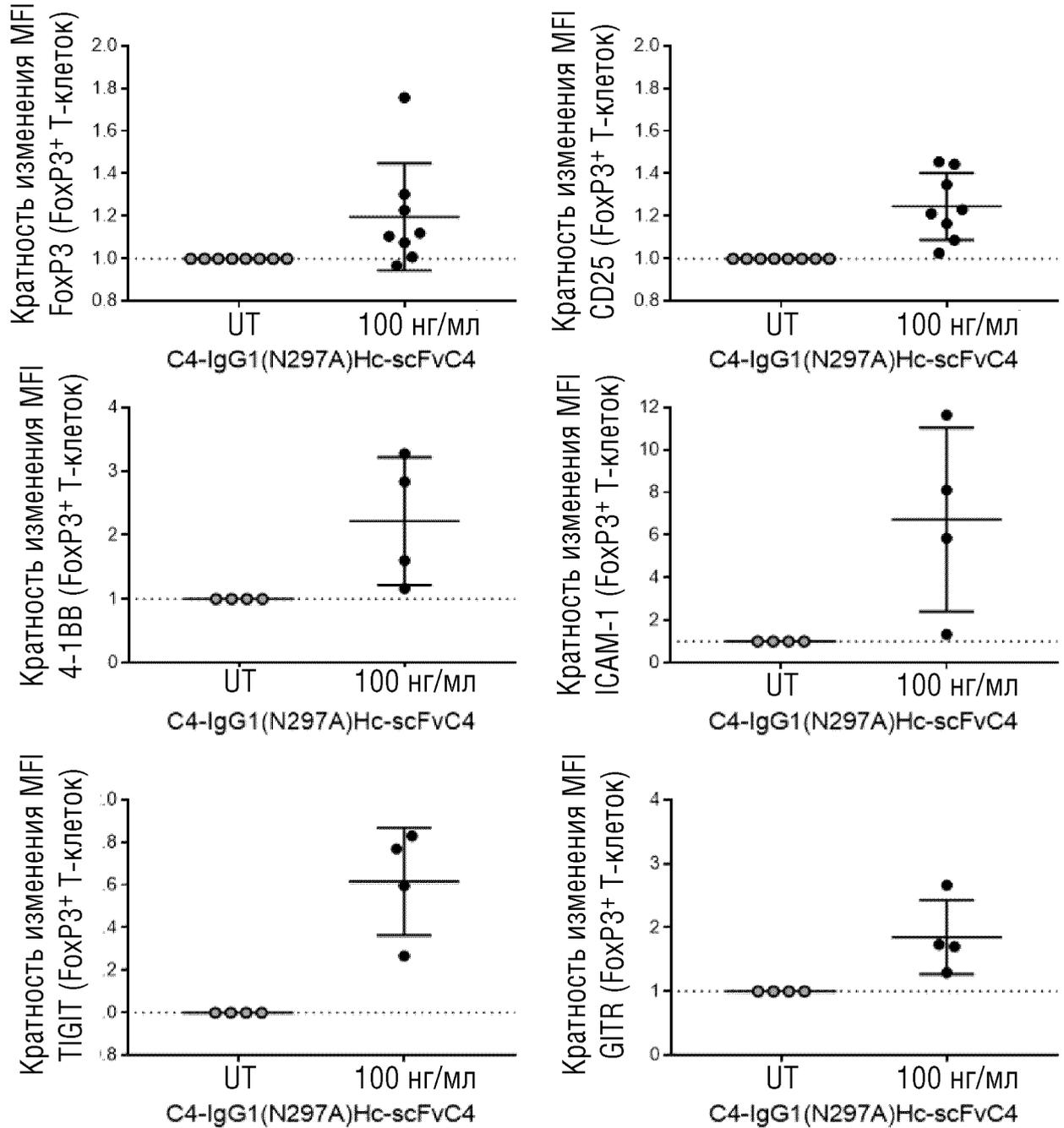
ФИГ.43



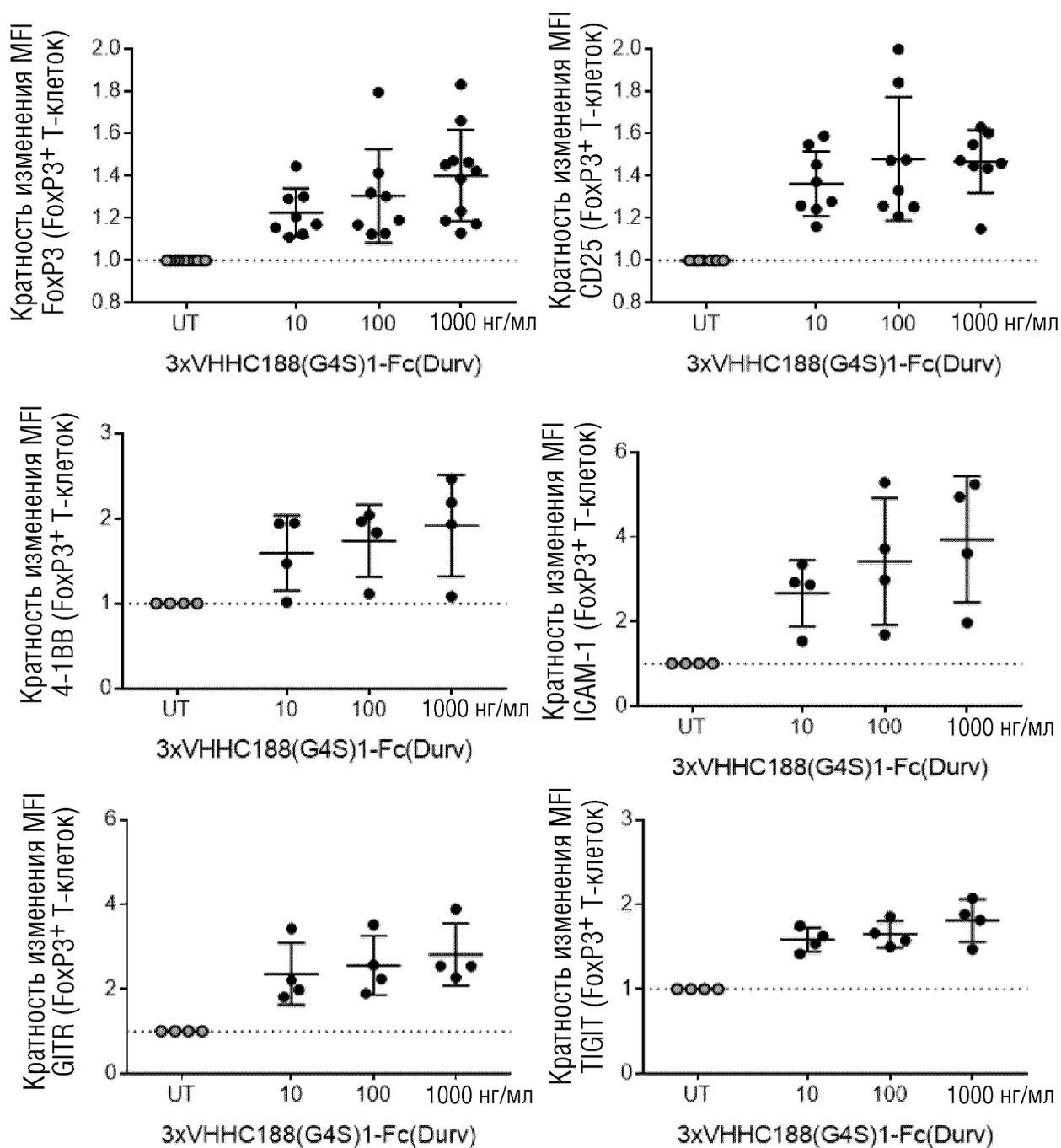
ФИГ.44



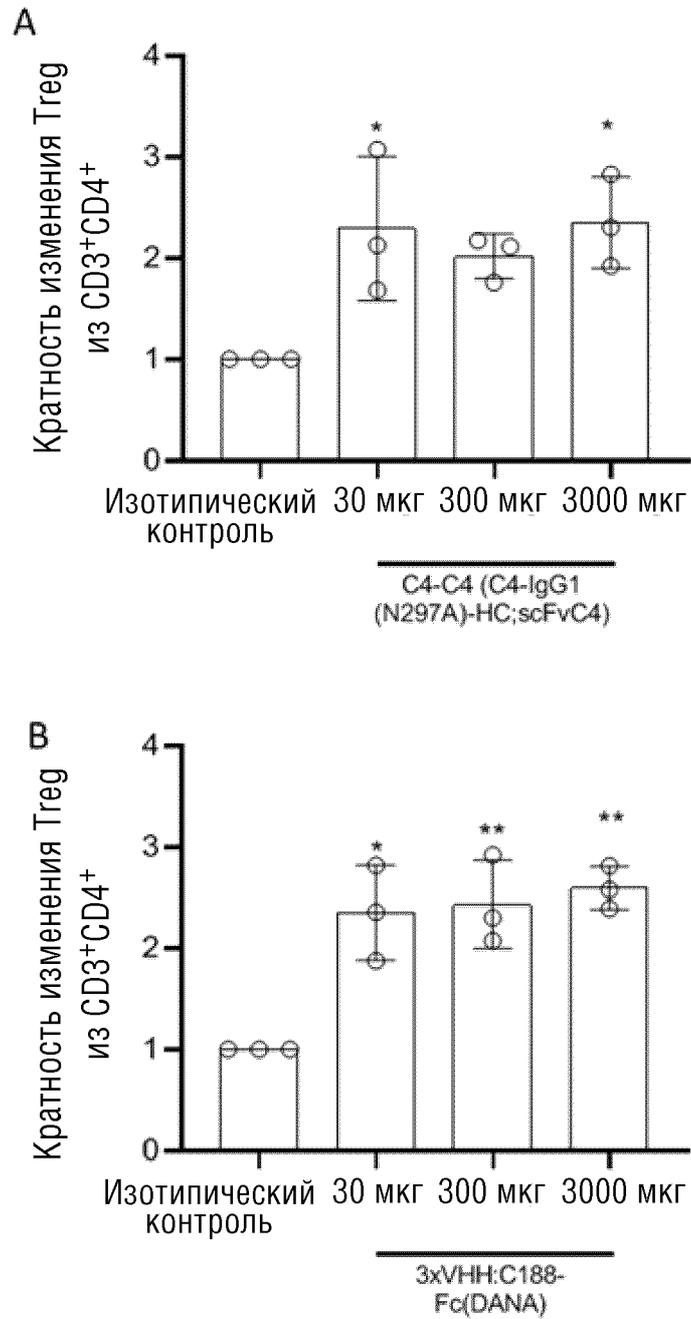
ФИГ.45



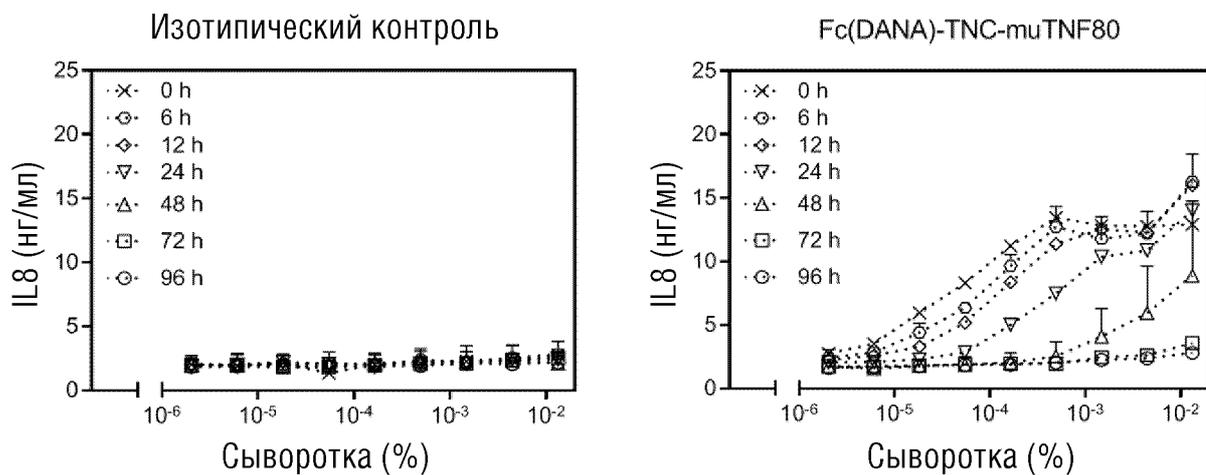
ФИГ.46



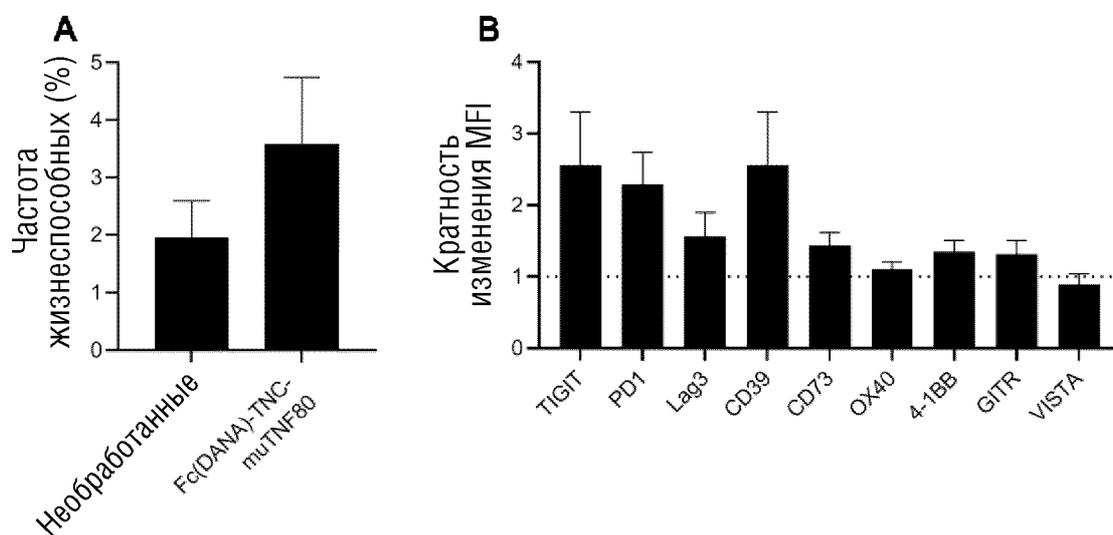
ФИГ.47



ФИГ.48

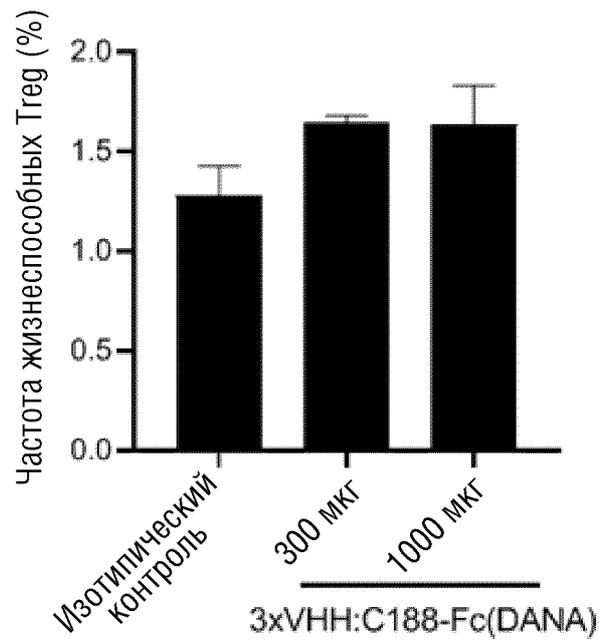


ФИГ.49

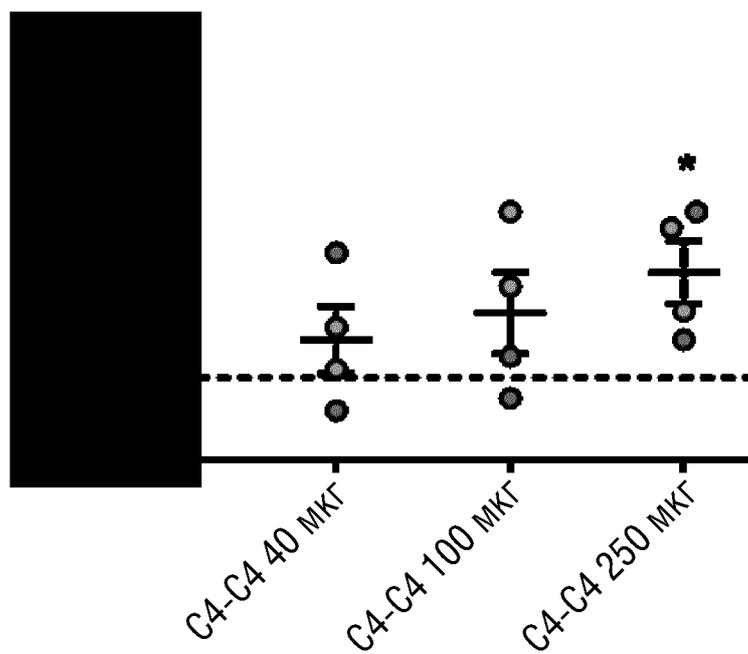


ФИГ.50

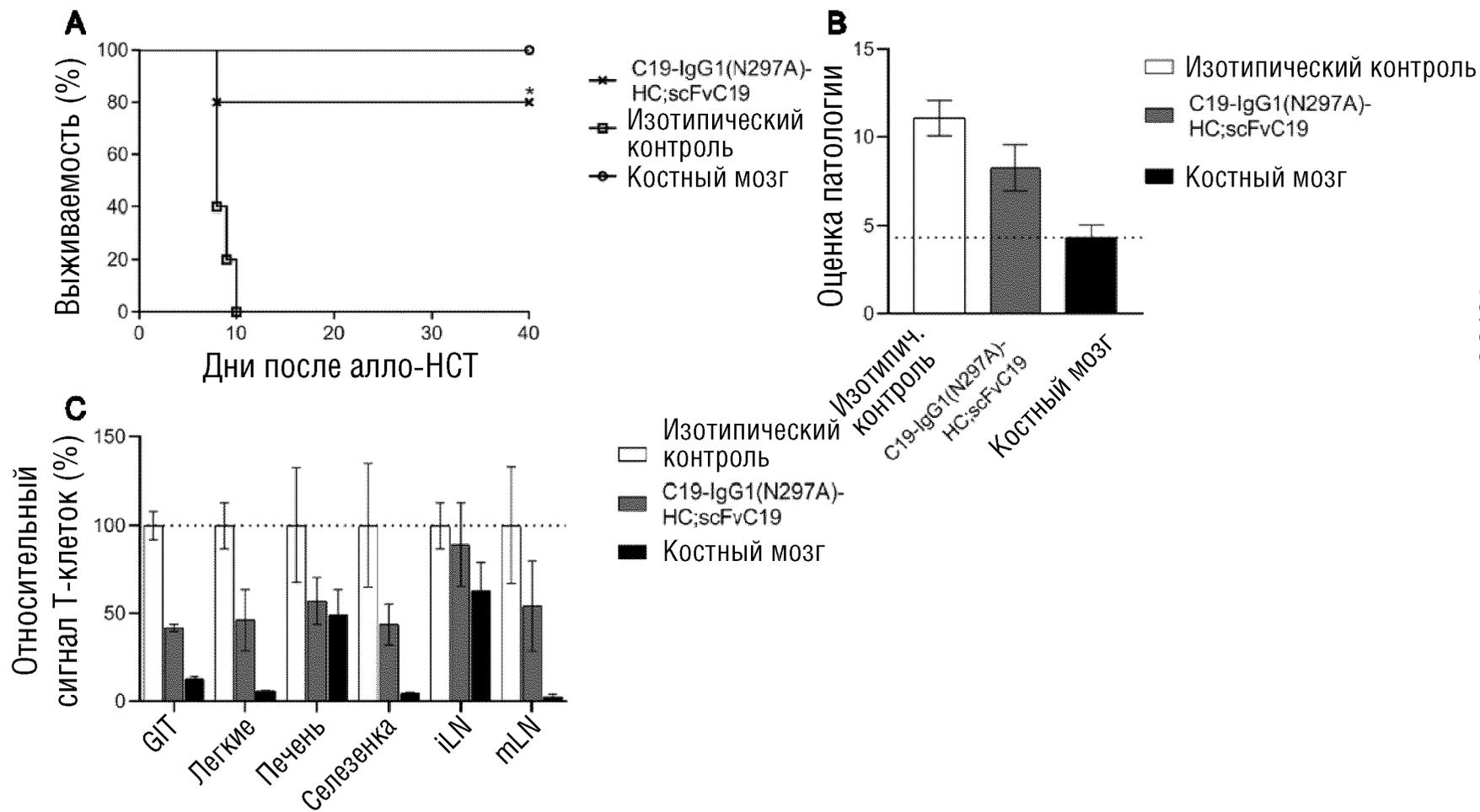
(A)



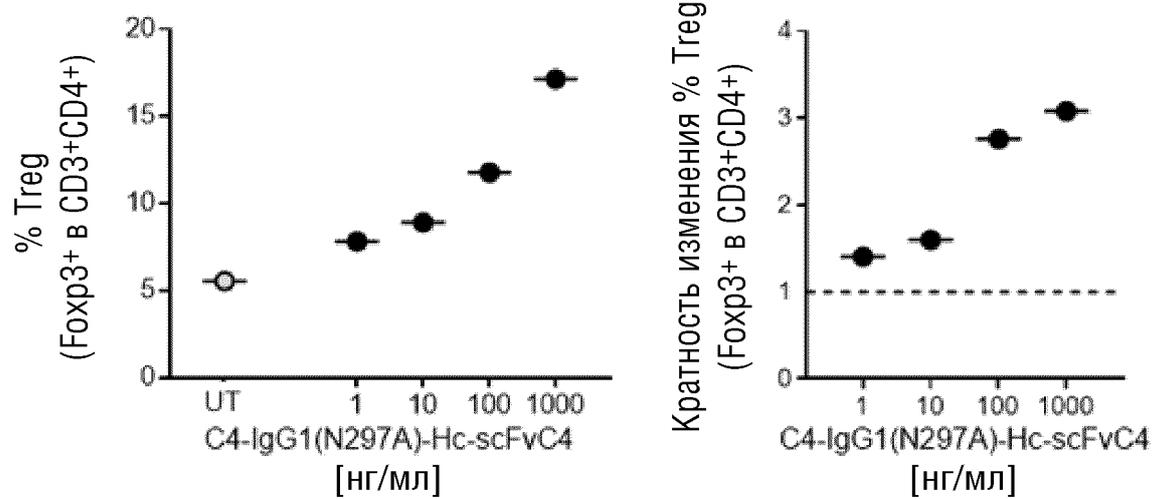
(B)



ФИГ.51



ФИГ.52



ФИГ.53

3XVHHC188(G4S)1-Fc(Durv) - SEQ ID NO: 330

(C188родительский + G4S + C188родительский + G4S + C188родительский + шарнир +
Fc(Дурвалумаб))

DVQLVESGGGSVQTGGSLTLSCAISGTSERYCLGWFRQAPGREREGVAATSLTGRGAQFYADSVKGRFTISLDDA
KNTLYLQMDSLRLPDDTAVYYCAEDVGFLCGYDSNDNPFYDWGQGTQVTVSSGGGGSDVQLVESGGGSVQTGGGS
LTLSCAISGTSERYCLGWFRQAPGREREGVAATSLTGRGAQFYADSVKGRFTISLDDAKNTLYLQMDSLRLPDDTA
VYYCAEDVGFLCGYDSNDNPFYDWGQGTQVTVSSGGGGSDVQLVESGGGSVQTGGSLTLSCAISGTSERYCLG
WFRQAPGREREGVAATSLTGRGAQFYADSVKGRFTISLDDAKNTLYLQMDSLRLPDDTAVYYCAEDVGFLCGYDS
NDNPFYDWGQGTQVTVSS**EPKSDKTHTCP**CPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK* SEQ ID NO: 163

3XVHHC188-var14(G4S)1-Fc(Durv) - SEQ ID NO: 331

(C188вариант14 + G4S + C188вариант14 + G4S + C188вариант14 + шарнир +
Fc(Дурвалумаб))

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGTSERYCLGWFRQAPGKREGVAATSLTGRGAQFYADSVKGRFTISLDD
AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAEDVGFLCGYDNDNPFYDWGQGTQVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG
GSLRLSCAISGTSERYCLGWFRQAPGKREGVAATSLTGRGAQFYADSVKGRFTISLDDAKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAEDVGFLCGYDNDNPFYDWGQGTQVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGTSERY
CLGWFRQAPGKREGVAATSLTGRGAQFYADSVKGRFTISLDDAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAEDVGFLC
GYDNDNPFYDWGQGTQVTVSS**EPKSDKTHTCP**CPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

ФИГ.54

C4-IgG1(Durv)-HC:scFvC4(G4S)4*Легкая цепь (C4-VL + durva-CL) - SEQ ID NO: 332*

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVDTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSG
 TDYTLTISSVQAEDLARYYCQQYYSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
 TKSFNRGEC* **SEQ ID NO: 164**

Тяжелая цепь (C4-VH + DURVA[CH1 + Шарнир + CH2 + CH3] + scFvC4(C4-Vh-Линкер-C4-VL)-) - SEQ ID NO: 333

QVQLLQSGPELVKPGASVKLSCKASGYSFTSYDINWVKQRPGQGLEWVGWIYPRDGDTKYNEKFKGK
 AILTVDTSSNTAYMNLHSLTSEDSAVYFCARLTGPYWFYFDVWGTGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
 TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
 HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIIEKTISKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKQVQLLQSGPELVKPGASVKLSCKASGYSFT
 SYDINWVKQRPGQGLEWVGWIYPRDGDTKYNEKFKGKAILTVDTSSNTAYMNLHSLTSEDSAVYFCA
 RLTGPYWFYFDVWGTGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKA
 SQDVDTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDYTLTISSVQAEDLARYYCQQYYSP
 WPTFGQGTKVEIK* **SEQ ID NO: 165**

ФИГ.55

C4var7-IgG1(Durv)-HC:scFvC4var7(G4S)4*Легкая цепь* $\sim = C4var7-VL + durva-CL) -) - SEQ ID NO: 334$

DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTITCKASQDVDATAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGT
DYTLTISSLQPEDVATYYCQYYSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC*

Тяжелая цепь $\sim = C4var7-VH + DURVA[CH1 + Шарнир + CH2 + CH3] + scFvC4var7[C4-Vh 2-
Линкер-C4-VL 3] =) - SEQ ID NO: 335$

QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCASGYSFTSYDINWVRQAPGQGLEWMGWYPRDGDTKYAEKFQG
RVTLTVDTSSTAYMELSSLRSEDATYFCARLTGPYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKQVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCASGYSF
TSYDINWVRQAPGQGLEWMGWYPRDGDTKYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSSLRSEDATYFC
ARLTGPYWFYFDVWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSTSVGDRVTITCKA
SQDVDATAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQYY
VPPTFGGGTKLEIK

C4var16-IgG1(Durv)-LC:scFvC4var16(G4S)4

Легкая цепь $\sim = C4var16-VL + durva-CL + scFvC4var16[C4-Vh 4-Линкер-C4-VL 4] -) - SEQ ID NO:
336$

DIQMTQSPSSLASVSGDRVTITCKASQDVDATAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGT
DYTLTISSLQPEDVATYYCQYYSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGECQVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCASGYSFTSYDINWVRQAPGQGLEWMGWYPRDGDTKYAE
KFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSSLRSEDATYFCARLTGPYWFYFDVWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLASVSGDRVTITCKASQDVDATAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGV
PSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQYYSPPTFGGGTKLEIK*

Тяжелая цепь $\sim = C4var16-VH + DURVA[CH1 + Шарнир + CH2 + CH3] -) - SEQ ID NO: 337$
QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCASGYSFTSYDINWVRQAPGQGLEWMGWYPRDGDTKYAEKFQGR
VTLTVDTSSSTAYMELSSLRSEDATYFCARLTGPYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*