

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490574** (13) **A2**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.07.31

(22) Дата подачи заявки
2021.02.16

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(54) **CD137-СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 62/980,000; 63/104,685; 63/147,565

(32) 2020.02.21; 2020.10.23; 2021.02.09

(33) US

(62) 202292303; 2021.02.16

(71) Заявитель:
МАКРОДЖЕНИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Бережной Алексей Евгеньевич,
Дидрих Гундо, Мур Пол А., Бонвини
Эцио, Шах Калпана (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение направлено на связывающие молекулы, которые содержат один или более сайтов связывания эпитопа, специфичных в отношении эпитопа CD137, включая антитела и молекулы, содержащие их эпитоп-связывающие фрагменты. Изобретение также направлено на мультиспецифичные связывающие молекулы, содержащие один или более сайтов связывания эпитопа, специфичных в отношении эпитопа CD137, и один или более сайтов связывания эпитопа, специфичных в отношении эпитопа опухолевого антигена ("ОА") (например, "CD137 x ОА-связывающую молекулу").

202490574

A2

A2

202490574

CD137-СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 [0001] Настоящая заявка испрашивает преимущество согласно заявкам на патенты США № 62/980 000 (поданной 21 февраля 2020 г.; на рассмотрении), 63/104 685 (поданной 23 октября 2020 г.; на рассмотрении) и 63/147 565 (поданной 9 февраля 2021 г.), каждая из которых полностью и во всех целях включена в настоящую заявку посредством ссылки.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

10 [0002] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки. Копия указанного файла в формате ASCII, созданная 12 февраля 2021 г., называется MAC-0111-PC_SL.txt и имеет размер 224 061 байт. Указанный файл полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки.

15 ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Технология согласно настоящему изобретению направлена на **CD137-связывающие молекулы**, такие как моноспецифичные антитела и молекулы, содержащие их эпитоп-связывающие фрагменты, которые способны связываться с эпитопом CD137. Технология также направлена на мультиспецифичные **CD137-связывающие молекулы** (например, биспецифичные антитела, биспецифичные диатела, ViTE, трехвалентные связывающие молекулы и т.д.), которые способны связываться как с эпитопом CD137, так и с эпитопом второго антигена, в частности, опухолевым антигеном (tumor antigen, «ТА», «ОА») (например, «**CD137 x ОА-связывающую молекулу**»). Технология также обеспечивает новые **PD-L1-связывающие молекулы**, такие как моноспецифичные антитела и молекулы, содержащие их эпитоп-связывающие фрагменты, которые способны связываться с эпитопом PD-L1, а также их производные и способы их применения. Технология согласно настоящему изобретению также направлена на фармацевтические композиции, которые содержат такие молекулы. Технология также включает применение таких молекул в лечении заболевания, в частности, рака или заболевания или состояния, связанного с супрессией иммунной системы или характеризующегося указанной супрессией.

20

25

30

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] CD137 (также известный как 4-1BB и «член суперсемейства TNF-рецепторов 9» («TNFRSF9»)) представляет собой костимулирующий рецептор - член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, опосредующий CD28-зависимую и независимую костимуляцию Т-клеток (Vinay, D.S. and Kwon, B.S. (1998) “*Role of 4-1BB in immune responses,*” *Semin Immunol.* 10:481–489; Croft, M. (2009) “*The Role Of TNF Superfamily Members In T-Cell Function And Diseases,*” *Nat. Rev. Immunol.* 9:271-285). Индуцибельная экспрессия CD137 обеспечивается Т-клетками, естественными киллерами (NK-клетками), дендритными клетками (ДК), В-клетками и другими клетками иммунной системы. Связывание CD137 с его лигандом CD137L (4-1BBL; TNFSF9) или антителами-агонистами вызывает различные Т-клеточные ответы, такие как пролиферация клеток, повышенная секреция цитокинов и предотвращение вызванной активацией клеточной гибели. Таким образом, антитела, стимулирующие CD137, могут обеспечивать выживаемость и пролиферацию Т-клеток, усиливая, таким образом, противоопухолевый иммунный ответ. Эти знания привели к предположению, что антитела, которые являются иммуноспецифичными в отношении CD137, могут применяться для активации иммунной системы и, таким образом, обеспечения противораковой терапии (Li, S.Y. *et al.* (2013) “*Immunotherapy Of Melanoma With The Immunecostimulatory Monoclonal Antibodies Targeting CD137,*” *Clin. Pharmacol.* 5:47-53; Bartkowiak, T. *et al.* (2015) “*4-1BB Agonists: Multi-Potent Potentiators Of Tumor Immunity,*” *Frontiers Oncol.* 5:117). Были описаны антитела против CD137 утомилумаб и урелумаб, но их клинические испытания были приостановлены из-за низкой эффективности (утомилумаб) или острой гепатотоксичности (урелумаб).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Предложены улучшенные композиции, способные более активно стимулировать и нацеливать иммунную систему организма на борьбу с раковыми клетками, с предотвращением при этом токсических эффектов, связанных с антителами, которые проявляют высокую активность в отсутствие перекрестного связывания. Несмотря на то, что приобретенный иммунитет может являться сильным защитным механизмом против рака и заболевания, он часто подавляется механизмами иммунной супрессии/уклонения в опухолевом микроокружении, опосредуемыми снижением/отсутствием ко-стимулирующей активности CD137. Более того, ко-ингибиторные молекулы, экспрессируемые опухолевыми клетками, клетками иммунной

системы и стромальными клетками в опухолевом окружении, могут приводить к доминантному подавлению Т-клеточных ответов, направленных против раковых клеток.

[0006] Предложены CD137-связывающие молекулы, в частности, **CD137 x OA-связывающие молекулы**, которые способны связываться как с эпитопом CD137, так и с эпитопом опухолевого антигена. Такие биспецифичные молекулы способны связываться с опухолевыми антигенами, которые экспрессируются на поверхности опухолевых клеток, и обеспечивать солокализацию CD137-экспрессирующих клеток иммунной системы с такими опухолевыми клетками. Указанная солокализация стимулирует клетки иммунной системы, стимулируя активацию или продолжительную активацию иммунной системы (например, стимуляцию цитотоксического Т-клеточного ответа против опухолевых клеток). Указанные характеристики обеспечивают возможность применения таких биспецифичных молекул для стимулирования иммунной системы и, в частности, для лечения рака. Технология согласно настоящему изобретению направлена на достижение указанных и других целей.

[0007] Соответственно, согласно некоторым аспектам, предложены **CD137-связывающие молекулы**, такие как моноспецифичные антитела и молекулы, содержащие их эпитоп-связывающие фрагменты, которые способны связываться с эпитопом CD137. Изобретение также направлено на мультиспецифичные **CD137-связывающие молекулы** (например, биспецифичные антитела, биспецифичные диатела, ViTE, трехвалентные связывающие молекулы и т.д.), которые способны связываться как с эпитопом CD137, так и с эпитопом второго антигена, в частности, опухолевым антигеном («OA») (например, «**CD137 x OA-связывающую молекулу**»). Изобретение также обеспечивает новые **PD-L1-связывающие молекулы**, такие как моноспецифичные антитела и молекулы, содержащие их эпитоп-связывающие фрагменты, которые способны связываться с эпитопом PD-L1, а также их производные и способы их применения. Настоящее изобретение также направлено на фармацевтические композиции, которые содержат такие молекулы. Изобретение также включает применение таких молекул для лечения заболевания, в частности, рака или заболевания или состояния, связанного с супрессией иммунной системы или характеризующегося указанной супрессией.

[0008] Настоящее изобретение обеспечивает новые **CD137-связывающие молекулы**, которые проявляют желаемые характеристики, в частности, при включении

в мультиспецифичные молекулы. Настоящее изобретение также направлено на мультиспецифичные **CD137 x OA-связывающие молекулы**, состоящие из полипептидных цепей, которые соединяются друг с другом с образованием двух сайтов связывания, каждый из которых является специфичным в отношении эпитопа CD137, и
5 двух сайтов связывания, каждый из которых является специфичным в отношении эпитопа **OA**. Такие **CD137 x OA-связывающие молекулы** согласно изобретению называются «**биспецифичными тетравалентными**» молекулами. Настоящее изобретение также направлено на **CD137 x OA-связывающие молекулы**, состоящие из полипептидных цепей, которые соединяются друг с другом с образованием двух сайтов
10 связывания, каждый из которых является специфичным в отношении эпитопа CD137, и одного сайта связывания, специфичного в отношении эпитопа **OA**. Такие **CD137 x OA-связывающие молекулы** согласно изобретению называются «**биспецифичными трехвалентными**» молекулами. Связывающие молекулы согласно изобретению (например, **CD137-связывающие молекулы**) иногда содержат первый сайт связывания
15 и не содержат второй сайт связывания, который иммуноспецифично связывается с антигеном, отличным от антигена, с которым связывается первый сайт связывания. Связывающие молекулы согласно изобретению, таким образом, иногда содержат только первый сайт связывания и первый переменный домен легкой цепи и первый переменный домен тяжелой цепи и не содержат второй сайт связывания, второй
20 переменный домен легкой цепи или второй переменный домен тяжелой цепи, которые связываются с другим антигеном по сравнению с первым сайтом связывания. Неограничивающие примеры таких связывающих молекул включают связывающие молекулы, представляющие собой scFv, антитела и Fab.

[0009] Настоящее изобретение обеспечивает **CD137 x OA-связывающие**
25 **молекулы**, которые содержат четыре полипептидные цепи («первую», «вторую», «третью» и «четвертую» полипептидную цепь), где первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, третья и четвертая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом и первая и третья полипептидные цепи ковалентно
30 связаны друг с другом. Также предложены **CD137 x OA-связывающие молекулы** согласно изобретению, содержащие пять полипептидных цепей («первую», «вторую», «третью», «четвертую» и «пятую» полипептидную цепь), где первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, третья и четвертая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, третья и пятая полипептидные

цепи ковалентно связаны друг с другом и первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом.

[0010] Более подробно, изобретение обеспечивает **CD137-связывающую молекулу**, содержащую первый сайт связывания, который иммуноспецифично связывается с эпитопом CD137, где указанный первый сайт связывания содержит первый переменный домен легкой цепи, который содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3}, и первый переменный домен тяжелой цепи, который содержит CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3}; где

(A) CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} первого переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL1 MAB-6 против CD137 (SEQ ID NO:50)** и

(B) CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} первого переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH1 MAB-6 против CD137 (SEQ ID NO:46)**.

[0011] Изобретение дополнительно относится к варианту реализации такой **CD137-связывающей молекулы**, где первый переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность **VH1 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:46)**.

[0012] Изобретение дополнительно относится к вариантам реализации такой **CD137-связывающей молекулы**, где первый переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность:

(A) **VLx MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:54)**;

(B) **VL1 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:50)**;

(B) **VL2 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:55)** или

(C) **VL3 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:56)**.

[0013] Изобретение также относится к варианту реализации такой **CD137-связывающей молекулы**, где:

(A) первый переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность **VH1 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:46)** и

(B) первый переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность **VL3 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:56)**.

[0014] Изобретение также относится ко всем указанным выше вариантам реализации таких **CD137-связывающих молекул**, где указанная молекула представляет собой

биспецифичную молекулу, содержащую второй сайт связывания, который иммуноспецифично связывается с **ОА**, где указанный второй сайт связывания содержит второй переменный домен легкой цепи, содержащий CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3}, и второй переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3}.

5 [0015] Изобретение также относится к варианту реализации такой **CD137-связывающей молекулы**, где **ОА** выбран из опухолевых антигенов, представленных в **Таблицах 1-2**.

[0016] Изобретение также относится к варианту реализации такой **CD137-связывающей молекулы**, где **ОА** представляет собой PD-L1 и где:

10 (A) CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VLx MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:63)** и

(B) CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VHx MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:59)**.

15

[0017] Изобретение также относится к варианту реализации такой **CD137-связывающей молекулы**, где:

(A) (1) CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL1 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:58)** или

20

(2) CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:72)**

и

25 (B) (1) CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH1 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:57)**;

(2) CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:67)**;

30

(3) CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH3 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:68)**;

(4) CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:69)**;

5

(5) CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:70)** или

(6) CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:71)**.

10 [0018] Изобретение также относится к варианту реализации такой **CD137-связывающей молекулы**, где второй переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность:

(A) **VH1 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:57)**;

(B) **VH2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:67)**;

15

(C) **VH3 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:68)**;

(D) **VH4 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:69)**;

(E) **VH5 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:70)** или

(F) **VH6 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:71)**.

[0019] Изобретение также относится к варианту реализации таких **CD137-связывающих молекул**, где второй переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность:

20

(A) **VL1 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:58)** или

(B) **VL2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:72)**.

[0020] Изобретение также относится к варианту реализации такой **CD137-связывающей молекулы**, где **OA** представляет собой 5T4 и где:

25

(A) (1) CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL MAB-1 против 5T4 (SEQ ID NO:93)** и

30

(2) CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH MAB-1 против 5T4 (SEQ ID NO:92)** или

(B) (1) CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL MAB-2 против 5T4 (SEQ ID NO:95)** и

5

(2) CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH MAB-2 против 5T4 (SEQ ID NO:96)**.

[0021] Изобретение также относится к варианту реализации такой **CD137-связывающей молекулы**, где второй переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность **VH MAB-1 против 5T4 (SEQ ID NO:92)**.

10

[0022] Изобретение также относится к вариантам реализации таких **CD137-связывающих молекул**, где второй переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность **VL MAB-1 против 5T4 (SEQ ID NO:93)**.

[0023] Изобретение также относится к такой **CD137-связывающей молекуле**, где **ОА** представляет собой HER2 и где:

15

(A) CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VLx MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:79)** и

(B) CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VHx MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:78)**.

20

[0024] Изобретение также относится к варианту реализации такой **CD137-связывающей молекулы**, где:

(A) (1) CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL1 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:83)**;

25

(2) CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL2 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:84)** или

(3) CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL3 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:85)**;

30

и

- (B) (1) CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH1 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:80)**;
- (2) CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH2 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:81)** или
- (3) CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH3 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:82)**.

10 [0025] Изобретение также относится к варианту реализации такой **CD137-связывающей молекулы**, где второй переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность:

- (A) **VHx MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:78)**;
- (B) **VH1 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:80)**;
- 15 (C) **VH2 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:81)** или
- (D) **VH3 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:82)**.

[0026] Изобретение также относится к вариантам реализации таких **CD137-связывающих молекул**, где второй переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность:

- 20 (A) **VLx MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:79)**;
- (B) **VL1 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:83)**;
- (C) **VL2 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:84)** или
- (D) **VL3 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:85)**.

[0027] Изобретение также относится ко всем указанным выше вариантам реализации таких **CD137-связывающих молекул**, где указанная молекула представляет собой антитело, биспецифичное тетравалентное Fc-содержащее диатело или биспецифичную трехвалентную молекулу.

[0028] Изобретение также относится к варианту реализации такой **CD137-связывающей молекулы**, где указанная молекула является биспецифичной и тетравалентной и содержит первую, вторую, третью, четвертую и необязательно пятую полипептидную цепь, где указанные полипептидные цепи образуют ковалентно связанный комплекс.

30

[0029] Изобретение также относится к варианту реализации такой **CD137-связывающей молекулы**, где указанная молекула является биспецифичной и трехвалентной и содержит первую, вторую, третью и четвертую полипептидную цепь, где указанные полипептидные цепи образуют ковалентно связанный комплекс.

5 [0030] Изобретение также относится к варианту реализации всех таких **CD137-связывающих молекул**, где указанная молекула содержит Fc-участок иммуноглобулина изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 и необязательно также содержит шарнирный домен.

[0031] Изобретение также относится к варианту реализации всех таких **CD137-связывающих молекул**, где Fc-участок представляет собой вариант Fc-участка, который содержит одну или более аминокислотных модификаций, снижающих аффинность варианта Fc-участка в отношении FcγR и/или повышающих время полужизни в сыворотке крови, более конкретно, где указанные модификации включают по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из:

- 15 (A) L234A; L235A;
(B) L234A и L235A;
(C) M252Y; M252Y и S254T;
(D) M252Y и T256E;
(E) M252Y, S254T и T256E или
20 (F) K288D и H435K;

где нумерация представляет собой нумерацию по EU-индексу в соответствии с системой нумерации по Kabat.

[0032] Изобретение также относится к варианту реализации такой **CD137-связывающей молекулы**, где **OA** представляет собой PD-L1 и где:

- 25 (A) первая и третья полипептидные цепи содержат аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120** и
(B) вторая и четвертая полипептидные цепи содержат аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:126** или **SEQ ID NO:139**.
- 30

[0033] Изобретение также относится к варианту реализации такой **CD137-связывающей молекулы**, где указанная молекула содержит:

- (A) **SEQ ID NO:116** и **SEQ ID NO:117**;
- (B) **SEQ ID NO:118** и **SEQ ID NO:119**;
- 5 (C) **SEQ ID NO:120** и **SEQ ID NO:119**;
- (D) **SEQ ID NO:118** и **SEQ ID NO:121**;
- (E) **SEQ ID NO:120** и **SEQ ID NO:121**;
- (F) **SEQ ID NO:120** и **SEQ ID NO:122**;
- (G) **SEQ ID NO:120** и **SEQ ID NO:123**;
- 10 (H) **SEQ ID NO:120** и **SEQ ID NO:124**;
- (I) **SEQ ID NO:120** и **SEQ ID NO:125**;
- (J) **SEQ ID NO:120** и **SEQ ID NO:126** или
- (K) **SEQ ID NO:120** и **SEQ ID NO:139**.

[0034] Изобретение также относится к варианту реализации такой **CD137-связывающей молекулы**, где **OA** представляет собой PD-L1 и где:

- (A) первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:127**, **SEQ ID NO:133** или **SEQ ID NO:135**;
- (B) вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:128**, **SEQ ID NO:134** или **SEQ ID NO:136**;
- (C) третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:129** или **SEQ ID NO:131** и
- 20 (D) четвертая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:130**, **SEQ ID NO:132**.

[0035] Изобретение также относится к варианту реализации такой **CD137-связывающей молекулы**, где указанная молекула содержит:

- (A) **SEQ ID NO:127**, **SEQ ID NO:128**, **SEQ ID NO:129** и **SEQ ID NO:130**;
- 30 (B) **SEQ ID NO:127**, **SEQ ID NO:128**, **SEQ ID NO:131** и **SEQ ID NO:132**;
- (C) **SEQ ID NO:133**, **SEQ ID NO:134**, **SEQ ID NO:131** и **SEQ ID NO:132** или

(D) SEQ ID NO:135, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:131 и SEQ ID NO:132.

[0036] Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей любую из описанных выше **CD137-связывающих молекул** и физиологически приемлемый носитель.

[0037] Изобретение также относится к применению таких **CD137-связывающих молекул** или такой фармацевтической композиции для лечения рака, характеризующегося экспрессией **ОА**.

[0038] Изобретение также относится к **PD-L1-связывающей молекуле**, которая содержит переменный домен легкой цепи, содержащий CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3}, и переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3}, где:

(A) CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:72)**

и

(B) (1) CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:67);**

(2) CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH3 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:68);**

(3) CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH4 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:69);**

(4) CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH5 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:70)** или

(5) CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH6 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:71).**

[0039] Изобретение также относится к варианту реализации такой **PD-L1-связывающей молекулы**, где переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность:

- (A) **VH2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:67);**
- (B) **VH3 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:68);**
- (C) **VH4 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:69);**
- (D) **VH5 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:70) или**
- (E) **VH6 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:71).**

5

[0040] Изобретение также относится к варианту реализации такой **PD-L1-связывающей молекулы**, где переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность **VL2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:72)**.

[0041] Изобретение также относится к варианту реализации таких **PD-L1-связывающих молекул**, где указанная молекула представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент.

[0042] Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим любую из описанных выше **PD-L1-связывающих молекул** и физиологически приемлемый носитель.

[0043] Изобретение также относится к применению таких **PD-L1-связывающих молекул** или таких фармацевтических композиций для лечения заболевания или состояния, связанного с супрессией иммунной системы или характеризующегося экспрессией PD-L1.

[0044] Изобретение также относится к такому применению, где указанное состояние, связанное с супрессией иммунной системы или характеризующееся экспрессией PD-L1, представляет собой рак.

[0045] Изобретение также относится к варианту реализации всех таких способов применения, где указанный рак выбран из группы, состоящей из: рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного и спинного мозга, рака молочной железы, рака шейки матки, рака толстой и прямой кишки, рака желчного пузыря или рака желчного протока, рака желудка, глиобластомы, рака головы и шеи, гепатоклеточной карциномы, рака почки, лейкоза, рака печени, рака легкого, меланомы, нейробластомы, немелкоклеточного рака легкого (НМКРЛ), рака яичников, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, рабдомиосаркомы, рака кожи, плоскоклеточного рака головы и шеи (ПКРГШ), рака желудка, рака яичек, карциномы вилочковой железы и рака матки.

30

- 5 [0046] Изобретение также относится к способу усиления активности нацеленного на опухоль агента, включающий введение указанного нацеленного на опухоль агента в комбинации с любой из описанных выше **CD137-связывающих молекул**, любой из описанных выше **PD-L1-связывающих молекул** или любой из описанных выше фармацевтических композиций.
- 10 [0047] Изобретение также относится к способу лечения заболевания или состояния, связанного с супрессией иммунной системы или характеризующегося экспрессией **ОА**, включающему введение нуждающемуся в этом субъекту любой из описанных выше **CD137-связывающих молекул**, любой из описанных выше **PD-L1-связывающих молекул** или любой из описанных выше фармацевтических композиций.
- [0048] Изобретение также относится к такому способу, дополнительно включающему введение нацеленного на опухоль агента.
- 15 [0049] Изобретение также относится к такому способу, где указанное состояние, связанное с супрессией иммунной системы или характеризующееся экспрессией опухолевого **ОА**, представляет собой рак.
- [0050] Изобретение также относится ко всем указанным выше вариантам реализации такого способа, где указанный нацеленный на опухоль агент представляет собой антитело, эпитоп-связывающий фрагмент антитела или агент, опосредующий перенаправленное Т-клеточное уничтожение клетки-мишени.
- 20 [0051] Изобретение также относится к варианту реализации таких способов, где указанный рак выбран из группы, состоящей из: рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного и спинного мозга, рака молочной железы, рака шейки матки, рака толстой и прямой кишки, рака желчного пузыря или рака желчного протока, рака желудка, глиобластомы, рака головы и шеи, гепатоклеточной карциномы, рака почки, лейкоза, 25 рака печени, рака легкого, меланомы, нейробластомы, немелкоклеточного рака легкого (НМКРЛ), рака яичников, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, рабдомиосаркомы, рака кожи, плоскоклеточного рака головы и шеи (ПКРГШ), рака желудка, рака яичек, карциномы вилочковой железы и рака матки.
- 30 [0052] Изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей **CD137-связывающую молекулу** согласно любому из указанных выше вариантов реализации

или **PD-L1-связывающую молекулу** согласно любому из указанных выше вариантов реализации.

[0053] Изобретение также относится к вектору экспрессии, содержащему такую нуклеиновую кислоту.

5 [0054] Изобретение также относится к клетке, содержащей нуклеиновую кислоту согласно любому из указанных выше вариантов реализации или вектор экспрессии согласно любому из указанных выше вариантов реализации.

[0055] Изобретение также относится к такой клетке, где указанная клетка представляет собой клетку млекопитающего.

10 **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

[0056] На **Фигуре 1A-1D** представлены схематичные изображения репрезентативных ковалентно связанных диател, содержащих Fc-участки. На **Фигурах 1A-1D** показаны тетравалентные диатела, содержащие четыре сайта связывания эпитопа, состоящие из двух пар полипептидных цепей (т.е. состоящие в общем из

15 четырех полипептидных цепей). Один полипептид каждой пары содержит CH₂- и CH₃-домен таким образом, что связанные цепи образуют весь или часть Fc-участка. VL- и VH-домены, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с помощью одинакового паттерна штриховки или закрашивания. Две пары полипептидных цепей могут быть одинаковыми. В таких вариантах реализации, где VL- и VH-домены распознают

20 различные эпитопы (как показано на **Фигурах 1A-1B**), полученная в результате молекула содержит четыре сайта связывания эпитопа и является биспецифичной и бивалентной по отношению к каждому связанному эпитопу. В таких вариантах реализации, где VL- и VH-домены распознают один и тот же эпитоп (например, одинаковые CDR-участки VL-домена и одинаковые CDR-участки VH-домена

25 используются на обеих цепях), полученная в результате молекула содержит четыре сайта связывания эпитопа и является моноспецифичной и тетравалентной по отношению к одному эпитопу. Альтернативно, две пары полипептидов могут различаться. В таких вариантах реализации, где VL- и VH-домены каждой пары полипептидов распознают различные эпитопы (как показано на **Фигуре 1C**), полученная

30 в результате молекула содержит четыре сайта связывания эпитопа и является тетраспецифичной и одновалентной по отношению к обоим связанным эпитопам. На **Фигуре 1A** показано Fc-диатело, которое содержит пептидный домен

гетеродимеризации, содержащий цистеиновый остаток. На **Фигуре 1В** показано Fc-диатело, состоящее из двух пар полипептидных цепей (т.е. в общем из четырех полипептидных цепей), каждая из которых содержит домен гетеродимеризации E-coil или K-coil. Волнистая линия (WWW) на данной фигуре и на всех фигурах, на которых
5 представлены схематичные изображения доменов связывающих молекул, обозначает один или более необязательных доменов гетеродимеризации, который/которые присутствуют. Как показано, цистеиновый остаток может присутствовать в линкере (основная схема) и/или в домене гетеродимеризации (в рамке). Одна полипептидная цепь каждой пары содержит линкер, содержащий цистеин (где указанный линкер может
10 содержать весь или часть шарнирного участка), и CH2- и CH3-домен таким образом, что связанные цепи образуют весь или часть Fc-участка. На **Фигуре 1С** показано содержащее Fc-участок диатело, которое содержит CH1- и CL-домены антитела. На **Фигуре 1D** показана репрезентативная ковалентно связанная молекула диатела, содержащая два сайта связывания эпитопа и состоящая из трех полипептидных цепей.
15 Две из полипептидных цепей содержат CH2- и CH3-домен таким образом, что связанные цепи образуют весь или часть Fc-участка. Полипептидные цепи, содержащие VL- и VH-домен, дополнительно содержат домен гетеродимеризации, содержащий цистеиновый остаток, как показано на данной Фигуре.

[0057] На **Фигуре 2** показано схематичное изображение репрезентативной
20 ковалентно связанной связывающей молекулы, содержащей четыре сайта связывания эпитопа, состоящей из пяти полипептидных цепей. Две из полипептидных цепей содержат линкер, содержащий цистеин (где указанный линкер может содержать весь или часть шарнирного участка), и CH2- и CH3-домен таким образом, что ассоциированные цепи образуют Fc-участок, который содержит весь или часть Fc-
25 участка. Полипептидные цепи, содержащие соединенные VL- и VH-домены, дополнительно содержат линкер и домен гетеродимеризации (дополнительно описанный на **Фигуре 1В**). VL- и VH-домены, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с помощью одинакового паттерна штриховки или закрашивания. Вариабельные домены могут быть выбраны таким образом, чтобы в результате была
30 получена **CD137 x OA-связывающая молекула**, которая содержит два связывающих домена не по типу диатела, специфичных в отношении **OA**, и два связывающих домена по типу диатела, специфичных в отношении CD137. Альтернативно, вариабельные домены могут быть выбраны таким образом, чтобы в результате была получена **CD137**

х ОА-связывающая молекула, которая содержит два связывающих домена не по типу диатела, специфичных в отношении CD137, и два связывающих домена по типу диатела, специфичных в отношении **ОА**. Такие молекулы являются биспецифичными и содержат два сайта связывания CD137, которые могут связываться с одинаковыми или разными эпитопами CD137, и два сайта связывания **ОА**, которые могут связываться с одинаковыми или разными эпитопами **ОА**.

[0058] На **Фигурах 3А-3С** представлены схематичные изображения репрезентативных содержащих Fc-участок трехвалентных связывающих молекул, содержащих три сайта связывания эпитопа. На **Фигуре 3А** схематично показаны домены трехвалентных связывающих молекул, содержащих два связывающих домена по типу диатела, ковалентно связанных с помощью линкеров/доменов гетеродимеризации (дополнительно описанных на **Фигуре 1В**), и связывающий домен по типу Fab, в котором связывающие домены имеют N-концевое расположение по отношению к Fc-участку. Молекула на **Фигуре 3А** содержит четыре цепи. На **Фигурах 3В-3С**, соответственно, схематично показаны домены трехвалентных связывающих молекул, содержащих два связывающих домена по типу диатела и связывающий домен по типу Fab, в котором легкая и тяжелая цепь связаны с помощью полипептидного спейсера, или содержащих связывающий домен по типу scFv. Трехвалентные связывающие молекулы на **Фигурах 3В-3С** содержат три цепи. VL- и VH-домены, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с помощью одинакового паттерна штриховки или закрашивания.

[0059] На **Фигуре 4** показана способность **CD137 х ОА-связывающих молекул DART-A, TRIDENT-A**, молекулы сравнения **TRIDENT-2** и отрицательного контроля **hIgG1** связываться с CD137, экспрессируемым на поверхности рекомбинантных клеток CHO.

[0060] На **Фигурах 5А-5В** показана способность **CD137 х ОА-связывающих молекул DART-A, TRIDENT-A, МАВ-2 против hPD-L1 (1.1)** и отрицательного контроля **hIgG1** связываться с PD-L1, экспрессируемым на поверхности рекомбинантных клеток CHO (**Фигура 5А**) и блокировать взаимодействия PD-L1/PD-1 в PD-L1-репортерном анализе (**Фигура 5В**).

[0061] На **Фигуре 6** показана способность **CD137 х ОА-связывающих молекул DART-A, TRIDENT-A**, молекул сравнения **DART-2** и **TRIDENT-2, DART-3, r-**

урелумаба и отрицательных контролей **DART-1** и **hIgG1** опосредовать мишень-зависимую передачу сигнала в CD137-репортерном анализе.

[0062] На **Фигурах 7А-7В** показана способность **CD137 х ОА-связывающих молекул DART-A, TRIDENT-A**, молекул сравнения **DART-2** и **TRIDENT-2, DART-3, r-урелумаба** и отрицательных контролей **DART-1** и **hIgG1** опосредовать мишень-зависимое высвобождение цитокинов INF-γ (**Фигура 7А**) и IL-2 (**Фигура 7В**) в анализе высвобождения цитокинов из первичных Т-клеток.

[0063] На **Фигурах 8А-8С** показан уровень в сыворотке крови **CD137 х ОА-связывающей молекулы TRIDENT-A** и вызванная ей индукция пролиферации клеток иммунной системы. На графиках показаны фармакокинетические свойства (сывороточный клиренс) (**Фигура 8А**), пролиферация CD8⁺ Т-клеток (**Фигура 8А**), пролиферация НК-клеток (**Фигура 8А**) в течение 20-24 дней у макаков-крабоедов, которым вводили **TRIDENT-A** в концентрации 1 мг/кг (закрашенные круги) или 10 мг/кг (не закрашенные круги).

[0064] На **Фигурах 9А-9В** показана связывающая активность Fab, содержащих деиммунизированные/оптимизированные варианты **МАВ-2 против hPD-L1 (1.1)**. На графиках представлены кривые связывания по результатам ИФА вариантов Fab-фрагментов **МАВ-2 против hPD-L1B, МАВ-2 против hPD-L1D** и **МАВ-2 против hPD-L1F (Фигура 9А)** и **МАВ-2 против hPD-L1А, МАВ-2 против hPD-L1С** и **МАВ-2 против hPD-L1Е (Фигура 9В)**.

[0065] На **Фигурах 10А-10В** показана способность **CD137 х ОА-связывающих молекул**, содержащих деиммунизированные или оптимизированные PD-L1-связывающие домены, связываться с PD-L1, экспрессируемым на поверхности рекомбинантных клеток CHO. На графиках представлены кривые связывания **DART-A1, DART-A4** и антитела против PD-L1 **МАВ-2 против hPD-L1 (1.1) (Фигура 10А), TRIDENT-A, TRIDENT-A4** и отрицательного контроля **hIgG1 (Фигура 10В)**.

[0066] На **Фигурах 11А-11С** показана способность **CD137 х ОА-связывающих молекул**, содержащих деиммунизированные и/или оптимизированные PD-L1-связывающие домены, блокировать взаимодействия PD-L1/PD-1 в PD-L1-репортерном анализе. На графиках представлены кривые активности **DART-A1, DART-A4** и антитела против PD-L1 **МАВ-2 против hPD-L1 (1.1) (Фигура 11А), TRIDENT-A, TRIDENT-A4**

и отрицательного контроля **hIgG1** (Фигура 11B), **DART-A4**, **DART-A7**, **DART-A8**, **DART-A9** и отрицательного контроля **hIgG1** (Фигура 11C).

[0067] На **Фигурах 12A-12B** показана способность **CD137 x OA-связывающих молекул**, содержащих деиммунизированные CD137-связывающие домены и/или деиммунизированные/оптимизированные PD-L1-связывающие домены, связываться с CD137, экспрессируемым на поверхности рекомбинантных клеток CHO. На графиках представлены кривые связывания для **DART-A4**, **DART-A5**, **DART-A6** (Фигура 12A), **TRIDENT-A4**, **TRIDENT-A5**, **TRIDENT-A6** (Фигура 12B). Также на графиках на обеих фигурах представлены данные для молекулы сравнения **r-урелумаба** и отрицательного контроля **hIgG1**.

[0068] На **Фигурах 13A-13B** показана способность **CD137 x OA-связывающих молекул**, содержащих деиммунизированные CD137-связывающие домены и/или деиммунизированные/оптимизированные PD-L1-связывающие домены, опосредовать мишень-зависимую передачу сигнала в CD137-репортерном анализе, проведенном на клетках-мишенях N87 с низкой экспрессией PD-L1 (Фигура 13A) или клетках-мишенях JMT-1 со средней экспрессией PD-L1 (Фигура 13B). На графиках показана активность **DART-A4**, **DART-A5**, **DART-A6**, **TRIDENT-A4**, **TRIDENT-A5**, **TRIDENT-A6**, молекулы сравнения **r-урелумаба** и отрицательного контроля **hIgG1**.

[0069] На **Фигурах 14A-14B** показана способность **CD137 x OA-связывающих молекул**, содержащих деиммунизированные CD137-связывающие домены и деиммунизированные/оптимизированные PD-L1-связывающие домены, опосредовать мишень-зависимое высвобождение цитокинов INF- γ (Фигура 14A) и IL-2 (Фигура 14B) в анализе высвобождения цитокинов из первичных T-клеток. На графиках показана активность **DART-A4**, **DART-A5**, **DART-A6**, **TRIDENT-A4**, **TRIDENT-A5**, **TRIDENT-A6**, молекулы сравнения **r-урелумаба** и отрицательного контроля **hIgG1**.

[0070] На **Фигурах 15A-15B** показана способность **CD137 x OA-связывающих молекул**, содержащих исходные или деиммунизированные/оптимизированные PD-L1-и/или CD137-связывающие домены, связываться с PD-L1 (Фигура 15A) и CD137 (Фигура 15B), экспрессируемыми на клеточной поверхности рекомбинантных клеток CHO. На графиках представлены кривые связывания **DART-A**, **DART-A4**, **DART-A6**, **DART-A7**, **DART-A10**, антител против PD-L1 **MAb-2** против **hPD-L1 (1.1)** и **r-атезолизумаба** и отрицательного контроля **hIgG1** (Фигура 15A), **DART-A**, **DART-A4**,

DART-A6, DART-A7, DART-A10, r-урелумаба и отрицательного контроля **hIgG1** (Фигура 15B).

5 [0071] На **Фигурах 16A-16B** показана способность **CD137 x OA-связывающих молекул**, содержащих исходные или деиммунизированные/оптимизированные PD-L1-и/или CD137-связывающие домены, блокировать взаимодействие PD-L1/PD-1 в PD-L1-репортерном анализе. Результаты для тетравалентных молекул **DART-A, DART-A4, DART-A6, DART-A7, DART-A10** представлены на графиках на **Фигуре 16A** и результаты для трехвалентных молекул **TRIDENT-A, TRIDENT-A4 и TRIDENT-A6** представлены на графиках на **Фигуре 16B**. Также на графиках на обеих фигурах 10 представлены значения для антител против PD-L1 **MAВ-2 против hPD-L1F** и **r-атезолизумаба** и отрицательного контроля **hIgG1**.

15 [0072] На **Фигурах 17A-17B** показана способность **CD137 x OA-связывающих молекул**, содержащих исходные или деиммунизированные/оптимизированные PD-L1-и/или CD137-связывающие домены, опосредовать мишень-зависимую передачу сигнала в CD137-репортерном анализе, проведенном в присутствии клеток-мишеней JMT-1 со средней экспрессией PD-L1 (**Фигура 17A**) или в отсутствие клеток-мишеней (**Фигура 17B**). На графиках показана активность **DART-A, DART-A4, DART-A6, DART-A7, DART-A10, TRIDENT-A, TRIDENT-A4, TRIDENT-A6**, молекулы сравнения **r-урелумаба** и отрицательного контроля **hIgG1**.

20 [0073] На **Фигурах 18A-18B** показана способность **CD137 x OA-связывающих молекул**, содержащих исходные или деиммунизированные/оптимизированные PD-L1-и/или CD137-связывающие домены, опосредовать мишень-зависимое высвобождение цитокинов **INF-γ (Фигура 18A)** и **IL-2 (Фигура 18B)**. На графиках показана активность **DART-A, DART-A4, DART-A6, DART-A7, DART-A10, TRIDENT-A, TRIDENT-A4, TRIDENT-A6**, комбинации **r-атезолизумаба** и **r-урелумаба (r-atezo + r-ure combo)** и отрицательного контроля **hIgG1**.

30 [0074] На **Фигурах 19A-19C** показана способность нескольких репрезентативных **PD-L1 x CD137-биспецифичных молекул: DART-A (Фигура 19A), TRIDENT-A (Фигура 19B)** или **TRIDENT-A4 (Фигура 19C)** в комбинации с репрезентативными **OA x CD3-биспецифичными молекулами (5T4 x CD3-диатело)** предотвращать или ингибировать опухолевый рост или развитие клеток карциномы толстой кишки **RKO in vivo** по сравнению с использованием отдельно **OA x CD3-биспецифичной молекулы**

или контроля, представляющего собой наполнитель, на мышинной модели замещенного мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) ксенотрансплантата.

[0075] На **Фигурах 20А-20В** показана способность нескольких репрезентативных **PD-L1 x CD137-биспецифичных молекул: DART-A6 (Фигура 20А) или TRIDENT-A6 (Фигура 20В)** в комбинации с репрезентативными **ОА x CD3-биспецифичными молекулами (5Т4 x CD3-диатело)** предотвращать или ингибировать опухолевый рост или развитие клеток карциномы толстой кишки RKO *in vivo* по сравнению с использованием только **ОА x CD3-биспецифичной молекулы** или контролем, представляющим собой наполнитель, на мышинной модели замещенного МКПК ксенотрансплантата.

[0076] На **Фигурах 21А-21В** показана способность нескольких репрезентативных **PD-L1 x CD137-биспецифичных молекул: TRIDENT-A, TRIDENT-A6**, содержащих VH/VL CD137-связывающего домена МАВ-6, или молекул сравнения: **TRIDENT-2, DUO-1**, содержащих VH/VL различных CD137-связывающих доменов, в комбинации с репрезентативными **ОА x CD3-биспецифичными молекулами (5Т4 x CD3-диателом)**, предотвращать или ингибировать опухолевый рост или развитие клеток карциномы толстой кишки RKO *in vivo* по сравнению с контролем, представляющим собой наполнитель, на мышинной модели замещенного МКПК ксенотрансплантата. На графике представлены репрезентативные данные от первого исследования (**Фигура 21А**) и второго исследования (**Фигура 21В**).

[0077] На **Фигурах 22А-22В** показана способность **CD137 x ОА-связывающих молекул**, содержащих CD137-связывающие домены и HER2-связывающие домены, опосредовать мишень-зависимую передачу сигнала в CD137-репортерном анализе, проведенном на клетках JIMT-1 со средней экспрессией HER2 (**Фигура 22А**) или клетках-мишенях N87 с высокой экспрессией HER2 (**Фигура 22В**). На графиках показана активность **DART-B1, DART-B2, TRIDENT-B1, TRIDENT-B2**, исходных антител **МАВ-1 против hHER2 (1.3) и МАВ-6 против CD137 (1.1)** и отрицательных контролей, **DART-4, DART-5, TRIDENT-3, TRIDENT-4**.

[0078] На **Фигурах 23А-23D** показана способность **CD137 x ОА-связывающих молекул**, содержащих CD137-связывающие домены и HER2-связывающие домены, опосредовать мишень-зависимое высвобождение цитокинов INF- γ (**Фигуры 23А и 23В**) и IL-2 (**Фигуры 23С и 23D**) в анализе высвобождения цитокинов из первичных Т-

клеток, проведенном на клетках JIMT-1 со средней экспрессией HER2 (**Фигура 22A и 23C**) или на клетках-мишенях N87 с высокой экспрессией HER2 (**Фигура 22B и 23D**). На графиках показана активность **DART-B1, DART-B2, TRIDENT-B1, TRIDENT-B2**, исходных антител **MAV-1 против hHER2 (1.3)** и **MAV-6 против CD137 (1.1)** и отрицательных контролей, **DART-4, DART-5, TRIDENT-3, TRIDENT-4**.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0079] Настоящее изобретение направлено на **CD137-связывающие молекулы**, такие как моноспецифичные антитела и молекулы, содержащие их эпитоп-связывающие фрагменты, которые способны связываться с эпитопом CD137. Изобретение также направлено на мультиспецифичные **CD137-связывающие молекулы** (например, биспецифичные антитела, биспецифичные диатела, ViTE, трехвалентные связывающие молекулы и т.д.), которые способны связываться как с эпитопом CD137, так и с эпитопом второго антигена, в частности, опухолевым антигеном («**ОА**») (например, «**CD137 x ОА-связывающую молекулу**»). Изобретение также обеспечивает новые **PD-L1-связывающие молекулы**, такие как моноспецифичные антитела и молекулы, содержащие их эпитоп-связывающие фрагменты, которые способны связываться с эпитопом PD-L1, а также их производные и способы их применения. Настоящее изобретение также направлено на фармацевтические композиции, которые содержат такие молекулы. Изобретение также включает применение таких молекул для лечения заболевания, в частности, рака или заболевания или состояния, связанного с супрессией иммунной системы или характеризующегося указанной супрессией.

I. Антитела и другие связывающие молекулы

[0080] **CD137 x ОА-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению могут представлять собой антитела или могут быть получены из антител (например, путем фрагментации, расщепления и т.д. полипептидов антитела или путем применения аминокислотных последовательностей молекул антитела или полинуклеотидов (или последовательностей, которые кодируют такие полинуклеотиды) и т.д.).

A. Антитела

[0081] **Антитела** представляют собой молекулы иммуноглобулина, способные специфично связываться с участком-мишенью («эпитопом») молекулы, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид и т.д. («антиген»), с помощью по меньшей мере одного «**сайта связывания эпитопа**», расположенного в переменном участке молекулы иммуноглобулина. При использовании в настоящей заявке, термины

«**антитело**» и «**антитела**» относятся к моноклональным антителам, мультиспецифичным антителам, человеческим антителам, гуманизированным антителам, синтетическим антителам, гибридным антителам, поликлональным антителам, камелизированным антителам, одноцепочечным Fv (scFv)-фрагментам, 5 одноцепочечным антителам, Fab-фрагментам, F(ab')-фрагментам, связанным дисульфидной связью биспецифичным Fv (sdFv)-фрагментам, интрателам и эпитоп-связывающим фрагментам любой из указанных выше молекул. В частности, термин «антитело» включает молекулы иммуноглобулинов и иммунологически активные фрагменты молекул иммуноглобулинов, т.е. молекулы, которые содержат сайт 10 связывания эпитопа. Молекулы иммуноглобулинов могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂) или подкласса. Антитела способны «**иммуноспецифично связываться**» с полипептидом или белком или небелковой молекулой благодаря присутствию на такой молекуле особого домена или фрагмента или конформации («**эпитопа**»). Предполагается, что при 15 использовании в настоящей заявке «**эпитоп-связывающий фрагмент антитела**» означает часть антитела, способную иммуноспецифично связываться с эпитопом. При использовании в настоящей заявке такой термин включает фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂ Fv) и одноцепочечный фрагмент (scFv), а также эпитоп-связывающий домен диатела. При использовании в настоящей заявке указано, что антитело или его эпитоп-связывающий фрагмент «**иммуноспецифично**» связываться с участком другой 20 молекулы (т.е. эпитопом), если он реагирует или ассоциирует более часто, более быстро, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью или авидностью с этим эпитопом по сравнению с альтернативными эпитопами. Также следует понимать при прочтении этого определения, что, например, антитело или его эпитоп-связывающий 25 фрагмент, который иммуноспецифично связывается с первой мишенью, может связываться или может не связываться специфично или предпочтительно со второй мишенью. Эпитоп-содержащая молекула может обладать иммуногенной активностью таким образом, что она вызывает ответ в виде продукции антител у животного; такие молекулы называются «**антигенами**». Природные антитела способны связываться 30 только с одним видом эпитопов (т.е. они являются «**моносспецифичными**»), несмотря на то что они могут связываться со множеством копий указанного вида (т.е. обладать «**бивалентностью**» или «**поливалентностью**»).

[0082] Термин «**моноклональное антитело**» относится к гомогенной популяции антител, где указанное моноклональное антитело состоит из аминокислот (природных или не природных), которые вовлечены в селективное связывание с антигеном. Моноклональные антитела являются высоко специфичными и направлены против

5 одного эпитопа (или антигенного сайта). Термин «моноклональное антитело» включает не только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂ Fv), одноцепочечные фрагменты (scFv), их мутанты, белки слияния, содержащие часть антитела, гуманизированные моноклональные антитела, гибридные моноклональные антитела и

10 любые другие модифицированные конфигурации молекулы иммуноглобулина, которые содержат сайт распознавания антигена и обладают желаемой специфичностью и способностью связываться с антигеном. Предполагается, что изобретение не ограничивается источником антитела или способом, с помощью которого оно получено (например, с помощью гибридомы, фаговой селекции, рекомбинантной экспрессии,

15 трансгенных животных и т.д.). Термин включает полноразмерные иммуноглобулины, а также фрагменты и т.д., описанные выше в рамках определения «антитело». Способы создания моноклональных антител известны в данной области техники. Один способ, который можно использовать, представляет собой способ в соответствии с источником Kohler, G. *et al.* (1975) “*Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of*

20 *Predefined Specificity,*” Nature 256:495-497, или его модификацию. Как правило, моноклональные антитела создают с использованием мышей, крыс или кроликов. Антитела получают путем иммунизации животного иммуногенным количеством клеток, клеточных экстрактов или белковых препаратов, которые содержат желаемый эпитоп. Иммуноген может представлять собой, но не ограничивается указанными, первичные

25 клетки, культивируемые клеточные линии, раковые клетки, белки, пептиды, нуклеиновые кислоты или ткань. Альтернативно, существующие моноклональные антитела и любые другие эквивалентные антитела, которые являются иммуноспецифичными в отношении желаемого патогенного эпитопа, могут быть секвенированы и получены рекомбинантным путем с помощью любых способов,

30 известных в данной области техники. Согласно одному варианту реализации изобретения, такое антитело секвенируют и полинуклеотидную последовательность затем клонируют в вектор для экспрессии или размножения. Последовательность, кодирующая интересующее антитело, можно поддерживать в векторе в клетке-хозяине и указанную клетку-хозяина можно затем размножать и замораживать для

последующего использования. Полинуклеотидная последовательность таких антител может применяться для генетической манипуляции для создания моноспецифичных или мультиспецифичных (например, биспецифичных, триспецифичных и тетраспецифичных) молекул согласно изобретению, а также антитела с оптимизированной аффинностью, гибридного антитела, гуманизированного антитела и/или канинизированного антитела для улучшения аффинности или других характеристик антитела. Общий принцип гуманизирования антитела включает сохранение основной последовательности эпитоп-связывающей части антитела при замене оставшейся части нечеловеческого антитела на последовательности человеческого антитела.

[0083] Последние несколько десятилетий наблюдается оживленный интерес к терапевтическому потенциалу антител, и антитела стали одним из ведущих классов лекарственных средств, полученных с помощью биотехнологии. Более 200 лекарственных средств на основе антител было одобрено для применения или находятся на стадии разработки.

1. Общие структурные характеристики антител

[0084] Основная структурная единица встречающихся в природе иммуноглобулинов (например, IgG) представляет собой тетрамер, состоящий из двух более коротких «легких цепей», которые объединены с двумя более длинными «тяжелыми цепями» и, как правило, экспрессируются в виде гликопротеина размером примерно 150,000 Да. Каждая цепь состоит из аминоконцевой («N-концевой») части, которая содержит «вариабельный домен», и карбокси-концевой («С-концевой») части, которая содержит по меньшей мере один «константный домен». Легкая цепь IgG состоит из одного «вариабельного домена легкой цепи» («VL») и одного «константного домена легкой цепи» («CL»). Таким образом, структура легких цепей молекулы IgG представляет собой **n-VL-CL-c** (где n и c обозначают, соответственно, N-конец и С-конец полипептида). Тяжелая цепь IgG состоит из одного «вариабельного домена тяжелой цепи» («VH»), трех «константных доменов тяжелой цепи» («CH1», «CH2» и «CH3») и «шарнирного» участка («H»), расположенного между CH1- и CH2-доменами. Таким образом, структура тяжелой цепи IgG представляет собой **n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c** (где n и c обозначают, соответственно, N-конец и С-конец полипептида). Способность интактного немодифицированного антитела (например, антитела IgG)

связываться с эпитопом антигена зависит от наличия и последовательностей
вариабельных доменов.

а) Константные домены

(1) Константный домен легкой цепи

5 [0085] Репрезентативный CL-домен представляет собой CL-домен каппа-цепи IgG
человека. Аминокислотная последовательность репрезентативного CL-домена каппа-
цепи IgG человека представляет собой (SEQ ID NO:1):

10 RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
SFNRGEC

[0086] Альтернативно, репрезентативный CL домен представляет собой CL-домен
лямбда-цепи IgG человека. Аминокислотная последовательность репрезентативного
CL-домена лямбда-цепи IgG человека представляет собой (SEQ ID NO:2):

15 QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA
GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTNE GSTVEKTVAP
TECS

(2) CH1-домены тяжелой цепи

[0087] Репрезентативный CH1 домен представляет собой CH1-домен IgG1 человека.
Аминокислотная последовательность репрезентативного CH1-домена IgG1 человека
20 представляет собой (SEQ ID NO:3):

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

[0088] Репрезентативный CH1 домен представляет собой CH1-домен IgG2 человека.
Аминокислотная последовательность репрезентативного CH1-домена IgG2 человека
25 представляет собой (SEQ ID NO:4):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKTV

[0089] Репрезентативный CH1 домен представляет собой CH1-домен IgG3 человека.
Аминокислотная последовательность репрезентативного CH1-домена IgG3 человека
30 представляет собой (SEQ ID NO:5):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRV

[0090] Репрезентативный CH1 домен представляет собой CH1-домен IgG4 человека.
Аминокислотная последовательность репрезентативного CH1-домена IgG4 человека
35 представляет собой (SEQ ID NO:6):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV

(3) Шарнирные участки тяжелой цепи

5 [0091] Репрезентативный шарнирный участок представляет собой шарнирный участок IgG1 человека. Аминокислотная последовательность репрезентативного шарнирного участка IgG1 человека представляет собой (SEQ ID NO:7):

EPKSCDKTHT CPPCP

10 [0092] Другой репрезентативный шарнирный участок представляет собой шарнирный участок IgG2 человека. Аминокислотная последовательность репрезентативного шарнирного участка IgG2 человека представляет собой (SEQ ID NO:8):

ERKCCVECPP CP

15 [0093] Другой репрезентативный шарнирный участок представляет собой шарнирный участок IgG3 человека. Аминокислотная последовательность репрезентативного шарнирного участка IgG3 человека представляет собой (SEQ ID NO:9):

ELKTPPLGDTT HTCPRCPPEPK SCDTPPPCPR CPPEPKSCDTP PPCPRCPPEPK
SCDTPPPCPR CP

20 [0094] Другой репрезентативный шарнирный участок представляет собой шарнирный участок IgG4 человека. Аминокислотная последовательность репрезентативного шарнирного участка IgG4 человека представляет собой (SEQ ID NO:10):

ESKYGPPCPS CP

25 [0095] Как описано в настоящей заявке, шарнирный участок IgG4 может содержать стабилизирующую мутацию, такую как замена S228P (в соответствии с нумерацией по EU-индексу, как указано в системе нумерации по Kabat). Аминокислотная последовательность репрезентативного стабилизированного шарнирного участка IgG4 представляет собой (SEQ ID NO:11):

ESKYGPPCP CP

30 (4) CH2- и CH3-домены тяжелых цепей

[0096] CH2- и CH3-домены двух тяжелых цепей взаимодействуют с образованием «Fc-участка» антител IgG, который распознается клеточными Fc-рецепторами, включая, но не ограничиваясь указанными, Fc-гамма рецепторы (FcγRs). При использовании в настоящей заявке термин «Fc-участок» определяет C-концевой

участок тяжелой цепи IgG. Часть Fc-участка (включая часть, которая содержит полноразмерный Fc-участок) называется в настоящей заявке «**Fc-домен**». Указано, что Fc-участок принадлежит конкретному изотипу, классу или подклассу IgG, если его аминокислотная последовательность наиболее гомологична указанному изотипу по сравнению с другими изотипами IgG. Было показано, что помимо известных способов применения антител в диагностике, они могут быть применимы в качестве терапевтических агентов.

[0097] Аминокислотная последовательность CH2-CH3-домена репрезентативного IgG1 человека представляет собой (SEQ ID NO:12):

```
10      231      240      250      260      270      280
      APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
          290      300      310      320      330
      GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
          340      350      360      370      380
15      PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
          390      400      410      420      430
      WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
          440      447
      ALHNNHYTQKS LSLSPGX
```

20 в соответствии с нумерацией по EU-индексу, как указано в системе нумерации по Kabat, где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[0098] Аминокислотная последовательность CH2-CH3-домена репрезентативного IgG2 человека представляет собой (SEQ ID NO:13):

```
25      231      240      250      260      270      280
      APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD
          290      300      310      320      330
      GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA
          340      350      360      370      380
      PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE
          390      400      410      420      430
30      WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
          440      447
      ALHNNHYTQKS LSLSPGX
```

35 в соответствии с нумерацией по EU-индексу, как указано в системе нумерации по Kabat, где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[0099] Аминокислотная последовательность CH2-CH3-домена репрезентативного IgG3 человека представляет собой (SEQ ID NO:14):

231 240 250 260 270 280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD
5 290 300 310 320 330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
340 350 360 370 380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
10 390 400 410 420 430
WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQOG NIFSCSVME
440 447
ALHNRFTQKS LSLSPGX

в соответствии с нумерацией по EU-индексу, как указано в системе нумерации по Kabat, где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

15 [00100] Аминокислотная последовательность CH2-CH3-домена репрезентативного IgG4 человека представляет собой (SEQ ID NO:15):

231 240 250 260 270 280
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
20 290 300 310 320 330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
340 350 360 370 380
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
390 400 410 420 430
WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME
25 440 447
ALHNHYTQKS LSLSLGX

в соответствии с нумерацией по EU-индексу, как указано в системе нумерации по Kabat, где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[00101] На протяжении настоящей заявки нумерация остатков в константном участке тяжелой цепи IgG представляет собой нумерацию по EU-индексу в соответствии с системой нумерацией по Kabat («по Кэбату») (Kabat *et al.*, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, NIH, MD (1991), конкретно включенный в настоящую заявку посредством ссылки). Термин «EU-индекс в соответствии с системой нумерации по Kabat» относится к нумерации константных доменов IgG1 человеческого EU-антитела.

[00102] Полиморфизмы наблюдались в нескольких различных положениях в пределах константных участков антитела (например, положениях в пределах Fc-фрагмента, включая, но не ограничиваясь указанными, положения 270, 272, 312, 315, 356 и 358 в соответствии с EU-индексом, как указано в системе нумерации по Kabat).

5 Таким образом, могут наблюдаться небольшие различия между представленной последовательностью и последовательностями в соответствии с предшествующим уровнем техники. Полиморфные формы человеческих иммуноглобулинов были хорошо охарактеризованы. В настоящее время известно 18 аллотипов Gm: G1m (1, 2, 3, 17) или G1m (a, **x**, f, z), G2m (23) или G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28)

10 или G3m (b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, *et al.*, “*The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, Function And Regulation.*” Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. *et al.*, 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). Специально предполагается, что антитела согласно настоящему изобретению могут содержать любой аллотип, изоаллотип или гаплотип любого гена иммуноглобулина и не

15 ограничиваются аллотипом, изоаллотипом или гаплотипом последовательностей, предложенных в настоящей заявке. Более того, в некоторых системах экспрессии С-концевой аминокислотный остаток (выделенный жирным шрифтом выше) СНЗ-домена может быть удален посттрансляционно. Соответственно, С-концевой остаток СНЗ-домена представляет собой необязательный аминокислотный остаток в молекулах

20 согласно изобретению. Настоящее изобретение конкретно включает молекулы согласно изобретению, у которых отсутствует С-концевой остаток СНЗ-домена. Также настоящее изобретение конкретно включает такие молекулы, содержащие С-концевой лизиновый остаток СНЗ-домена.

b) Вариабельные домены

25 [00103] Вариабельные домены молекулы IgG состоят из трех **«определяющих комплементарность участков» («CDR»)**, которые содержат аминокислотные остатки антитела, которые контактируют с эпитопом, а также промежуточные не представляющие собой CDR сегменты, называемые **«каркасные участки» («FR»)**, которые в целом поддерживают структуру и определяют расположение петель CDR

30 таким образом, чтобы обеспечивать возможность такого контакта (несмотря на то, что определенные каркасные остатки также могут контактировать с эпитопом). Таким образом, VL- и VH-домены имеют структуру **n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-с**. Аминокислотные последовательности CDR определяют, способно ли антитело

связываться с конкретным эпитопом. В результате взаимодействия легкой цепи антитела с тяжелой цепью антитела и, в частности, взаимодействия их VL- и VH-доменов, образуется сайт связывания эпитопа указанного антитела.

[00104] Аминокислоты из переменных доменов зрелых тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов обозначаются в соответствии с положением указанной аминокислоты в цепи. Кэбатов было описано множество аминокислотных последовательностей для антител, была идентифицирована аминокислотная консенсусная последовательность для каждой подгруппы и каждой аминокислоте был присвоен номер остатка (SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, NIH, MD (1991)). CDR-участки и FR-участки идентифицированы в соответствии с системой нумерации по Kabat (следует понимать, что CDR_{H1} в соответствии с системой нумерации Чотиа (Chothia, C. & Lesk, A. M. ((1987) "*Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins*," J. Mol. Biol. 196:901-917) начинается на пять остатков раньше). Систему нумерации по Kabat можно применять к антителам, не включенным в его сборник, путем выравнивания интересующего антитела с одной из консенсусных последовательностей по Кэбату со ссылкой на консервативные аминокислоты. Этот способ обозначения номеров остатков стал стандартным в данной области техники и позволяет легко идентифицировать аминокислоты в эквивалентных положениях в различных антителах, включая гибридные или гуманизированные варианты. Например, аминокислота в положении 50 легкой цепи антитела человека занимает положение, эквивалентное аминокислоте в положении 50 легкой цепи мышинового антитела. Положения в пределах VL- и VH-доменов, в которых начинаются и заканчиваются их CDR-участки, таким образом, хорошо определены и могут быть установлены путем оценки последовательностей VL- и VH-доменов (см., например, Martin, C.R. (2010) "*Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*," In: ANTIBODY ENGINEERING VOL. 2 (Kontermann, R. and Dübel, S. (eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Chapter 3 (pages 33-51)).

[00105] Полипептиды, которые представляют собой (или могут служить в качестве) первого, второго и третьего CDR легкой цепи антитела, обозначены в настоящей заявке соответственно как: **CDR_{L1}-домен**, **CDR_{L2}-домен** и **CDR_{L3}-домен**. Подобным образом, полипептиды, которые представляют собой (или могут служить в качестве) первого, второго и третьего CDR тяжелой цепи антитела, обозначены в настоящей заявке соответственно как: **CDR_{H1}-домен**, **CDR_{H2}-домен** и **CDR_{H3}-домен**. Таким образом,

термины CDR_L1-домен, CDR_L2-домен, CDR_L3-домен, CDR_H1-домен, CDR_H2-домен и CDR_H3-домен относятся к полипептидам, которые при включении в белок приводят к способности указанного белка связываться со специфичным эпитопом, независимо от того, представляет собой такой белок антитело, содержащее легкие и тяжелые цепи, или представляет собой диатело или одноцепочечную связывающую молекулу (например, scFv, ViTe и т.д.), или представляет собой белок другого типа. Соответственно, при использовании в настоящей заявке термин «**эпитоп-связывающий фрагмент**» означает фрагмент молекулы, способный иммуноспецифично связываться с эпитопом. Эпитоп-связывающий фрагмент может содержать любые 1, 2, 3, 4 или 5 из CDR-доменов антитела или может содержать все 6 из CDR доменов антитела и, несмотря на способность иммуноспецифично связываться с указанным эпитопом, может проявлять иммуноспецифичность, аффинность или селективность в отношении такого эпитопа, отличную от иммуноспецифичности, аффинности или селективности указанного антитела. Однако, как правило, эпитоп-связывающий фрагмент содержит все 6 из CDR-доменов такого антитела. Эпитоп-связывающий фрагмент антитела может представлять собой одну полипептидную цепь (например, scFv) или может содержать две или более полипептидных цепей, каждая из которых содержит amino-конец и карбокси-конец (например, диатело, Fab-фрагмент, Fab₂-фрагмент и т.д.). Если специально не указано, порядок доменов белковых молекул, описанных в настоящей заявке, указан в направлении «от N-конца к C-концу».

[00106] Сайт связывания эпитопа может содержать полноразмерный переменный домен, слитый с константными доменами, или только определяющие комплементарность участки (CDR) такого переменного домена, привитые на подходящие каркасные участки. Сайты связывания эпитопа могут представлять собой сайты связывания дикого типа или сайты связывания, модифицированные с помощью одной или более аминокислотных замен.

с) Гуманизирование антител

[00107] Изобретение, в частности, включает связывающие молекулы (включая антитела и диатела), которые содержат VL- и/или VH-домен гуманизированного антитела. Термин «**гуманизированное**» антитело относится к гибридной молекуле, в целом, полученной с использованием рекомбинантных технологий и содержащей сайт связывания эпитопа иммуноглобулина из вида, не представляющего собой человека, и оставшуюся структуру молекулы иммуноглобулина, которая основана на структуре

и/или последовательности иммуноглобулина человека. Полинуклеотидная последовательность переменных доменов таких антител может применяться для генетической манипуляции для создания указанных производных и для улучшения аффинности или других характеристик таких антител. Известно, что переменные домены как тяжелых, так и легких цепей содержат три CDR-участка, которые варьируют в зависимости от интересующего антигена и определяют связывающую способность и фланкированы четырьмя FR, которые являются относительно консервативными для данного вида и предположительно обеспечивают каркас для CDR. Когда получают не человеческие антитела, направленные против конкретного антигена, переменные домены могут быть «реконструированы» или «гуманизированы». Общий принцип при гуманизации антитела включает сохранение основной последовательности эпитоп-связывающей части антитела при замене оставшейся части не человеческого антитела на последовательности человеческого антитела. Гуманизация моноклонального антитела включает четыре общих этапа: (1) определение нуклеотидной и предсказанной аминокислотной последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей исходного антитела, (2) конструирование гуманизированного антитела или канинизированного антитела, т.е. решение того, какой каркасный участок антитела использовать во время процесса гуманизации или канинизации, (3) непосредственно методы/технологии гуманизации или канинизации и (4) трансфекцию и экспрессию гуманизированного антитела. См., например, патенты США № 4 816 567; 5 807 715; 5 866 692 и 6 331 415.

[00108] Был описан ряд молекул гуманизированных антител, содержащих сайт связывания эпитопа, происходящий из не человеческого иммуноглобулина, включая гибридные антитела, содержащие переменный домен иммуноглобулина грызунов или модифицированный переменный домен иммуноглобулина грызунов и связанные с ним CDR, слитые с константными доменами человеческого иммуноглобулина (см., например, Lobuglio *et al.* (1989) “*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224 (1989)). В соответствии с другими ссылками, описаны CDR-участки грызунов, привитые на человеческий поддерживающий каркасный участок (FR) до слияния с подходящим константным доменом человеческого антитела (см., например, Riechmann, L. *et al.* (1988) “*Reshaping Human Antibodies for Therapy*,” Nature 332:323-327; and Jones *et al.* (1986) “*Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those*

From A Mouse,” Nature 321:522-525). В соответствии с другими ссылками, описаны CDR грызунов, поддерживаемые венерованными рекомбинантным путем каркасными участками грызунов. См., например, публикацию европейского патента № 519 596. Указанные «гуманизированные» молекулы конструируют для минимизации
5 нежелательного иммунологического ответа на молекулы антител грызунов против человеческих антигенов, который ограничивает длительность и эффективность терапевтического применения указанных фрагментов у реципиентов, представляющих собой людей. Другие способы гуманизирования антител, которые также могут использоваться, описаны в источнике Daugherty *et al.* (1991) “*Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins,*” Nucl. Acids Res.
10 19:2471-2476, и в патентах США № 6 180 377; 6 054 297 и 5 997 867. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в гуманизированных антителах сохранены все последовательности CDR (например, гуманизированное мышинное антитело, которые содержит все шесть CDR из мышинных антител). Согласно
15 другим вариантам реализации изобретения, гуманизированные антитела содержат один или более CDR (один, два, три, четыре, пять или шесть), которые различаются по последовательности по сравнению с исходным антителом.

2. CD137-связывающие домены

[00109] Настоящее изобретение направлено на **CD137-связывающие молекулы**, такие как моноспецифичные антитела и молекулы, содержащие их эпитоп-связывающие фрагменты, которые способны связываться с эпитопом CD137. CD137-связывающие домены нового человеческого моноклонального антитела «**CD137 MAB-6**» представлены ниже. Настоящее изобретение конкретно включает и охватывает **CD137-связывающие молекулы** и мультиспецифичные **CD137-связывающие молекулы**
25 (например, биспецифичные антитела, биспецифичные диатела, BiTE, трехвалентные связывающие молекулы и т.д.), такие как **CD137 x OA-связывающие молекулы**, которые содержат VL- и/или VH-домен и/или 1, 2 или все 3 из CDR_L VL-домена и/или 1, 2 или все 3 из CDR_H VH-домена **MAB-6 против CD137** или любого из его вариантов,
30 представленных ниже.

а) Человеческое антитело MAB-6 против CD137

[00110] **MAB-6 против CD137** представляет собой новое человеческое моноклональное антитело. Аминокислотная последовательность VH-домена **MAB-6**

против CD137 (VH1 MAB-6 против CD137) представляет собой (SEQ ID NO:46) (остатки CDR_H подчеркнуты):

5 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGR
IYTSGSTNYN PSLKSRVTMS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDDGW
YDEDYNYGMDVWGQGT TTVT VSS

[00111] Аминокислотные последовательности CDR_H VH1 MAB-6 против CD137 представляют собой:

CDR_{H1} (SEQ ID NO:47): SYYWS

CDR_{H2} (SEQ ID NO:48): RIYTSGSTNYNPSLKS

10 CDR_{H3} (SEQ ID NO:49): DGWYDEDYNYGMDV

[00112] Аминокислотная последовательность VL-домена MAB-6 против CD137 (VL1 MAB-6 против CD137) представляет собой (SEQ ID NO:50) (остатки CDR_L подчеркнуты):

15 EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTKVEIK

[00113] Аминокислотные последовательности CDR_L VL1 MAB-6 против CD137 представляют собой:

CDR_{L1} (SEQ ID NO:51): RASQSVSSNYLS

20 CDR_{L2} (SEQ ID NO:52): GASTRAT

CDR_{L3} (SEQ ID NO:53): QDYDLPWT

b) Деиммунизированные MAB-6 против CD137

[00114] Как описано в примерах ниже, VL-домен MAB-6 против CD137 был деиммунизирован с получением VL-доменов, обозначенных как «VL_x MAB-6 против CD137» и содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54 (остатки CDR_L подчеркнуты):

25 EIVMTQSPAT LSLX₁PGERAT LSCRASQSVS SNYLSWX₂QOX₃ PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTKVEIK

30 где: X₁, X₂ и X₃ выбраны независимо и
где: X₁ представляет собой S или T; X₂ представляет собой F или Y, и X₃
представляет собой I или K.

[00115] Согласно конкретным вариантам реализации изобретения,

35 а) X₁ представляет собой S; X₂ представляет собой Y и X₃ представляет собой K, или

b) X₁ представляет собой S; X₂ представляет собой F и X₃ представляет собой K.

[00116] Аминокислотные последовательности вариантов **VL-доменов MAB-6 против CD137**, обозначенных **VL2 MAB-6 против CD137** и **VL3 MAB-6 против CD137**, представлены ниже. Любой из вариантов VL-доменов может быть спарен с VH-доменом. Молекулы, содержащие конкретные комбинации VH/VL-доменов **MAB-6 против CD137**, названы со ссылкой на конкретные VH/VL-домены, например, молекула, содержащая связывающие домены **VH1 MAB-6 против CD137** и **VL3 MAB-6 против CD137**, конкретно называется «**MAB-6 против CD137 (1.3)**».

10 [00117] Аминокислотная последовательность варианта **VL2 MAB-6 против CD137** представляет собой (**SEQ ID NO:55**) (остатки CDR_L подчеркнуты):

EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWYQQK PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTKVEIK

15 [00118] Аминокислотная последовательность варианта **VL3 MAB-6 против CD137** представляет собой (**SEQ ID NO:56**) (остатки CDR_L подчеркнуты):

EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQK PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTKVEIK

20 [00119] CDR-участки, VL-домен и/или VH-домен любого из таких полностью человеческих доменов и/или вариантов доменов VH и VL **MAB-6 против CD137**, включая любые варианты, встречающиеся в пределах последовательности (последовательностей) VL-доменов генерических **MAB-6 против CD137**, представленных выше, можно использовать для образования антитела, диатела или связывающей молекулы, способной связываться с CD137. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, **CD137-связывающие молекулы** согласно изобретению, включая **CD137 x OA-связывающие молекулы**, содержат **VH1 MAB-6 против CD137** и **VL3 MAB-6 против CD137**.

30 В. Биспецифичные антитела, мультиспецифичные диатела и трехвалентные молекулы

[0001] Как указано выше, природные антитела способны связываться только с одним видом эпитопов, несмотря на то что они могут связываться с множеством копий указанных видов эпитопов. Способность антитела связываться с эпитопом антигена зависит от присутствия и аминокислотной последовательности VL- и
35 VH-доменов антитела. Взаимодействие легкой цепи и тяжелой цепи антитела и,

в частности, взаимодействие его VL- и VH-доменов приводит к образованию одного из двух эпитоп-связывающих доменов природного антитела, такого как IgG. Природные антитела способны связываться только с одним видом эпитопов (т.е. они являются моноспецифичными), несмотря на то что они могут связываться со множеством копий указанного вида эпитопа (т.е. проявляют бивалентность или поливалентность).

[0002] Функциональность антител можно повышать путем создания мультиспецифичных молекул на основе антител, которые могут одновременно связываться с двумя отдельными и различающимися антигенами (или различными эпитопами одного и того же антигена) и/или путем создания молекулы на основе антитела, обладающей более высокой валентностью (т.е. имеющей более двух связывающих доменов) в отношении одного эпитопа и/или антигена.

[00120] Для получения молекул, обладающих более высокой способностью по сравнению с природными антителами, было разработано широкое разнообразие форматов рекомбинантных биспецифичных антител для получения таких биспецифичных антител.

[00121] В большинстве из таких подходов используются линкерные пептиды для слияния дополнительного связывающего домена (например, scFv, VL, VH и т.д.) с коровой структурой антитела или в ее пределах (IgA, IgD, IgE, IgG или IgM) или для слияния множества связывающих частей антитела друг с другом (например, двух Fab-или scFv-фрагментов). В альтернативных форматах используют линкерные пептиды для слияния связывающего белка (например, scFv, VL, VH и т.д.) с доменом димеризации, таким как CH2-CH3-домен или альтернативные полипептиды (WO 2005/070966, WO 2006/107786A WO 2006/107617A, WO 2007/046893). В публикациях международных заявок согласно PCT WO 2013/174873, WO 2011/133886 и WO 2010/136172 описаны мультиспецифичные антитела, в которых CL- и CH1-домены были перемещены из их соответствующих природных положений. В публикациях международных заявок WO 2008/027236 и WO 2010/108127 описаны антитела, в которых VL- и VH-домены были изменены таким образом, чтобы позволить им связываться с более чем одним антигеном. В публикациях международных заявок согласно PCT № WO 2010/028797, WO2010028796 и WO 2010/028795 описаны рекомбинантные антитела, Fc-участки которых были замещены на дополнительные VL- и VH-домены таким образом, чтобы

образовывались трехвалентные связывающие молекулы. В публикациях международных заявок согласно PCT № WO 2003/025018 и WO 2003/012069 описаны рекомбинантные диатела, отдельные цепи которых содержат scFv-домены. В публикации международной заявки согласно PCT № WO 2013/006544 описаны поливалентные молекулы Fab, которые были синтезированы в виде отдельной полипептидной цепи и затем подвержены протеолизу с получением гетеродимерных структур. Таким образом, в молекулах, описанных в указанных документах, всеми или некоторыми из их способностей опосредовать эффекторную функцию жертвуют в пользу способности связываться с дополнительными видами антигена. В международных публикациях заявок на патенты согласно PCT № WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2008/024188, WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 и WO 1991/003493 описано добавление дополнительных связывающих доменов или функциональных групп к антителу или части антитела (например, добавление диатела к легкой цепи антитела, или добавление дополнительных VL- и VH-доменов к легким и тяжелым цепям антитела, или добавление гетерологичного белка слияния, или сцепление множества Fab-доменов друг с другом).

[00122] Согласно уровню техники, также описана возможность получать диатела, которые отличаются от природных антител своей способностью связываться с двумя или более различными видами эпитопов (т.е. проявляют биспецифичность или мультиспецифичность помимо бивалентности или поливалентности (см., например, Hollinger *et al.*; US 2004/0220388 (Mertens *et al.*); Alt *et al.* (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. *et al.* (2005) “A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,” J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; Olafsen, T. *et al.* (2004) “Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications,” Protein Eng Des Sel. 17(1):21-27; Baeuerle, P.A. *et al.* (2009) “Bispecific T cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy,” Cancer Res. 69(12):4941-4944).

[00123] Не моноспецифичные «диатела» обеспечивают значительное преимущество по сравнению с антителами – способность одновременно связывать и сококализовать клетки, которые экспрессируют различные эпитопы. Биспецифичные диатела, таким образом, имеют широкий диапазон применений, включая терапию и

иммунодиагностику. Биспецифичность обеспечивает высокую гибкость дизайна и конструирования диатела для различных применений с обеспечением повышенной avidности в отношении мультимерных антигенов, перекрестного связывания различающихся антигенов и направленного нацеливания на конкретные типы клеток благодаря наличию обоих антигенов-мишеней.

[00124] Для образования таких не моноспецифичных диател требуется успешная сборка двух или более отдельных и различных полипептидов (т.е. для такого образования требуется, чтобы диатела формировались посредством гетеродимеризации полипептидных цепей различных видов). В контексте этой проблемы, в данной области техники был достигнут успех в разработке стабильных ковалентно связанных гетеродимерных не моноспецифичных диател (см., например, Chichili, G.R. *et al.* (2015) “A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates,” *Sci. Transl. Med.* 7(289):289ra82; Veri, M.C. *et al.* (2010) “Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ3 Receptor IIB (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold,” *Arthritis Rheum.* 62(7):1933-1943; Moore, P.A. *et al.* (2011) “Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T cell Killing Of B-Cell Lymphoma,” *Blood* 117(17):4542-4551; публикации патентов США № 2007/0004909; 2009/0060910; 2010/0174053; 20130295121; 2014/0099318; 2015/0175697; 2016/0017038; 2016/0194396; 2016/0200827 и 2017/0247452). Такие диатела содержат два или более ковалентно объединенных полипептидов и включают встраивание одного или более цистеиновых остатков в каждый из используемых видов полипептидов. Например, было показано, что добавление цистеинового остатка к С-концу таких конструкций обеспечивает возможность связывания дисульфидными связями между полипептидными цепями, стабилизирующего полученный гетеродимер без нарушения характеристик связывания бивалентной молекулы.

С. Компоненты репрезентативных CD137 x OA-связывающих молекул согласно настоящему изобретению

[00125] **CD137 x OA-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению состоят из полипептидов и могут состоять из двух, трех, четыре или более четырех полипептидных цепей. Предполагается, что при использовании в настоящей заявке термин «состоит из» является открытым, так что **CD137 x OA-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению, которые состоят из двух полипептидных

цепей, могут содержать дополнительные полипептидные цепи. Такие цепи могут содержать такую же последовательность, что и другая полипептидная цепь связывающей молекулы, или могут отличаться по последовательности от любой другой полипептидной цепи указанной связывающей молекулы.

5 1. **Репрезентативные «линкерные» пептиды**

[00126] Полипептиды **CD137 x OA-связывающих молекул** согласно настоящему изобретению содержат домены, которым предшествуют, за которыми следуют и/или которые связаны друг с другом с помощью «линкерных» пептидов, таких как **линкер 1**, **линкер 2**, **линкер 3** и т.д. Несмотря на то что согласно изобретению используются конкретные специфичные «линкерные» пептиды, с учетом знаний, предложенных в
10 настоящей заявке, альтернативные линкеры можно легко идентифицировать и применять для получения **CD137 x OA-связывающих молекул**.

[00127] Длина **линкера 1**, который разделяет VL- и VH-домены полипептидной цепи, выбрана таким образом, чтобы по существу или полностью предотвращать связывание
15 таких VL- и VH-доменов друг с другом (например, 12 или менее аминокислотных остатков в длину). Таким образом, **VL1-** и **VH2-**домены первой полипептидной цепи по существу или полностью не способны связываться друг с другом и не образуют сайт связывания эпитопа, который по существу способен связываться либо с первым, либо со вторым антигеном. Подобным образом, домены **VL2** и **VH1** второй полипептидной цепи
20 по существу или полностью не способны связываться друг с другом и не образуют сайт связывания эпитопа, который по существу способен связываться либо с первым, либо со вторым антигеном. Репрезентативный промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**) содержит аминокислотную последовательность (**SEQ ID NO:16**): GGGSGGGG, которая является слишком короткой для того, чтобы позволить VL- и VH-доменам одной
25 полипептидной цепи объединяться вместе (в отличие от более длинного промежуточного линкерного пептида, который используется для получения молекул scFv (например, GGGSGGGGSGGGGS (**SEQ ID NO:17**)).

[00128] Одной функцией **линкера 2** является отделение VH-домена полипептидной цепи от необязательно присутствующего домена гетеродимеризации указанной
30 полипептидной цепи. Любой из различных линкеров можно использовать в качестве **линкера 2**. Репрезентативная последовательность такого **линкера 2** содержит аминокислотную последовательность: GGCGGG (**SEQ ID NO:18**), содержащую цистеиновый остаток, который можно использовать для ковалентного связывания

первой и второй полипептидных цепей друг с другом с помощью дисульфидной связи, или ASTKG (SEQ ID NO:19), которая происходит из CH1-домена IgG. Поскольку линкер 2 ASTKG (SEQ ID NO:19) не содержит указанного цистеина, применение такого линкера 2, как правило, связано с применением цистеин-содержащего домена гетеродимеризации, такого как домен E-coil, содержащий последовательность SEQ ID NO:39, или K-coil, содержащий последовательность SEQ ID NO:40 (см. ниже).

[00129] Одной функцией линкера 3 является отделение домена гетеродимеризации полипептидной цепи от Fc-домена указанной полипептидной цепи. Вторая функция заключается в получении цистеин-содержащего домена полипептида. Любой из различных линкеров можно использовать в качестве линкера 3. Репрезентативная последовательность такого линкера 3 содержит аминокислотную последовательность: DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:20). Другая репрезентативная последовательность линкера 3 содержит аминокислотную последовательность: GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:21). Дополнительные репрезентативные последовательности линкера 3 содержат аминокислотную последовательность: LEPKSADKTHTCPPCP (SEQ ID NO:30) или LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:31).

[00130] Одной функцией линкера 4 является отделение C-конца CH2-CH3-доменов Fc-участка («Fc-домен») от N-конца VL-домена. Любой из различных линкеров можно использовать в качестве линкера 4. Репрезентативная последовательность такого линкера 4 содержит аминокислотную последовательность: APSSS (SEQ ID NO:22) или аминокислотную последовательность APSSSPME (SEQ ID NO:23), аминокислотную последовательность GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:24) или аминокислотную последовательность GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:25).

[00131] Содержащие Fc-участок молекулы согласно настоящему изобретению могут содержать дополнительные промежуточные линкерные пептиды (линкеры), в целом, такие линкеры встроены между доменом гетеродимеризации (например, E-coil или K-coil) и CH2-CH3-доменом и/или между CH2-CH3-доменом и вариабельным доменом (т.е. VH или VL). Как правило, дополнительные линкеры содержат 3-20 аминокислотных остатков и могут необязательно содержать весь или часть шарнирного участка IgG (предпочтительно цистеин-содержащую часть шарнирного участка IgG). Линкеры, которые могут применяться в молекулах биспецифичных содержащих Fc-участок диател согласно настоящему изобретению, включают: GGC, GGG, ASTKG (SEQ

ID NO:19), DKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:20**), APSSS (**SEQ ID NO:22**), APSSSPME (**SEQ ID NO:23**), GGGSGGGSGGG (**SEQ ID NO:24**), GGGSGGGSGGG (**SEQ ID NO:25**), LGGGSG (**SEQ ID NO:26**), GGGG (**SEQ ID NO:27**), LEPKSS (**SEQ ID NO:28**), VEPKSADKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:29**), LEPKSADKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:30**) и
5 LEPKSSDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:31**). LEPKSS (**SEQ ID NO:28**) может применяться вместо GGG или GGC для облегчения клонирования. Дополнительно за аминокислотами GGG или LEPKSS (**SEQ ID NO:28**) может непосредственно следовать последовательность DKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:20**) с образованием чередующихся линкеров: GGGDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:21**) и LEPKSSDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:31**).
10 Биспецифичные содержащие Fc-участок молекулы согласно настоящему изобретению могут включать шарнирный участок IgG, такой как шарнирный участок IgG человеческого антитела IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или его часть.

2. Репрезентативные домены гетеродимеризации

[00132] Как указано выше, образование **CD137 х ОА-связывающих молекул**
15 согласно настоящему изобретению включает соединение двух или более различных полипептидных цепей (т.е. гетеродимеризацию). Образование гетеродимеров первой и второй полипептидных цепей можно запускать путем включения «**доменов гетеродимеризации**». Домены гетеродимеризации могут представлять собой домен шарнирного участка IgG (или полипептид, происходящий из шарнирного участка, такой как, например, GVEPKSC (**SEQ ID NO:32**), VEPKSC (**SEQ ID NO:33**)) или AEPKSC (**SEQ ID NO:34**)) на одной полипептидной цепи и CL-домен (или полипептид, происходящий из CL-домена, такой как, например, GFNRGEC (**SEQ ID NO:35**)) или FNRGEC (**SEQ ID NO:36**)) на другой полипептидной цепи (US2007/0004909).

[00133] Альтернативно, домены гетеродимеризации согласно настоящему
25 изобретению содержат тандемно повторяющиеся coil-домены, обладающие противоположным зарядом, например, содержат спиральные домены «E-coil» (**SEQ ID NO:37**: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK), глутаматные остатки которых образуют отрицательный заряд при pH 7, тогда как другие из доменов гетеродимеризации содержат четыре тандемных домена «K-coil» (**SEQ ID NO:38**:
30 KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE), лизиновые остатки которых образуют положительный заряд при pH 7. Присутствие таких заряженных доменов обеспечивает ассоциацию между первым и вторым полипептидами и, таким образом, способствует

гетеродимеризации. Согласно другому варианту реализации изобретения, применяется домен гетеродимеризации, в котором один из четырех тандемных спиральных доменов «E-coil» последовательности **SEQ ID NO:37** был модифицирован таким образом, что указанный домен содержит цистеиновый остаток: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:39). Подобным образом, согласно другому варианту реализации изобретения, используется домен гетеродимеризации, в котором один из четырех тандемных спиральных доменов «K-coil» последовательности **SEQ ID NO:38** был модифицирован таким образом, что указанный домен содержит цистеиновый остаток: KVAACEK-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK (SEQ ID NO:40).

3. Ковалентное связывание полипептидных цепей

[00134] **CD137 x OA-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению конструируют таким образом, чтобы пары их полипептидных цепей ковалентно связывались друг с другом посредством одного или более цистеиновых остатков, расположенных по их длине, с получением ковалентно связанного молекулярного комплекса. Такие цистеиновые остатки можно вводить в промежуточный линкер, который разделяет VL- и VH-домены полипептидов. Необязательно или альтернативно, **линкер 2** или **линкер 3** или альтернативный линкер может содержать цистеиновый остаток. Необязательно или альтернативно, один или более coil-доменов coil-содержащего домена гетеродимеризации содержит аминокислотную замену, которая обеспечивает встраивание цистеинового остатка, как в последовательности **SEQ ID NO:39** или **SEQ ID NO:40**.

4. Репрезентативные Fc-домены

[00135] Fc-домен Fc-содержащей **CD137 x OA-связывающей молекулы** согласно настоящему изобретению может содержать полноразмерный Fc-участок (например, полноразмерный Fc-участок IgG) или только фрагмент полноразмерного Fc-участка. Fc-домен Fc-содержащих **CD137 x OA-связывающих молекул** согласно настоящему изобретению может, таким образом, содержать некоторые или все из CH2-доменов и/или некоторые или все из CH3-доменов полноразмерного Fc-участка или может содержать вариант последовательности CH2- и/или вариант последовательности CH3-домена (который может содержать, например, одну или более инсерций и/или одну или более делеций по сравнению с CH2- или CH3-доменами полноразмерного Fc-участка). Fc-домен биспецифичных Fc-содержащих диател согласно настоящему изобретению может содержать не представляющие собой Fc-фрагмент части полипептида или может

содержать части не природных полноразмерных Fc-участков или может содержать CH2-и/или CH3-домены в не встречающейся в природе ориентации (такие как, например, два CH2-домена, или два CH3-домена, или CH3-домен, связанный с CH2-доменом в направлении от N-конца к C-концу, и т.д.).

5 [00136] Несмотря на то что Fc-домен Fc-содержащей **CD137 х ОА-связывающей молекулы** согласно настоящему изобретению может содержать аминокислотную последовательность природного Fc-домена, может быть желательным, чтобы CH2-CH3-домены, образующие такой Fc-домен, содержали одну или более замен таким образом, чтобы полученный Fc-домен обладал пониженным связыванием (например, обладал

10 менее чем 50%, менее чем 40%, менее чем 30%, менее чем 20% или менее чем 10% от связывания, проявляемого такой молекулой в том случае, если она содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную последовательность природного Fc-участка) или по существу не выявляемым связыванием с FcγRIА (CD64), FcγRIIА (CD32A), FcγRIIВ (CD32B), FcγRIIIА (CD16a) или FcγRIIIВ (CD16b) (по отношению к связыванию,

15 которым обладает Fc-участок дикого типа). Варианты и мутантные формы Fc, способные опосредовать такое измененное связывание, хорошо известны в данной области техники и включают аминокислотные замены в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 234, 235, 265 и 297, где указанная нумерация представляет собой нумерацию по EU-индексу в соответствии с системой

20 нумерации по Kabat (см., например, патент США № 5 624 821). Согласно одному варианту реализации изобретения, CH2-CH3-домен первой и/или третьей полипептидных цепей Fc-содержащих молекул согласно изобретению содержит любую 1, 2, 3 или 4 из замен: L234A, L235A, D265A, N297Q и N297G. Альтернативно, применяется CH2-CH3-домен природного Fc-участка, которому свойственно

25 пониженное (или по существу отсутствующее) связывание с FcγRIIIА (CD16a) и/или сниженная эффекторная функция (по сравнению со связыванием и эффекторной функцией, которой обладает Fc-участок IgG1 дикого типа (**SEQ ID NO:12**)). Согласно конкретному варианту реализации изобретения, Fc-содержащие молекулы согласно настоящему изобретению содержат Fc-участок IgG2 (**SEQ ID NO:13**) или Fc-участок

30 IgG4 (**SEQ ID NO:15**). При использовании Fc-участка IgG4 настоящее изобретение также включает введение стабилизирующей мутации, такой как замена S228P в шарнирном участке, описанная выше (см., например, **SEQ ID NO:11**).

[00137] Согласно репрезентативному варианту реализации изобретения, используемый CH2-CH3-домен IgG1 Fc-содержащих **CD137 x OA-связывающих молекул** согласно настоящему изобретению содержит замену на аланин в положении 234 и замену на аланин в положении 235, где указанная нумерация представляет собой нумерацию по EU-индексу в соответствии с системой нумерации по Kabat (**SEQ ID NO:41**):

10 APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGX

где, X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[00138] Время полужизни в сыворотке крови белков, содержащих Fc-участки, можно увеличивать путем повышения аффинности связывания Fc-участка с FcRn. Термин «время полужизни» при использовании в настоящей заявке означает фармакокинетическое свойство молекулы, которое представляет собой значение среднего времени жизни молекул после их введения. Время полужизни можно выражать как время, требуемое для выведения пятидесяти процентов (50%) известного количества молекулы из организма субъекта (например, пациента, представляющего собой человека, или другого млекопитающего) или его конкретного компартмента, например, путем измерения в сыворотке крови, т.е. время полужизни в кровотоке или в других тканях. В целом, повышение времени полужизни приводит к повышению среднего времени удержания (MRT) в кровотоке вводимой молекулы.

[00139] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, Fc-содержащие **CD137 x OA-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению содержат вариант Fc-участка, где указанный вариант Fc-участка содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с Fc-участком дикого типа, таким образом, что указанная молекула обладает повышенным временем полужизни (по сравнению с молекулой, содержащей Fc-участок дикого типа). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, Fc-содержащие **CD137 x OA-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению содержат вариант Fc-участка IgG, где указанный вариант Fc-участка содержит аминокислотную замену, приводящую к увеличению времени полужизни. Множество аминокислотных замен, способных увеличивать время полужизни Fc-содержащей молекулы, известно в данной области техники, см., например, аминокислотные замены, описанные в патентах США

№ 6 277 375, 7 083 784; 7 217 797, 8 088 376; публикациях патентов США № 2002/0147311; 2007/0148164 и 2011/0081347. Fc-содержащая **CD137 х ОА-связывающая молекула**, обладающая повышенным временем полужизни, может содержать две или более замен, выбранных из: T250Q, M252Y, S254T, T256E, K288D, T307Q, V308P, A378V, M428L, N434A, H435K и Y436I, где указанная нумерация представляет собой нумерацию по EU-индексу в соответствии с системой нумерации по Kabat.

[00140] В частности, используемый CH2-CH3-домен может содержать замены:

- (A) M252Y, S254T и T256E;
- 10 (B) M252Y и S254T;
- (C) M252Y и T256E;
- (D) T250Q и M428L;
- (E) T307Q и N434A;
- (F) A378V и N434A;
- 15 (G) N434A и Y436I;
- (H) V308P и N434A;
- (I) K288D и H435K; или
- (J) M428L и N434S,

где указанная нумерация представляет собой нумерацию по EU-индексу в соответствии с системой нумерации по Kabat.

[00141] Репрезентативная последовательность для CH2- и CH3-доменов содержит тройную аминокислотную замену: M252Y/S254T/T256E (YTE), которая значительно повышает время полужизни в сыворотке крови (Dall'Acqua, W.F. *et al.* (2006) "Properties of Human IgGs Engineered for Enhanced Binding to the Neonatal Fc Receptor (FcRn)," J. Biol. Chem. 281(33):23514-23524), как в последовательности **SEQ ID NO:42** или **SEQ ID NO:43**, которые представляют собой варианты CH2-CH3-домена IgG1, или как в последовательности **SEQ ID NO:44**, которая представляет собой вариант CH2-CH3-домена IgG4:

30 **SEQ ID NO:42:**

APELLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
35 ALHNHYTQKS LSLSPGX

где, X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

SEQ ID NO:43:

5 APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
ALHNHYTQKS LSLSPGX

где, X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

SEQ ID NO:44:

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
5 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE
ALHNNHYTQKS LSLSLGX

где, X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[00142] Изобретение также включает Fc-содержащие **CD137 x OA-связывающие молекулы**, содержащие варианты Fc-доменов, которые обладают измененной
10 эффекторной функцией, измененным временем полужизни в сыворотке крови, измененной стабильностью, измененной чувствительностью к клеточным ферментам или измененной эффекторной функцией по результатам оценки с помощью NK-зависимого или макрофаг-зависимого анализа и т.д. Модификации Fc-домена, идентифицированные как изменяющие эффекторную функцию, известны в данной
15 области техники, включая модификации, которые повышают связывание с активирующими рецепторами (например, FcγRIIA (CD16A)) и снижают связывание с ингибиторными рецепторами (например, FcγRIIB (CD32B)) (см., например, Stavenhagen, J.B. *et al.* (2007) “*Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcγ Receptors*,” *Cancer Res.* 57(18):8882-8890). Репрезентативные варианты Fc-доменов IgG1 человека, обладающие пониженным связыванием с CD32B и/или
20 повышенным связыванием с CD16A, содержат замены L235V, F243L, R292P, Y300L, V305I или P296L. Указанные аминокислотные замены могут присутствовать в Fc-домене IgG1 человека в любой комбинации. Согласно одному варианту реализации изобретения, вариант Fc-домена IgG1 человека содержит замену F243L, R292P и Y300L, где указанная нумерация представляет собой нумерацию по EU-индексу в соответствии с системой нумерации по Kabat. Согласно другому варианту реализации изобретения, вариант Fc-домена IgG1 человека содержит замену F243L, R292P, Y300L, V305I и P296L, где указанная нумерация представляет собой нумерацию по EU-индексу в соответствии с системой нумерации по Kabat. Согласно другому варианту реализации изобретения, вариант Fc-домена IgG1 человека содержит замену L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L, где указанная нумерация представляет собой нумерацию по EU-индексу в соответствии с системой нумерации по Kabat.
25
30

[00143] CH2 и/или CH3-домены **CD137 x OA-связывающих молекул** согласно
35 настоящему изобретению не должны быть идентичными по последовательности и,

предпочтительно, модифицированы таким образом, чтобы обеспечивать гетеродимеризацию между двумя CH2-CH3-содержащими полипептидными цепями. Например, аминокислотная замена (предпочтительно, замена на аминокислоту, содержащую объемную боковую группу, образующую «выступ», например, триптофан) можно вводить в CH2- или CH3-домен таким образом, что стерическое влияние будет предотвращать взаимодействие с доменом, содержащим подобную мутацию, и будет приводить к спариванию мутантного домена с доменом, в который была встроена комплементарная или аккомодирующая мутация, т.е. «впадина» (например, замена на глицин). Такие наборы мутаций можно встраивать в любую пару полипептидов, составляющих молекулу биспецифического Fc-содержащего диатела, и кроме того, указанные мутации можно встраивать в любую часть полипептидных цепей указанной пары. Способы конструирования белка с приоритетной гетеродимеризацией по сравнению с гомодимеризацией хорошо известны в данной области техники, в частности, в контексте конструирования иммуноглобулин-подобных молекул, и включены в настоящую заявку (см., например, Ridgway *et al.* (1996) “‘Knobs-Into-Holes’ Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization,” *Protein Engr.* 9:617-621, Atwell *et al.* (1997) “Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,” *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, Xie *et al.* (2005) “A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis,” *J. Immunol. Methods* 296:95-101; где каждый из указанных документов, таким образом, полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки). Согласно одному варианту реализации изобретения, «выступ» конструируют в CH2-CH3-доменах первой полипептидной цепи и «впадину» конструируют в CH2-CH3-доменах третьей полипептидной цепи. Таким образом, выступ будет способствовать предотвращению гомодимеризации двух молекул первой полипептидной цепи через их CH2- и/или CH3-домены. Поскольку третья полипептидная цепь согласно настоящему варианту реализации содержит замену-«впадину», она будет способна к гетеродимеризации с первой полипептидной цепью, а также к гомодимеризации (однако такая гомодимеризация не приводит к образованию молекулы, содержащей сайты связывания эпитопа). Репрезентативный «выступ» создают путем модификации нативного Fc-домена IgG таким образом, чтобы он содержал модификацию T366W, где указанная нумерация представляет собой нумерацию по EU-индексу в соответствии с системой нумерации по Kabat. Репрезентативную «впадину» создают путем модификации нативного Fc-домена IgG таким образом, чтобы он содержал

модификацию T366S, L368A и Y407V, где указанная нумерация представляет собой нумерацию по EU-индексу в соответствии с системой нумерации по Kabat. Для облегчения очистки гомодимера третьей полипептидной цепи от конечного биспецифичного Fc-содержащего диатела, содержащего гетеродимеры первой и третьей полипептидных цепей, в сайт связывания белка А СН2- и СН3-доменов третьей полипептидной цепи предпочтительно вводят мутации путем аминокислотной замены в положении 435 (H435R), где указанная нумерация представляет собой нумерацию по EU-индексу в соответствии с системой нумерации по Kabat. Таким образом, гомодимер третьей полипептидной цепи не будет связываться с белком А, тогда как правильно собранное биспецифичное Fc-содержащее диатело будет сохранять его способность связываться с белком А через сайт связывания белка А на первой полипептидной цепи.

[00144] SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:146 и SEQ ID NO:147 обеспечивают репрезентативные последовательности для «содержащих «выступ»» СН2- и СН3-доменов, которые могут применяться в **CD137 x OA-связывающих молекулах** согласно настоящему изобретению:

SEQ ID NO:45:

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE
5 WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNNHYTQKS LSLSPGX

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует,

SEQ ID NO:146:

10 APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNNHYTQKS LSLSPGX

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует,

15 **SEQ ID NO:147:**

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSEQED PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE
20 WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNNHYTQKS LSLSLGX

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует,

[00145] **SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:149 и SEQ ID NO:150** обеспечивают репрезентативные последовательности для «содержащих «впадину»» CH2 и CH3-доменов, которые могут применяться в **CD137 x OA-связывающих молекулах**
25 согласно настоящему изобретению:

SEQ ID NO:148:

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE
30 WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNNRYTQKS LSLSPGX

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

SEQ ID NO:149:

35 APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNNRYTQKS LSLSPGX

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

40

SEQ ID NO:150:

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE
5 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE
ALHNRYTQKS LSLSLGX

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[00146] Следует отметить, что CH2-CH3-домены последовательностей **SEQ ID NO:47** и **50** представляют собой домены IgG4, тогда как CH2-CH3-домены последовательностей **SEQ ID NO:45, 146, 148** и **149** представляют собой домены IgG1. Последовательности **SEQ ID NO:45, 146, 148** и **149** содержат замену на аланин в положении 234 и замену на аланин в положении 235 и, таким образом, образуют Fc-домен, который обладает пониженным (или по существу не обладает) связыванием с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) по сравнению со связыванием, которым обладает Fc-участок дикого типа (**SEQ ID NO:12**). Настоящее изобретение конкретно включает **CD137 x OA-связывающие молекулы**, содержащие CH2-CH3-домены из любого класса человеческих IgG, содержащие замены, описанные в настоящей заявке (например, M252Y/S254T/T256E; T366W; T366S/L368A/Y407V и/или H435R). Более того, настоящее изобретение конкретно включает конструкции **CD137 x OA-связывающей молекулы**, в которых отсутствует указанный выше C-концевой лизиновый остаток.

[00147] Согласно варианту реализации изобретения, описанному выше, первая полипептидная цепь содержит содержащую «выступ» последовательность CH2-CH3, такую как последовательность **SEQ ID NO:45, 146** и **147**, и третья полипептидная цепь содержит содержащую «впадину» последовательность CH2-CH3, такую как последовательность **SEQ ID NO: 148, 149** и **150**. Однако, как очевидно, содержащий «впадину» CH2-CH3-домен (например, **SEQ ID NO:48**) может использоваться в первой полипептидной цепи, в этом случае содержащий «выступ» CH2-CH3-домен (например, **SEQ ID NO:45**) будет использоваться в третьей полипептидной цепи.

30 **5. Репрезентативные опухолевые антигены (OA) и репрезентативные переменные домены**

[00148] **CD137 x OA-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере один сайт связывания эпитопа, специфичный в отношении эпитопа опухолевого антигена. Репрезентативные опухолевые антигены («OA»), с которыми могут связываться **CD137 x OA-связывающие молекулы** согласно

настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются указанными, антигены, представленные в **Таблице 1**, на которые ссылаются в настоящей заявке с помощью обычного названия, короткого названия и/или названия гена.

Таблица 1. Репрезентативные опухолевые антигены		
Белковый опухолевый антиген	Название (названия) гена	см., например, UniProtKB ID №
Альфа-N-ацетилгалактозаминид-альфа-2,6-сиалилтрансфераза 6	ST6GALNAC6; CA19-9	Q969X2
5,6-дигидроксииндол-2-карбоновой кислоты оксидаза	TYRP1; gp75	P17643
Молекула клеточной адгезии активированных лейкоцитов	ALCAM; CD166	Q13740
Альфа-1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза	A4GNT	Q9UNA3
В-антиген меланомы 1	BAGE; CT2,1	Q13072
Базигин	BSG; CD147	P35613
В-клеточный ассоциированный с антиген-рецепторным комплексом белок, альфа-цепь	CD79A	P11912
В-клеточный ассоциированный с антиген-рецепторным комплексом белок, бета-цепь	CD79B	P40259
В-клеточный рецептор CD22	BL-CAM; CD22	P20273
Антиген В-лимфоцитов CD19	CD19	P15391
Антиген В-лимфоцитов CD20	MS4A1; CD20	P11836
Антиген стромальных клеток костного мозга 2	BST2; CD317	Q10589
Кэмпас-1 антиген	CD52	P31358
Карбоангидраза 14	CA14	Q9ULX7
Карбоксипептидаза М	CPM	P14384
Связанная с карциноэмбриональным антигеном молекула клеточной адгезии 5	CEACAM5; CD66e	P06731
Связанная с карциноэмбриональным антигеном молекула клеточной адгезии 6	CEACAM6; CD66c	P40199
Катенин бета-1	CTNNB1; бета-катенин	P35222
Антиген CD27	CD27	P26842
Антиген CD276	CD276; B7-H3	Q5ZPR3
Лиганд CD40	CD40LG; CD154	P29965
Антиген клеточной поверхности А33	GPA33	Q99795
Протеогликан хондроитинсульфат 4	CSPG4	Q6UVK1
Член семейства лектиновых доменов С-типа 4 С	CLEC4C; BDCA2; CD303	Q8WTT0

Таблица 1. Репрезентативные опухолевые антигены		
Белковый опухолевый антиген	Название (названия) гена	см., например, UniProtKB ID №
Циклинзависимая киназа 4	CDK4	P11802
Белок цитотоксических Т-лимфоцитов 4	CTLA4	P16410
Содержащий домен дизинтегрина и металлопротеазы белок 9	ADAM-9	Q13443
Рецептор эфрина А-типа 2	EPHA2	P29317
Рецептор эпидермального фактора роста	EGFR; ERBB1; HER1	P00533
Эпителиальная молекула клеточной адгезии	EPCAM; CD326	P16422
G-антиген 1	GAGE1; CT4,1	Q13065
G-антиген 2A	GAGE2A	Q6NT46
G-антиген 2B/C	GAGE2B	Q13066
G-антиген 2D	GAGE2D	Q9UEU5
G-антиген 2E	GAGE2E	Q4V326
G2/митоз-специфичный циклин B1	CCNB1	P14635
GDP-L-фукоза-синтаза	TSTA3	Q13630
Глутамат-карбоксипептидаза 2	FOLH1; PSMA	Q04609
Гиалуронидаза 2	HYLA2; LUCA2	Q12891
Неактивная трансмембранная рецепторная тирозин-протеинкиназа ROR1	ROR1, NTRKR1	Q01973
Интегрин альфа-Е	ITGAE; CD103	P38570
Интегрин бета-6	ITGB6	P18564
Рецептора интерлейкин-13, альфа-2-субъединица (субъединица CD123, рецептора интерлейкина-3)	IL13RA2; CD213a2	Q14627
Рецептор интерлейкина-2, альфа-субъединица	IL2RA: CD25	P01589
Молекула адгезии плотных контактов С	JAM3	Q9BX67
Цитоскелетный кератин II типа 8	CK-8; KRT8	P05787
Лактадгедрин	MFGE8	Q08431
Низкоаффинный рецептор Fc-фрагмента эпсинон-цепи иммуноглобулина	FCER2; CD23	P06734
Белок меланоцитов PMEL	PMEL; gp100	P40967
Меланома антиген recognized by T-cells 1	MLANA; MART1	Q16655
Ассоциированный с меланомой антиген 1	MAGEA1; MAGE1	P43355
Ассоциированный с меланомой антиген 3	MAGEA3; MAGE3	P43357
Меланотрансферрин	MELTF; MAAp97; CD228	P08582
Мембранный кофакторный белок	CD46	P15529
Мезотелин	MSLN	Q13421

Таблица 1. Репрезентативные опухолевые антигены		
Белковый опухолевый антиген	Название (названия) гена	см., например, UniProtKB ID №
Муцин-1	MUC1; PEM	P15941
Муцин-16	MUC16; CA-125	Q8WXI7
Поверхностный антиген миелоидных клеток CD33	CD33	P20138
Neural молекула клеточной адгезии 1	NCAM1; CD56	P13591
Онкостатин-М	OSM	P13725
Онкостатин-М-специфичный рецептор, бета-субъединица	OSMR; IL31RB	Q99650
Гликопротеин тромбоцитов 4	CD36	P16671
Лиганд белка программированной клеточной гибели 1	CD274	Q9NZQ7
Рецептор просапосина GPR37	GPR37	O15354
Специфичный антиген предстательной железы	KLK3; PSA	P07288
Кислая фосфатаза предстательной железы	ACPP	P15309
Белок PML	PML; TRIM19; Myl	P29590
Содержащий PWWP-домен фактор репарации ДНК 3A	PWWP3A; MUM1	Q2TAK8
Рецепторная тирозин-протеинкиназа erbB-2	ERBB2; HER2; CD340	P04626
Рецепторная тирозин-протеинкиназа erbB-3	ERBB3; HER3	P21860
Рецепторная тирозин-протеинкиназа erbB-4	ERBB4; HER4	Q15303
Рецептор-подобная тирозин-протеинфосфатаза C	PTPRC; CD45	P08575
Гликопротеин T-клеточной поверхности CD5	CD5	P06127
Гликопротеин T-клеточной поверхности CD28	CD28	P10747
Рецептор трансферрина 1	TFRC; CD71	P02786
Член 1 семейства трансмембранных белков 4 L6	TM4SF1; TAAL6	P30408
Гликопротеин трофобласта	TPBG; 5T4	Q13641
Член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 10B	TNFRSF10B; DR5; CD262	O14763
Член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 1A	TNFRSF1A; TNFR1; CD120a	P19438
Член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 1B	TNFRSF1B; TNFR2; CD120b	P20333
Член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 3	LTBR; TNFR3	P36941

Таблица 1. Репрезентативные опухолевые антигены		
Белковый опухолевый антиген	Название (названия) гена	см., например, UniProtKB ID №
Член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 5	CD40	P25942
Член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 6	TNFR6; Apo-1; Fas; CD95	P25445
Убиквитин-конъюгирующий фермент E2 К	UBE2K	P61086
Убиквитин-протеин лигаза E3A	UBE3A	Q05086
Фактор роста сосудистого эндотелия А	VEGFA	P15692
Фактор роста сосудистого эндотелия В	VEGFB	P49765
Рецептор фактора роста сосудистого эндотелия 1	FLT1; VEGFR1	P17948
Рецептор фактора роста сосудистого эндотелия 2	KDR; VEGFR2; CD309	P35968
Рецептор фактора роста сосудистого эндотелия 3	FLT4; VEGFR3	P35916
Белок-цинковый палец 354С	ZNF354C; KID3	Q86Y25
Другой опухолевый антиген (антигены)	см., например, ссылку (ссылки)	
3-фукозил-N-ацетиллактозамин	Gooi, H.C. (1983), "Marker of peripheral blood granulocytes and monocytes of man recognized by two monoclonal antibodies VEP8 and VEP9 involves the trisaccharide 3-fucosyl-N-acetylactosamine," <i>Eur. J. Immuno.</i> 13(4):306-12.	
Антиген группы крови А	Gooi, H.C., <i>et al.</i> (1983), "Monoclonal antibody reactive with the human epidermal-growth-factor receptor recognizes the blood-group-A antigen," <i>Biosci. Rep.</i> 3(11):1045-52.	
Дифукозильная цепь 1 типа (ALeb) Дифукозильная цепь 2 типа (ALey)	Dohi, T. <i>et al.</i> (1989), "Immunohistochemical Study of carbohydrate antigen expression in gastric carcinoma," <i>Gastroenterol Jpn.</i> 24(3): 239-45; Yazawa, S. <i>et al.</i> (1993), "Aberrant alpha1-->2Fucosyltransferases Found in Human Colorectal Carcinoma Involved in the Accumulation of Leb and Y Antigens in Colorectal Tumors," <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> 84:989-995	
Ганглиозидный антиген 4.2	Nudelman, E. <i>et al.</i> (1982), "Characterization of a human melanoma-associated ganglioside antigen defined by monoclonal antibody, 4.2," <i>J. Biol. Chem.</i> 257(21): 12752-6	
Ганглиозидный антиген D1.1	Levine, J.M., <i>et al.</i> (1984), "The D1.1 antigen: a cell surface marker for germinal cells of the	

Таблица 1. Репрезентативные опухолевые антигены		
Белковый опухолевый антиген	Название (названия) гена	см., например, UniProtKB ID №
		central nervous system," J. Neurosci. 4(3):820-31
Ганглиозиды GD2/GD3/GM2/GM3		Krengel, U. and Bousquet P.A. (2014), "Molecular Recognition of Gangliosides and Their Potential for Cancer Immunotherapies," Front. Immuno. 5(325):1-11
Лактозилцерамид		Symington, F.W. (1984), "Monoclonal Antibody Specific for Lactosylceramide," J. Biol. Chem. 259(9):6008-6012
Rh-антигены (D, C, c, E или e)		Avent, N.D. and Reid, M.E. (2000), "The Rh blood group system: a review," Blood 95:375-387
Сиалил-Tn		Holmberg, L.A. (2001) "Theratope Vaccine (STn-KLH)," Expert Opin. Biol. Ther. 1(5):881-91

[00149] Антитела, которые распознают **ОА**, известны в данной области техники или могут быть созданы с использованием хорошо известных способов, включая способы, описанные в настоящей заявке. Репрезентативные антитела, которые содержат VL- и VH-домены, способные связываться с **ОА**, последовательности или полипептидные цепи которых могут, таким образом, использоваться при конструировании **CD137 x ОА-связывающих молекул** согласно настоящему изобретению, перечислены в **Таблице 2**. Репрезентативные VH- и VL-домены для антител, связывающихся с несколькими опухолевыми антигенами, представлены ниже.

Таблица 2		
Название антитела	Опухолевый антиген (антигены)	Мишень для терапевтического применения
Абаговомаб	CA-125	Рак яичников
Адекатумумаб	EpCAM	Рак предстательной железы и рак молочной железы
Афугузумаб	CD20	Лимфома
Алацизумаб	VEGFR2	Рак
Альтумомаб	CEA	Рака толстой и прямой кишки
Аматуксимаб	Мезотелин	Рак
Анатумомаб мафенатокс	TAG-72	Немелкоклеточная карцинома легкого
Анифролумаб	Рецептор интерферона А/В	Системная красная волчанка
Анрукинзумаб	IL-13	Рак
Аполизумаб	HLA-DR	Гематологические раковые заболевания
Арцитумомаб	CEA	Желудочно-кишечный рак
Атинумаб	RTN4	Рак
Бектумомаб	CD22	Неходжкинская лимфома (выявление)
Белимумаб	BAFF	Неходжкинская лимфома
Бевацизумаб	VEGF-A	Метастатический рак, ретинопатия недоношенных
Биватузумаб	CD44 V6	Плоскоклеточная карцинома
Блинатумомаб	CD19	Рак
Брентуксимаб	CD30 (TNFRSF8)	Гематологические раковые заболевания
Кантузумаб	MUC1	Раковые заболевания
Кантузумаб мертанзин	Муцин-подобный CanAg	Рак толстой и прямой кишки
Каплацизумаб	VWF	Раковые заболевания
Капромаб	Клетки карциномы предстательной железы	Рак предстательной железы (выявление)
Карлумаб	MCP-1	Онкология/иммунологические показатели
Катумаксомаб	EpCAM, CD3	Рак яичников, злокачественные асцитные опухоли, рак желудка
Цетуксимаб	EGFR	Метастатический рак толстой и прямой кишки и рака головы и шеи
<u>Цитатузумаб</u>	EpCAM	Рак яичников и другие солидные опухоли
Циксутумумаб	Рецептор IGF-1	Солидные опухоли
Кливатузумаб	MUC1	Рак поджелудочной железы
Конатумумаб	TRAIL-R2	Рак

Таблица 2		
Название антитела	Опухолевый антиген (антигены)	Мишень для терапевтического применения
Дацетузумаб	CD40	Гематологические раковые заболевания
Далотузумаб	Рецептор инсулин-подобного фактора роста I	Рак
Даратумумаб	CD38	Рак
Демцизумаб	DLL4	Рак
Денинтузумаб	CD19	Острый лимфобластный лейкоз и В-клеточная неходжкинская лимфома
Детумомаб	В-клеточная лимфома	Лимфома
Дрозитумаб	DR5	Рак
Дулиготумаб	HER3	Рак
Дусигитумаб	ILGF2	Рак
Экромексимаб	Ганглиозид GD3	Злокачественная селанома
Эдреколомаб	ErCAM	Колоректальная карцинома
Элотузумаб	SLAMF7	Множественная миелома
Эльсилимомаб	IL-6	Рак
Энаватузумаб	Рецептор TWEAK	Рак
Энлимомаб	ICAM-1 (CD54)	Рак
Эноблитузумаб	B7-H3	Рак
Энотикумаб	DLL4	Рак
Энзитуксимаб	5AC	Рак
Эпитумомаб цитуксетан	Эписиалин	Рак
Эпратузумаб	CD22	Рак, системная красная волчанка
Эртумаксимаб	HER2, CD3	Рак молочной железы
Этарацизумаб	Интегрин $\alpha_v\beta_3$	Меланома, рак предстательной железы, рак яичников
Фаралимомаб	Рецептор интерферона	Рак
Фарлетузумаб	Рецептор фолата 1	Рак яичников
Фазинумаб	HNGF	Рак
Fbta05 (Bi20)	CD20	Хронический лимфоцитарный лейкоз
Фиклатузумаб	HGF	Рак
Фигитумумаб	Рецептор IGF-1	Адренокортикальная карцинома, немелкоклеточная карцинома легкого
Фланвотумаб	TYRP1 (Гликопротеин 75)	Меланома
Флотетузумаб	CD123	Острый миелоидный лейкоз
Фрезолимумаб	TGF-В	Рак
Футуксимаб	EGFR	Рак
Галиксимаб	CD80	В-клеточная лимфома

Таблица 2		
Название антитела	Опухолевый антиген (антигены)	Мишень для терапевтического применения
Ганитумаб	IGF-I	Рак
Гемтузумаб озогамицин	CD33	Острый миелогенный лейкоз
Гирентуксимаб	Карбоангидраза 9 (CA-IX)	Светлоклеточная почечно-клеточная карцинома
Глембатумумаб ведотин	GPNMB	Меланома, рак молочной железы
Ибритумомаб тиуксетан	CD20	Неходжкинская лимфома
Икрукумаб	VEGFR-1	Рак
Имгатузумаб	EGFR	Рак
Инклакумаб	Селектин Р	Рак
Индатуксимаб равтанзин	SDC1	Рак
Инотузумаб озогамицин	CD22	Рак
Интетумумаб	CD51	Солидные опухоли (рак предстательной железы, меланома)
Ипилимумаб	CD152	Меланома
Иратумумаб	CD30 (TNFRSF8)	Ходжкинская лимфома
Итолизумаб	CD6	Рак
Лабетузумаб	CEA	Рака толстой и прямой кишки
Лампализумаб	CFD	Рак
Лебриклизумаб	ИЛ-13	Ходжкинская лимфома
Лексатумумаб	TRAIL-R2	Рак
Лигелизумаб	IGHE	Рак
Линтузумаб	CD33	Рак
Лирилумаб	KIR2D	Рак
Лорвотузумаб	CD56	Рак
Лукатумумаб	CD40	Множественная миелома, неходжкинская лимфома, ходжкинская лимфома
Лумиликсимаб	CD23	Хронический лимфоцитарный лейкоз
Маратумумаб	TRAIL-R1	Рак
Маргетуксимаб	HER2	HER2-положительный рак
Матузумаб	EGFR	Колоректальный рак, рак легкого и рак желудка
Милатузумаб	CD74	Множественная миелома и другие гематологические злокачественные заболевания
Минретумомаб	TAG-72	Рак
Митумомаб	Ганглиозид GD3	Мелкоклеточная карцинома легкого
Могамулизумаб	CCR4	Рак
Моролимумаб	Резус-фактор	Рак
Моксетумомаб пасудотокс	CD22	Рак
Наколомаб тафенатокс	Антиген C242	Рак толстой и прямой кишки

Таблица 2		
Название антитела	Опухолевый антиген (антигены)	Мишень для терапевтического применения
Намилумаб	CSF2	Рак
Наптумомаб эстафенатокс	5T4	Немелкоклеточная карцинома легкого, почечно-клеточная карцинома
Нарнатумаб	RON	Рак
Накситамаб	GD2	Нейробластома, остеосаркома
Нецитумумаб	EGFR	Немелкоклеточная карцинома легкого
Нерелимомаб	TNF-A	Рак
Несвакумаб	Ангиопоэтин 2	Рак
Нимотузумаб	EGFR	Плоскоклеточная карцинома, рак головы и шеи, назофарингиальный рак, глиома
Ниволумаб	PD-1	Рак
Нофегумомаб мерпентан	Не определен	Рак
Окаратузумаб	CD20	Рак
Офатумумаб	CD20	Хронический лимфоцитарный лейкоз
Оларатумаб	PDGF-R A	Рак
Олокизумаб	IL6	Рак
Омбуртамаб	B7-H3	Нейробластома, саркома, метастатический раковые опухоли мозга
Онартузумаб	Человеческая рецепторная киназа фактора роста гепатоцитов	Рак
Онтуксизумаб	TEM1	Рак
Опортузумаб монатокс	ЕpCAM	Рак
Ореговомаб	CA-125	Рак яичников
Ортикумаб	Oxldl	Рак
Отлертузумаб	CD37	Рак
Панитумумаб	EGFR	Рак толстой и прямой кишки
Панкомаб	Опухоль-специфичное гликозилирование MUC1	Рак яичников
Парсатузумаб	EGFL7	Рак
Патритумаб	HER3	Рак
Пембролизумаб	PD-1	Рак
Пемтумомаб	MUC1	Рак
Перакизумаб	IL17A	Артрит
Пертузумаб	HER2	Рак
Пидилизумаб	PD-1	Рак
Пинатузумаб ведотин	CD22	Рак

Таблица 2		
Название антитела	Опухолевый антиген (антигены)	Мишень для терапевтического применения
Пинтумомаб	Антиген аденокарциномы	Аденокарцинома
Плакулумаб	Человеческий TNF	Рак
Полатузумаб ведотин	CD79B	Рак
Притоксаксимаб	Шигатоксин <i>E. Coli</i> 1 типа	Рак
Притумумаб	Виментин	Рак мозга
Хилизумаб	IGHE	Рак
Ракотумомаб	N-гликолилнейраминовая кислота	Рак
Радретумаб	Экстраклеточный домен фибронектина В	Рак
Рамуцирумаб	VEGFR2	Солидные опухоли
Рилотумумаб	HGF	Солидные опухоли
Ритуксимаб	CD20	Лимфомы, лейкозы, некоторые аутоиммунные расстройства
Робатумумаб	Рецептор IGF-1	Рак
Роледумаб	RHD	Рак
Самализумаб	CD200	Рак
Сатумомаб пендетид	TAG-72	Рак
Церибантумаб	ERBB3	Рак
Сибротузумаб	FAP	Рак
Силтуксимаб	IL-6	Рак
Солитомаб	ЕpCAM	Рак
Сонтузумаб	Эписиалин	Рак
Табалумаб	BAFF	В-клеточные раковые заболевания
Такатузумаб тетраксетан	Альфа-фетопроtein	Рак
Таплитумомаб паптокс	CD19	Рак
Телимомаб	Не определен	Рак
Тенатумомаб	Тенасцин С	Рак
Тенеликсимаб	CD40	Рак
Тепротумумаб	CD221	Гематологические опухоли
Тицилимумаб	CTLA-4	Рак
Тигатузумаб	TRAIL-R2	Рак
Тозитумомаб	CD20	Фолликулярная Лимфома
Товетумаб	CD140a	Рак
Трастузумаб	HER2	Рак молочной железы
Trbs07 (эктомаб)	Gd2	Меланома
Тремелимумаб	CTLA-4	Рак
Тукотузумаб цельмолейкин	ЕpCAM	Рак

Таблица 2		
Название антитела	Опухолевый антиген (антигены)	Мишень для терапевтического применения
Ублитуксимаб	MS4A1	Рак
Урелумаб	4-1BB	Рак
Вадастуксимаб	CD33	Острый миелоидный лейкоз
Вантуктумаб	Рецептор Frizzled	Рак
Вараликсимаб	АОС3 (VAP-1)	Рак
Вателизумаб	ITGA2	Рак
Велтузумаб	CD20	Неходжкинская лимфома
Везенкумаб	NRP1	Рак
Волоциксимаб	Интегрин $\alpha 5\beta 1$	Солидные опухоли
Ворсетузумаб	CD70	Рак
Вотумумаб	Опухолевый антиген СТАА16,88	Колоректальные опухоли
Залутумумаб	EGFR	Плоскоклеточная карцинома головы и шеи
Затуксимаб	HER1	Рак
Зиралимумаб	CD147	Рак
Золбетуксимаб	Cldn18.2	Желудочно-кишечные аденокарциномы и опухоль поджелудочной железы

а) PD-L1-связывающие домены

[00150] PD-L1 (также известный как CD274 и B7-H1), представляет собой трансмембранный белок размером 40 кДа, обычно экспрессируемый на поверхности Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, дендритных клеток, макрофагов и клеток, не представляющих собой клетки крови. Кроме того, аномально высокая экспрессия PD-L1 также наблюдается в опухолевых клетках и считается основным фактором, отвечающим за способность опухолей ускользать от иммунного ответа. Взаимодействие PD-L1 с его рецептором, PD-1, на Т-клетках приводит к активации последующего опосредованного PD-1-рецептором сигнального пути, передающего сигнал, который приводит к подавлению пролиферации Т-клеток, Т-клеточной продукции и высвобождения цитокинов и цитотоксичности. Антитела, которые блокируют взаимодействие PD-L1/PD-1, прерывают PD-1-сигналинг, обращая, таким образом, Т-клеточную супрессию и усиливая эндогенный противоопухолевый иммунитет. **CD137 x OA-связывающие молекулы**, которые связываются с PD-L1, могут одновременно связываться с опухолевыми клетками, экспрессирующими PD-L1, и клетками иммунной системы, экспрессирующими CD137. Без ограничения каким-либо конкретным способом, такая сококализация может приводить к стимуляции клеток иммунной системы, ослабляя или

предотвращая при этом подавление иммунной системы, которое происходит при связывании PD-L1 с PD-1.

[00151] Сайт связывания эпитопа любого антитела против PD-L1 может применяться в соответствии с настоящим изобретением, и идеи настоящего изобретения проиллюстрированы по отношению к опухолевому антигену PD-L1. Репрезентативные антитела, которые связываются с человеческим PD-L1, включают атезолизумаб, авелумаб и дурвалумаб, каждый из которых был недавно одобрен для применения у людей. Атезолизумаб (продаваемый под названием TECENTRIQ®; CAS Reg № 1380723-44-3; см., патент США № 9 873 740) представляет собой гуманизированное моноклонального антитело, содержащее модифицированный IgG1 и константные участки каппа-цепи. Авелумаб (продаваемый под названием BAVENCIO®; CAS Reg № 1537032-82-8; см., патент США № 9 873 740) представляет собой полностью человеческое моноклонального антитело, содержащее IgG1/константные участки лямбда-цепи. Дурвалумаб (продаваемый под названием IMFINZI®; CAS Reg. № 1428935-60-7; см. патент США № 8 779 108) представляет собой полностью человеческое моноклонального антитело, содержащее модифицированный IgG1 и константные участки каппа-цепи. Аминокислотные последовательности полноразмерных тяжелых и легких цепей атезолизумаба (WHO Drug Information, 2015, Recommended INN: List 74, 29(3):387), дурвалумаба (WHO Drug Information, 2015, Recommended INN: List 74, 29(3):393-394) и авелумаба (WHO Drug Information, 2016, Recommended INN: List 74, 30(1):100-101) известны в данной области техники. Также в настоящей заявке предложены дополнительные антитела против PD-L1, включая гуманизированное антитело против PD-L1 «**МАВ-2 против hPD-L1**» и его оптимизированные варианты.

25 (1) МАВ-2 против hPD-L1

[00152] Аминокислотная последовательность VH-домена **МАВ-2 против hPD-L1 (VH1 МАВ-2 против hPD-L1)** представляет собой (**SEQ ID NO:57**) (остатки CDR_H подчеркнуты):

30 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAY
ISIGGGTTY PDTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMN^QSLKTED TAVYYCARQG
LPYYFDYWGQ GTLVTVSS

[00153] Аминокислотная последовательность VL-домена **МАВ-2 против hPD-L1 (VL1 МАВ-2 против hPD-L1)** представляет собой (**SEQ ID NO:58**) (остатки CDR_L подчеркнуты):

DIQMTQSPSS LSASVGDVRT ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYW
ASTRHTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYNTPLETFGQ
GTKVEIK

**(2) Деиммунизированные и оптимизированные МАВ-2
против hPD-L1**

5

[00154] Как описано в Примерах ниже, антитело **МАВ-2 против hPD-L1** было деиммунизировано и оптимизировано с точки зрения связывания и экспрессии с получением вариантов VH-доменов, обозначенных как «**VHx МАВ-2 против hPD-L1**», и VL-доменов, обозначенных как «**VLx МАВ-2 против hPD-L1**». Аминокислотные последовательности конкретных деиммунизированных и оптимизированных вариантов VH- и VL-доменов представлены ниже, дополнительные варианты предложены в Примерах.

10

[00155] Аминокислотная последовательность **VHx МАВ-2 против hPD-L1** представляет собой (**SEQ ID NO:59**) (остатки CDR_H подчеркнуты):

15

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAY
ISIX₄GGTTY PDTVKGRFTI SRDNAKNX₅LY LQMNSLX₆X₇ED TAVYYCARX₈G
LPYYX₉DYWGQ GTLVTVSS

где: X₄, X₅, X₆, X₇, X₈ и X₉ выбраны независимо

и где: X₄ представляет собой G или K; X₅ представляет собой S или T; X₆

20

представляет собой K или R; X₇ представляет собой T; X₈ представляет собой Q; и X₉ представляет собой F или G.

[00156] Согласно конкретным вариантам реализации изобретения:

25

a) X₄ представляет собой G; X₅ представляет собой S; X₆ представляет собой R; X₇ представляет собой A; X₈ представляет собой Q и X₉ представляет собой F;

b) X₄ представляет собой K; X₅ представляет собой S; X₆ представляет собой R; X₇ представляет собой A; X₈ представляет собой Q и X₉ представляет собой G;

30

c) X₄ представляет собой G; X₅ представляет собой S; X₆ представляет собой R; X₇ представляет собой A; X₈ представляет собой A и X₉ представляет собой F;

d) X₄ представляет собой K; X₅ представляет собой S; X₆ представляет собой R; X₇ представляет собой A; X₈ представляет собой A и X₉ представляет собой F;

е) X₄ представляет собой G; X₅ представляет собой S; X₆ представляет собой R; X₇ представляет собой A; X₈ представляет собой A и X₉ представляет собой G; или

5 ф) X₄ представляет собой K; X₅ представляет собой S; X₆ представляет собой R; X₇ представляет собой A; X₈ представляет собой Q и X₉ представляет собой F.

[00157] Аминокислотные последовательности CDR_H **VHx MAB-2 против hPD-L1** представляют собой:

CDR_{H1} (SEQ ID NO:60): SYTMS

10 CDR_{H2} (SEQ ID NO:61): YISIX₄GGTTYYPDTVKG

CDR_{H3} (SEQ ID NO:62): X₈GLPYYX₉DY

где: X₄ представляет собой G или K; X₈ представляет собой Q или X₉ представляет собой F или G

[00158] Аминокислотная последовательность **VLx MAB-2 против hPD-L1** представляет собой (SEQ ID NO:63) (остатки CDR_L подчеркнуты):

DIQMTQSPSS LSASVGDRTVITCKASQDVN X₁₀AVAWYQQKPK GKAPKLLIYW
ASTRHTGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYNTPLTFGQ
GTKVEIK

где: X₁₀ представляет собой E или T.

20 [00159] Согласно конкретному варианту реализации изобретения, X₁₀ представляет собой E.

[00160] Аминокислотные последовательности CDR_{LS} **VLx MAB-2 против PD-L1** представляют собой:

CDR_{L1} (SEQ ID NO:64): KASQDVNX₁₀AVA

25 CDR_{L2} (SEQ ID NO:65): WASTRHT

CDR_{L3} (SEQ ID NO:66): QQHYNTPLT

где: X₁₀ представляет собой E или T.

[00161] Аминокислотные последовательности пяти вариантов VH-домена, обозначенных в настоящей заявке как «**VH2 MAB-2 против hPD-L1**», «**VH3 MAB-2 против hPD-L1**», «**VH4 MAB-2 против hPD-L1**», «**VH5 MAB-2 против hPD-L1**», «**VH6 MAB-2 против hPD-L1**», и одного варианта VL-домена, обозначенного в настоящей заявке как «**VL2 MAB-2 против hPD-L1**», представлены ниже. Любой из вариантов VH-доменов **MAB-2 против hPD-L1**, описанных в настоящей заявке, может быть спарен с любым из **VL-доменов MAB-2 против hPD-L1**. Молекулы, содержащие

конкретные комбинации VH/VL-доменов **MAV-2 против PD-L1** названы со ссылкой на конкретные VH/VL-домены, например, молекула, содержащая связывающие домены **VH3 MAV-2 против PD-L1** и **VL2 MAV-2 против hPD-L1**, конкретно называется «**MAV-2 против PD-L1 (3.2)**». Аминокислотные последовательности вариантов VH- и VL-доменов представлены ниже, замены в CDR-участках по сравнению с VH1 или VL1 подчеркнуты двойной линией.

[00162] Аминокислотная последовательность **VH2 MAV-2 против hPD-L1** представляет собой (**SEQ ID NO:67**) (остатки CDR_H подчеркнуты):

10 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAY
ISIGGGTTY PDTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQG
LPYYFDYWGQ GTLVTVSS

[00163] Аминокислотная последовательность **VH3 MAV-2 против hPD-L1** представляет собой (**SEQ ID NO:68**) (остатки CDR_H подчеркнуты; замены подчеркнуты двойной линией):

15 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAY
ISIKGGTTY PDTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQG
LPYYGDYWGQ GTLVTVSS

[00164] Аминокислотная последовательность **VH4 MAV-2 против hPD-L1** представляет собой (**SEQ ID NO:69**) (остатки CDR_H подчеркнуты; замены подчеркнуты двойной линией):

20 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAY
ISIKGGTTY PDTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARAG
LPYYFDYWGQ GTLVTVSS

[00165] Аминокислотная последовательность **VH5 MAV-2 против hPD-L1** представляет собой (**SEQ ID NO:70**) (остатки CDR_H подчеркнуты):

25 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAY
ISIKGGTTY PDTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARAG
LPYYFDYWGQ GTLVTVSS

[00166] Аминокислотная последовательность **VH6 MAV-2 против hPD-L1** представляет собой (**SEQ ID NO:71**) (остатки CDR_H подчеркнуты):

30 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAY
ISIGGGTTY PDTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARAG
LPYYGDYWGQ GTLVTVSS

[00167] Аминокислотная последовательность **VL2 MAV-2 против hPD-L1** представляет собой (**SEQ ID NO:72**) (остатки CDR_L подчеркнуты):

35 DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCKASQDVN EAVAWYQQKP GKAPKLLIYW
ASTRHTGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYNTPLTFGQ
GTKVEIK

[00168] Следует отметить, что аминокислотные последовательности CDR_{H2}, CDR_{H3} и CDR_{L1} оптимизированных вариантов **МАВ-2 против hPD-L1** отличаются от аминокислотных последовательностей, представленных в исходной молекуле. Различные CDR суммированы ниже, где отличия от VH1 и VL1 подчеркнуты двойной

5 линией:

CDR	Аминокислотная последовательность	Вариант МАВ-2 против hPD-L1
CDR _{H2}	YISIKGGTTYYPDTVKG (SEQ ID NO:73)	VH3/VH4
CDR _{H3}	QGLPYYG [~] DY (SEQ ID NO:74)	VH3
CDR _{H3}	A [~] GLPYYFDY (SEQ ID NO:75)	VH4/VH5
CDR _{H3}	A [~] GLPYYG [~] DY (SEQ ID NO:76)	VH6
CDR _{L1}	KASQDVNEA [~] VA (SEQ ID NO:77)	VL2

[00169] Настоящее изобретение охватывает и конкретно включает **CD137 x PD-L1-связывающие молекулы**, которые содержат VL- и/или VH-домен и/или 1, 2 или все 3 из CDR_L VL-домена и/или 1, 2 или все 3 из CDR_H VH-домена любого из атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба, **МАВ-2 против hPD-L1** и их вариантов или любого из других

10

антител против PD-L1, предложенных в настоящей заявке; и более конкретно, содержат 1, 2 или все 3 из CDR_L VL-домена и/или 1, 2 или все 3 из CDR_H VH-домена таких

b) HER2-связывающие домены

[00170] HER2 представляет собой рецепторный белок массой 185 кДа, который был

15

исходно идентифицирован как продукт онкогена из нейробластом подверженных химической обработке крыс. HER2 интенсивно изучался в связи с его ролью во многих человеческих карциномах, включая рак молочной железы и рак желудка.

[00171] В соответствии с настоящим изобретением, может применяться сайт связывания эпитопа любого антитела против HER2, и идеи настоящего изобретения

20

проиллюстрированы применительно к опухолевому антигену HER2. Репрезентативные антитела, которые связываются с человеческим HER2, включают маргетуксимаб, трастузумаб и пертузумаб. Маргетуксимаб (также известный как MGH22; CAS Reg № 1350624-75-7, см., например, патент США № 8 802 093) представляет собой Fc-

25

оптимизированное моноклональное антитело, которое связывается с HER2 и опосредует повышение активности антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). Трастузумаб (также известный как huMAB4D5 и продаваемый под названием HERCEPTIN®; CAS Reg No 180288-69-1; см., патент США № 5 821 337) представляет собой гуманизованную версию антитела 4D5, содержащую IgG1/константные

участки каппа-цепи. Пертузумаб (также известный как ghuMAB2C4 и продаваемый под названием PERJET®; CAS Reg No 380610-27-5; см., например, публикацию международной заявки WO2001/000245) представляет собой гуманизованную версию антитела 2C4, содержащую IgG1/константные участки каппа-цепи. Аминокислотная последовательность полноразмерных тяжелых и легких цепей маргетуксимаба (WHO Drug Information, 2014, Recommended INN: List 70, 28(1):93-94) и трастузумаба (см. WHO Drug Information, 2011, Recommended INN: List 65, 25(1):89-90 для трастузумаба эмтанзина) и Fab-домена пертузумаба (номер доступа в базе данных белков 117i) известны в данной области техники. Дополнительные антитела против HER2, включая MAB-1 против HER2 и его гуманизированные варианты, также предложены в настоящей заявке.

(1) MAB-1 против hHER2

[00172] Антитело **MAB-1 против hHER2** представляет собой гуманизованное моноклональное антитело против HER2, которое связывается с эпитопом HER2, отличным от эпитопа, распознаваемого маргетуксимабом, трастузумабом и пертузумабом (см., например, публикацию международной заявки WO 2018/156740).

[00173] Аминокислотная последовательность VH-домена гуманизованного антитела (**MAB-1 против hHER2 VHx**) представляет собой (**SEQ ID NO:78**) (остатки CDR_H подчеркнуты):

20 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTNIGEPTY TEEFKGRVTM TRDTSISTAY MELSRLRSDD TAVYYCARDX₁
X₂YGNRVSYWG QGTLVTVSS

где: X₁ представляет собой D или E, и X₂ представляет собой G или I

[00174] Аминокислотная последовательность VL-домена такого гуманизованного антитела (**MAB-1 против hHER2 VLx**) представляет собой (**SEQ ID NO:79**) (остатки CDR_L подчеркнуты):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCKASQDIX₃ X₄YLSWFQQKP GKAPKTLIYR
ANRLX₅X₆GVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCLQ HDEFPWTFGQ
GTKLEIK

30 где: X₃ представляет собой N или S; X₄ представляет собой S, T или N; X₅ представляет собой V или Q, и X₆ представляет собой D, E или S

[00175] Были выделены три варианта VH-доменов **MAB-1 против hHER2**: **VH1 MAB-1 против hHER2**, **VH2 MAB-1 против hHER2** и **VH3 MAB-1 против hHER2**. Аминокислотные последовательности таких вариантов VH-доменов **MAB-1 против hHER2** представлены ниже.

[00176] Аминокислотная последовательность **VH1 MAB-1 против hHER2** представляет собой (**SEQ ID NO:80**) (остатки CDR_H подчеркнуты; следует отметить, что второй и третий остатки CDR_{H3} представляют собой D и G соответственно):

5 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTNIGEPTY TEEFKGRVTM TRDTSISTAY MELSRLRSDD TAVYYCARDD
GYGNRVSYWG QGTLVTVSS

[00177] Аминокислотная последовательность **VH2 MAB-1 против hHER2** представляет собой (**SEQ ID NO:81**) (остатки CDR_H подчеркнуты; следует отметить, что второй и третий остатки CDR_{H3} представляют собой E и G соответственно):

10 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTNIGEPTY TEEFKGRVTM TRDTSISTAY MELSRLRSDD TAVYYCARDE
GYGNRVSYWG QGTLVTVSS

[00178] Аминокислотная последовательность **VH3 MAB-1 против hHER2** представляет собой (**SEQ ID NO:82**) (остатки CDR_H подчеркнуты; следует отметить, что второй и третий остатки CDR_{H3} представляют собой D и I, соответственно):

15 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTNIGEPTY TEEFKGRVTM TRDTSISTAY MELSRLRSDD TAVYYCARDD
IYGNRVSYWG QGTLVTVSS

[00179] Были выделены три варианта **VL-доменов MAB-1 против hHER2**: **VL1 MAB-1 против hHER2**, **VL2 MAB-1 против hHER2** и **VL3 MAB-1 против hHER2**. Аминокислотные последовательности таких вариантов **VL-доменов MAB-1 против hHER2** представлены ниже.

[00180] Аминокислотная последовательность **VL1 MAB-1 против hHER2** представляет собой (**SEQ ID NO:83**) (остатки CDR_L подчеркнуты; следует отметить, что седьмой и восьмой остатки CDR_{L1} представляют собой N и S соответственно и седьмой и восьмой остатки CDR_{L2} представляют собой V и D, соответственно):

25 DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCKASQDIN SYLSWFQQKP GKAPKTLIYR
ANRLVDGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCLQ HDEFPWTFGQ
GTKLEIK

[00181] Аминокислотная последовательность **VL2 MAB-1 против hHER2** представляет собой (**SEQ ID NO:84**) (остатки CDR_L подчеркнуты; следует отметить, что седьмой и восьмой остатки CDR_{L1} представляют собой N и T соответственно и седьмой и восьмой остатки CDR_{L2} представляют собой V и E соответственно):

35 DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCKASQDIN TYLSWFQQKP GKAPKTLIYR
ANRLVEGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCLQ HDEFPWTFGQ
GTKLEIK

[00182] Аминокислотная последовательность **VL3 MAB-1 против hHER2** представляет собой (**SEQ ID NO:85**) (остатки CDR_L подчеркнуты; следует отметить, что седьмой и восьмой остатки CDR_{L1} представляют собой S и N соответственно и шестой и седьмой остатки CDR_{L2} представляют собой Q и S соответственно):

5 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIS NYLSWFQQKP GKAPKTLIYR
ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCLQ HDEFPWTFGQ
 GTKLEIK

[00183] Могут применяться любые из таких гуманизованных VH- и VL-доменов **MAB-1 против hHER2**, включая любые указанные VH- и VL-домены, содержащиеся в генерической последовательности (последовательностях) VH- и/или VL-доменов **MAB-1 против hHER2**, представленных выше, с образованием антитела, диатела или связывающей молекулы, способной связываться с Her2.

(2) Другие HER2-связывающие домены

[00184] Помимо идентифицированных выше HER2-связывающих доменов согласно изобретению рассматривается применение любого из сайтов связывания эпитопа любого из следующих Her-2-связывающих доменов: **1.44.1; 1.140; 1.43; 1.14.1; 1.100.1; 1.96; 1.18.1; 1.20; 1.39; 1.24** и **1.71.3** (патенты США № 8 350 011; 8 858 942 и публикация международной заявки на патент согласно PCT 2008/019290); **F5** и **C1** (патенты США № 7 892 554; 8 173 424; 8 974792 и публикация международной заявки на патент согласно PCT 99/55367); а также связывающих доменов антитела против HER2 согласно публикациям патентов США 2011/0097323, 2013/017114, 2014/0328836, 2016/0130360 и 2016/0257761 и публикации международной заявки на патент согласно PCT 2011/147986).

[00185] Настоящее изобретение охватывает и конкретно включает **CD137 x HER2-связывающие молекулы**, которые содержат VL- и/или VH-домен и/или 1, 2 или все 3 из CDR_L VL-домена и/или 1, 2 или все 3 из CDR_H VH-домена любого из маргетуксимаба, трастузумаба, пертузумаба, MAB-1 против hHER2 или любого из других антител против HER2, предложенных в настоящей заявке; и более конкретно, содержат 1, 2 или все 3 из CDR_L VL-домена и/или 1, 2 или все 3 из CDR_H VH-домена таких моноклональных антител против HER2.

с) EphA2-связывающие домены

[00186] Рецепторная тирозинкиназа, эфриновый рецептор 2 типа A (**EphA2**), в норме экспрессируется в сайтах межклеточных контактов во взрослых эпителиальных тканях,

однако недавние исследования показали, что ее гиперэкспрессия также наблюдается в различных типах эпителиальных карцином, при этом максимальный уровень экспрессии EphA2 наблюдается в метастатических поражениях. Высокий уровень экспрессии EphA2 был обнаружен в широком диапазоне раковых опухолей и в многочисленных
5 опухолевых клеточных линиях, включая рак предстательной железы, рак молочной железы, немелкоклеточный рак легкого и меланому. EphA2, по-видимому, не просто является маркером рака, а постоянно гиперэкспрессируется и находится в функционально измененном состоянии, по всей видимости, во множестве типов рака человека. Сайт связывания эпитопа любого антитела против EphA2 может применяться
10 в соответствии с настоящим изобретением. Ниже представлены несколько репрезентативных антител против EphA2, которые могут применяться для создания молекул согласно настоящему изобретению.

(1) МАВ-1 против EphA2

[00187] Антитело **МАВ-1 против EphA2** представляет собой мышинное
15 моноклональное антитело против EphA2. Аминокислотная последовательность VH-домена **МАВ-1 против EphA2** представляет собой (**SEQ ID NO:86**) (остатки CDR подчеркнуты):

QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSL RYSVHWVRQP PGKGLEWLGM
IWGGGSTDYN SALKSRLS ПРЕДСТАВЛЯЕТ СОБОЙ KDNSKSQVFL
20 KMNSLQTTDDT AMYVCARKHG NYVTMDYWGQ GTSVTVSS

[00188] Аминокислотная последовательность VL-домена **МАВ-1 против EphA2** представляет собой (**SEQ ID NO:87**) (остатки CDR подчеркнуты):

DIQMTQTSS LSASLGDRIT ISCRASQDIS NYLNNWYQOKP DGTVKLLIYY
TSRLHSGVPS RFGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GYTLYTFGGG
25 TKLEIK

(2) МАВ-2 против EphA2

[00189] Антитело **МАВ-2 против EphA2** представляет собой мышинное
30 моноклональное антитело против EphA2. Аминокислотная последовательность VH-домена **МАВ-2 против EphA2** представляет собой (**SEQ ID NO:88**) (остатки CDR подчеркнуты):

QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGFTFT NYGMNWVKQA PGKGLKWMGW
INTYIGEPY ADDFKGRFV SLETSASTAY LQINNLKNE MATYFCAREL
GPYYFDYWGQ GTTLTVSS

[00190] Аминокислотная последовательность VL-домена **МАВ-2 против EphA2**
35 представляет собой (**SEQ ID NO:89**) (остатки CDR подчеркнуты):

DVVMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSSGNTYLHW YLQKPGQSPK
LLIYKVS~~NR~~F SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFC~~SQ~~STHVP
~~TF~~SGGTKLEI K

(3) МАВ-3 против EphA2

5 [00191] Антитело **МАВ-3 против EphA2** представляет собой мышинное моноклональное антитело против EphA2. Аминокислотная последовательность VH-домена **МАВ-3 против EphA2** представляет собой (SEQ ID NO:90) (остатки CDR подчеркнуты):

10 EVQLVESGGG SVKPGGSLKL SCAASGFTFT DHYMYWVRQT PEKRLEWVAT
ISDGGSFTSY PDSVKGRFTI SRDIAKNNLY LQMSSLKSED TAMYYCTRDE
SDRPFPYWGQ GTLVTVSS

[00192] Аминокислотная последовательность VL-домена **МАВ-3 против EphA2** представляет собой (SEQ ID NO:91) (остатки CDR подчеркнуты):

15 DIVLTQSHRS MSTSVGDRVN ITCKASQDVT TAVAWYQQKP GQSPKLLIFW
ASTRHAGVPD RFTGSGSGTD FTLTISSVQA GDLALYYCQQ HYSTPYTFGG
GTKLEIK

(4) Другие EphA2-связывающие домены

[00193] Помимо идентифицированных выше EphA2-связывающих доменов согласно изобретению рассматривается применение любого из сайтов связывания эпитопа
20 любого из следующих антител против EphA2: **SPL1**, **LUCA19**, **SG5** или **LUCA40** (см. публикацию международной заявки на патент согласно PCT 2006/084226); **B13** (см. патент США № 7 101 976); **D7** (см. патент США № 7 192 698); **B-233** и **EA2** (см. публикацию международной заявки на патент согласно PCT 2003/094859).

[00194] Настоящее изобретение охватывает и конкретно включает **CD137 x EphA2-**
25 **связывающие молекулы**, которые содержат VL- и/или VH-домен и/или 1, 2 или все 3 из CDR_L VL-домена и/или 1, 2 или все 3 из CDR_H VH-домена моноклональных антител против EphA2 **МАВ-1** против EphA2, **МАВ-2** против EphA2 или **МАВ-3** против EphA2.

d) 5T4-связывающие домены

[00195] Онкофетальный белок, **5T4**, представляет собой опухоль-ассоциированный
30 белок, экспонируемый на мембране клеток многих карцином, включая карциному почки, толстой кишки, предстательной железы, легкого, а также при остром лимфобластном лейкозе. Сайт связывания эпитопа любого антитела против 5T4 может применяться в соответствии с настоящим изобретением. Ниже представлены два репрезентативных антитела против 5T4 – гуманизированное «**МАВ-1 против 5T4**» и
35 мышинное «**МАВ-2 против 5T4**». Дополнительные антитела против 5T4 описаны в

данной области техники (см., например, патенты США № 8 084 249; 8 409 577; 8 759 495; 8 409 577; публикации международных заявок на патенты согласно PCT № WO 2013/041687; WO 2014/137931; WO 2016/022939).

(1) **МAB-1 против 5Т4**

5 [00196] Аминокислотная последовательность VH-домена **МAB-1 против 5Т4** представляет собой (**SEQ ID NO:92**) (остатки CDR подчеркнуты):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SFWMHWVRQA PGQGLEWMGR
IDPNRGGTEY NEKAKSRVTM TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAGN
PYYPMDYWGQ GTTVTVSS

10 [00197] Аминокислотная последовательность VL-домена **МAB-1 против 5Т4** представляет собой (**SEQ ID NO:93**) (остатки CDR подчеркнуты):

DIQMTQSPSS LSASVGDRV ITCRASQGIS NYLAWFQQKP GKAPKSLIYR
ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISLQF EDVATYYCLQ YDDFPWTFGQ
GTKLEIK

15

(2) **МAB-2 против 5Т4**

[00198] Аминокислотная последовательность VH-домена **МAB-2 против 5Т4** представляет собой (**SEQ ID NO:94**) (остатки CDR подчеркнуты):

20 QVQLQQPGAE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYWITWVKQR PGQGLEWIGD
IYPGSGRAN NEKFKSKATL TVDTSSSTAY MQLSSLTSED SAVYNCARYG
PLFTTVVDPN SYAMDYWGQG TSVTVSS

[00199] Аминокислотная последовательность VL-домена **МAB-2 против 5Т4** представляет собой (**SEQ ID NO:95**) (остатки CDR подчеркнуты):

25 DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSI YSNGNTYLEW YLQKPGQSPK
LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSQTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHP
FTFGSGTKLE IK

30 [00200] Настоящее изобретение охватывает и конкретно включает **CD137 x 5Т4-связывающие молекулы**, которые содержат VL- и/или VH-домен и/или 1, 2 или все 3 из CDR_L VL-домена и/или 1, 2 или все 3 из CDR_H VH-домена моноклональных антител против 5Т4 МAB-1 против 5Т4 или МAB-2 против 5Т4 или любого из антител против 5Т4, предложенных в публикациях международных заявок WO 2007/106744; WO 2013/041687 или WO 2015/184203.

е) В7-Н3-связывающие домены

35 [00201] В7-Н3 представляет собой опухолевый антиген, гиперэкспрессия которого наблюдается в широком разнообразии типов солидных опухолей и который является членом семейства В7 молекул, вовлеченных в иммунную регуляцию. В частности,

несколько независимых исследований показали, что в человеческих злокачественных опухолевых клетках (например, опухолевых клетках нейробластом и рака желудка, яичников и немелкоклеточного рака легкого) наблюдается значительное повышение экспрессии белка В7-Н3 и что это повышение экспрессии было связано с повышением тяжести заболевания, что указывает на то, что В7-Н3 используется опухолями в качестве пути ускользания от иммунного ответа.

[00202] Сайт связывания эпитопа любого антитела против В7-Н3 может применяться в соответствии с настоящим изобретением. Одно репрезентативное гуманизованное антитело, которое связывается с человеческим В7-Н3, представляет собой «эноблитузумаб». Эноблитузумаб (также известный как MGA271; CAS Reg № 1353485-38-7; см., например, патент США № 8 802 091) представляет собой Fc-оптимизированное моноклональное антитело, которое связывается с В7-Н3 и опосредует усиление активности АЗКЦ. Аминокислотные последовательности полноразмерных тяжелой и легкой цепей эноблитузумаба (WHO Drug Information, 2017, Recommended INN: List 77, 31(1):149) известны в данной области техники. Представлены дополнительные репрезентативные антитела против В7-Н3.

(1) hBRCA69D

[00203] Репрезентативные VH- и VL-домены гуманизованного антитела против В7-Н3 «hBRCA69D» представлены ниже. Два гуманизованных VH-домена, VH1 hBRCA69D и VH2 hBRCA69D; и два гуманизованных VL-домена VL1 hBRCA69D и VL2 hBRCA69D, которые могут применяться в любой комбинации VH/VL с получением функционального гуманизованного связывающего домена, представлены ниже.

[00204] Аминокислотная последовательность VH-домена VH1 hBRCA69D представляет собой (SEQ ID NO:96) (остатки CDR_H подчеркнуты):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMQWVRQA PGQGLEWMGT
IYPGDGDTRY TQKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARRG
I PRLWYFDVW GQGTTVTVSS

[00205] Аминокислотная последовательность VH-домена VH2 hBRCA69D представляет собой (SEQ ID NO:97) (остатки CDR_H подчеркнуты):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMQWVRQA PGQGLEWMGT
IYPGGGDTRY TQKFQGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARRG
I PRLWYFDVW GQGTTVTVSS

[00206] Аминокислотная последовательность VL-домена **VL1 hBRCA69D** представляет собой (**SEQ ID NO:98**) (остатки CDR_L подчеркнуты).

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCCRASQDIS NYLNWYQQK GKAPKLLIYY
TSRLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG
5 GTKLEIK

[00207] Аминокислотная последовательность VL-домена **VL2 hBRCA69D** представляет собой (**SEQ ID NO:99**) (остатки CDR_L подчеркнуты).

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCCRASQSIS SYLNWYQQK GKAPKLLIYY
TSRLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG
10 GTKLEIK

(2) hPRCA157

[00208] Другое репрезентативное гуманизованное антитело против B7-H3 представляет собой «**hPRCA157**». Аминокислотная последовательность VH-домена **VH1 hPRCA157** представляет собой (**SEQ ID NO:100**) (остатки CDR_H подчеркнуты):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT
INSGGSNTYY PDSLKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHD
GGAMDYWGQG TTVTSS

[00209] Аминокислотная последовательность VL-домена **VL1 hPRCA157** представляет собой (**SEQ ID NO:101**) (остатки CDR_L подчеркнуты):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASESIY SYLAWYQQK GKAPKLLVYN
TKTLPEGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYGTPPWTFG
20 QGTRLEIK

(3) Другие B7-H3-связывающие домены

[00210] Помимо идентифицированных выше B7-H3-связывающих доменов согласно
25 изобретению рассматривается применение любого из сайтов связывания эпитопа
любого из следующих антител против B7-H3: **LUCA1; BLA8; PA20** или **SKN2** (см.
патенты США № 7 527 969; 8 779 098 и публикацию международной заявки на патент
согласно РСТ 2004/001381); **M30; cM30; M30-H1-L1; M30-H1-L2; M30-H1-L3; M30-
H1-L4; M30-H1-L5; M30-H1-L6; M30-H1-L7; M30-H4-L1; M30-H4-L2; M30-H4-L3** и
30 **M30-H4-L4** (см. публикацию патента США 2013/0078234 и публикацию
международной заявки на патент согласно РСТ 2012/147713) и **8H9** (см. патенты США
№ 7 666 424; 7 737 258; 7 740 845; 8 148 154; 8 414 892; 8 501 471; 9 062 110; публикацию
патента США 2010/0143245 и публикацию международной заявки на патент согласно
РСТ 2008/116219).

35 [00211] Настоящее изобретение охватывает и конкретно включает **CD137 x B7-H3-
связывающие молекулы**, которые содержат VL- и/или VH-домен и/или 1, 2 или все 3

из CDR_L VL-домена и/или 1, 2 или все 3 из CDR_H VH-домена любого из гуманизованного **BRCA69D**, **PRCA157**, гуманизованного **PRCA157** или эноблитузумаба или любого из других антител против В7-Н3, предложенных в настоящей заявке; и более конкретно, содержат 1, 2 или все 3 из CDR_L VL-домена и/или
5 1, 2 или все 3 из CDR_H VH-домена таких моноклональных антител против В7-Н3.

f) GrA33-связывающие домены

[00212] Трансмембранный гликопротеин А33 (**grA33**) массой 43 кДа экспрессируется в >95% всех колоректальных карцином. Сайт связывания эпитопа любого антитела против grA33 может применяться в соответствии с настоящим изобретением.
10 Репрезентативное гуманизованное антитело против grA33 («**МАВ-1 против grA33**») представлено ниже.

[00213] Аминокислотная последовательность VH-домена **МАВ-1 против grA33** представляет собой (**SEQ ID NO:102**) (остатки CDR подчеркнуты):

15 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GSWMNWVRQA PGQGLEWIGR
IYPGDGE TNY NGKFKDRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARIIY
GNNVYFDVWG QGTTVTVSS

[00214] Аминокислотная последовательность VL-домена **МАВ-1 против grA33** представляет собой (**SEQ ID NO:103**) (остатки CDR подчеркнуты):

20 DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCSARSS ПРЕДСТАВЛЯЕТ СОБОЙ
FMYWYQQKPG KAPKLLIYDT SNLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTSSLEAE
DAATYYCQQW SSYPLTFGQG TKLEIK

[00215] Настоящее изобретение охватывает и конкретно включает **CD137 x grA33 связывающие молекулы**, которые содержат VL- и/или VH-домен и/или 1, 2 или все 3 из CDR_L VL-домена и/или 1, 2 или все 3 из CDR_H VH-домена моноклональных антител
25 против grA33 МАВ-1 против grA33 или любого из моноклональных антител против grA33, представленных в публикации международной заявки WO 2015/026894.

g) CEACAM5- и CEACAM6-связывающие домены

[00216] Было обнаружено, что связанные с карциноэмбриональным антигеном молекулы клеточной адгезии 5 (CEACAM5) и 6 (CEACAM6) связаны с различными
30 типами рака, включая медуллярный рак щитовидной железы, рак толстой и прямой кишки, рак поджелудочной железы, гепатоклеточную карциному, рак желудка, рак легкого, рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак матки, рак эндометрия, рак молочной железы, рак кроветворной ткани, лейкоз и рак яичников и, в частности, колоректальный рак, желудочно-кишечный рак, рак поджелудочной

железы, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), карциномы молочной железы, щитовидной железы, желудка, яичников и матки. Сайт связывания эпитопа любого антитела против CEACAM5/CEACAM6 может применяться в соответствии с настоящим изобретением. Репрезентативные антитела против CEACAM5/CEACAM6 представлены

5 ниже.

(1) 16C3

[00217] Аминокислотная последовательность VH-домена гуманизированного антитела против CEACAM5/CEACAM6 **16C3** (заявка на европейский патент 2585476) представляет собой (**SEQ ID NO:104**) (остатки CDR подчеркнуты):

10 QVQLQQSGPE VVRPGVSVKI SCKGSGYTFT DYAMHWVKQS HAKSLEWIGL
ISTYSGDTKY NQNFK GKATM TVDKSASTAY MELSSLRSED TAVYYCARGD
YSGSRYWFAY WGQGTLLVTVS S

[00218] Аминокислотная последовательность VL-домена гуманизированного антитела против CEACAM5/CEACAM6 **16C3** (заявка на европейский патент 2585476) представляет собой (**SEQ ID NO:105**) (остатки CDR подчеркнуты):

15 DIQMTQSPSS LSASVGDVRT ITCGASENIY GALNWYQRKP GKSPKLLIWG
ASNLADGMPS RFGSGSGRQ YTLTISSLQP EDVATYYCQN VLSSPYTFGG
GTKLEIK

(2) hMN15

20 [00219] Аминокислотная последовательность VH-домена гуманизированного антитела против CEACAM5/CEACAM6 **hMN15** (патент США 8 287 865) представляет собой (**SEQ ID NO:106**) (остатки CDR подчеркнуты):

25 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCSSSGFALT DYYMSWVRQA PGKGLEWLGF
IANKANGHTT DYSPSVKGRF TISRDN SKNT LFLQMDSLRP EDTGVYFCAR
DMGIRWNFDV WGQGTLPVTVS S

[00220] Аминокислотная последовательность VL-домена гуманизированного антитела против CEACAM5/CEACAM6 **hMN15** (патент США 8 287 865) представляет собой (**SEQ ID NO:107**) (остатки CDR подчеркнуты):

30 DIQLTQSPSS LSASVGDVRT MTCSASSRVS YIHWYQQKPG KAPKRWIYGT
STLASGVPAR FSGSGSGTDF TFTISSLQPE DIATYYCQOW SYNPPTFGQG
TKVEIKR

[00221] Настоящее изобретение охватывает и конкретно включает **CD137 x CEACAM5/CEACAM6-связывающие** молекулы, которые содержат VL- и/или VH-домен и/или 1, 2 или все 3 из CDR_L VL-домена и/или 1, 2 или все 3 из CDR_H VH-домена

35 моноклональных антител против CEACAM5/CEACAM6 **16C3** или **hMN15**.

h) CD19-связывающие домены

[00222] CD19 (поверхностный антиген В-лимфоцитов В4, номер доступа в базе данных Genbank M28170) представляет собой компонент В-клеточного рецепторного комплекса (BCR) и является положительным регулятором В-клеточного сигнального пути, который регулирует порог активации В-клеток и гуморального иммунитета. CD19 является одним из наиболее повсеместно экспрессируемых антигенов в В-клеточной линии и экспрессируется в >95% В-клеточных злокачественных заболеваний, включая острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) и неходжкинскую лимфому (НХЛ). Следует отметить, что экспрессия CD19 поддерживается в В-клеточных лимфомах, которые приобрели устойчивость к терапии антителами против CD20. Предполагалось, что CD19 также является мишенью для лечения аутоиммунных заболеваний.

[00223] Сайт связывания эпитопа любого антитела против CD19 может применяться в соответствии с настоящим изобретением. Репрезентативное гуманизованное антитело, которое связывается с человеческим CD19 и которое может использоваться согласно настоящему изобретению, представляет собой гуманизованное антитело против CD19, описанное в публикации международной заявки WO 2016/048938 (называемое в настоящей заявке «CD19 MAB-1»).

[00224] Аминокислотная последовательность VH-домена **CD19 MAB-1** представляет собой (**SEQ ID NO:108**) (остатки CDR_H подчеркнуты):

QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSL TSGMGVGWIR QPPGKALEWL
AHIWDDDKR YNPALKSRILT ISKDTSKNQV FLTMTNMDPV DTATYYCARM
ELWSYYFDYW GQGTTVTSS

[00225] Аминокислотная последовательность VL-домена **CD19 MAB-1** представляет собой (**SEQ ID NO:109**) (остатки CDR_L подчеркнуты):

ENVLTQSPAT LSVTPGEKAT ITCCRASQSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDA
SNRASGVPSR FSGSGGTDH TLTISSEAE DAATYYCFQG SVYPFTFGQ
TKLEIK

[00226] Настоящее изобретение охватывает и конкретно включает **CD137 x CD19-связывающие молекулы**, которые содержат VL- и/или VH-домен и/или 1, 2 или все 3 из CDR_L VL-домена и/или 1, 2 или все 3 из CDR_H VH-домена моноклонального антитела против CD19 MAB-1 против CD19 или любого из антител против CD19, описанных в патенте США № 7 112 324, или представленных в блинатумомабе (BLINCYTO®; аминокислотную последовательность можно найти в источнике WHO Drug Information,

2009, Recommended INN: List 62, 23(3):240-241) и дувортуксизумабе (также называемый MGD011; аминокислотную последовательность можно найти в источнике WHO Drug Information, 2016, Proposed INN: List 116, 30(4):627-629).

i) CD123-связывающие домены

5 [00227] CD123 (рецептор интерлейкина 3) содержит одну альфа-цепь, IL-3Ra, которая представляет собой молекулу массой 40 кДа. Интерлейкин 3 (IL-3) запускает раннюю дифференцировку мультипотентных стволовых клеток в эритроидные, миелоидные и лимфоидные клетки-предшественники. Сообщалось, что CD123 гиперэкспрессируется на злокачественных клетках в широком диапазоне злокачественных заболеваний системы крови, включая острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и миелодиспластический синдром (МДС). Гиперэкспрессия CD123 связана с более плохим прогнозом при ОМЛ.

10 [00228] Сайт связывания эпитопа любого антитела против CD123 может применяться в соответствии с настоящим изобретением. Репрезентативное гуманизованное антитело, которое связывается с человеческим CD123 и которое может использоваться согласно настоящему изобретению, представляет собой «MAB-1 против CD123» (см., например, публикацию международной заявки на патент согласно PCT 2015/026892).

[00229] Аминокислотная последовательность VH-домена **CD123 MAB-1** представляет собой (**SEQ ID NO:110**) (остатки CDR_H подчеркнуты):

20 EVQLVQSGAE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYYMKWVRQA PGQGLEWIGD
IIPSNGATFY NQKFKGRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSH
LLRASWFAYW GQGTLVTVSS

[00230] Аминокислотная последовательность VL-домена **CD123 MAB-1** представляет собой (**SEQ ID NO:111**) (остатки CDR_L подчеркнуты):

25 DFVMTQSPDS LAVSLGERVT MSCKSSQSL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP
KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY
PYTFGQGTKL EIK

[00231] Настоящее изобретение охватывает и конкретно включает **CD137 x CD123-связывающие молекулы**, которые содержат VL- и/или VH-домен и/или 1, 2 или все 3 из CDR_L VL-домена и/или 1, 2 или все 3 из CDR_H VH-домена моноклонального антитела против CD123 **MAB-1 против CD123** или любого из антител против CD123, описанных в патенте США US 2017/081424 и публикации международной заявки WO 2016/036937, или присутствующие в антителах JNJ-63709178 (Johnson & Johnson, также см. публикацию международной заявки WO 2016/036937) и XmAb14045 (Xencor, также см., патент США US 2017/081424).

j) IL13R α 2

[00232] Гиперэкспрессия рецептора интерлейкина-13 α 2 (IL13R α 2) наблюдается в различных типах рака, включая глиобластому, рак толстой и прямой кишки, рак шейки матки, рак поджелудочной железы, множественную меланому, остеосаркому, лейкоз, лимфому, рак предстательной железы и рак легкого. Антитела, которые иммуноспецифично связываются с IL13R α 2, являются коммерчески доступными и были описаны в данной области техники (см., например, публикацию международной заявки WO 2008/146911). Репрезентативные гуманизированные антитела, которые связываются с человеческим IL13R α 2, включают «hu08» (см., например, публикацию международной заявки WO 2014/072888).

[00233] Аминокислотная последовательность VH-домена hu08 (SEQ ID NO:112) показана ниже (остатки CDR подчеркнуты):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RNGMSWVRQA PGKGLEWVAT
VSSGGSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQG
TTALATRFED VWGQGTLVTV SS

[00234] Аминокислотная последовательность VL-домена hu08 (SEQ ID NO:113) показана ниже (остатки CDR подчеркнуты):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ICKASQDVG TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASVRSTGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYSAPWTFGG
GTKVEIK

[00235] Настоящее изобретение охватывает и конкретно включает CD137 x IL13R α 2-связывающие молекулы, которые содержат VL- и/или VH-домен и/или 1, 2 или все 3 из CDR_L VL-домена и/или 1, 2 или все 3 из CDR_H VH-домена моноклонального антитела против IL13R α 2 hu08.

k) ROR1

[00236] Подобный рецепторной тирозинкиназе орфанный рецептор 1 («ROR1») представляет собой мембранный белок I типа, принадлежащий подсемейству рецепторов клеточной поверхности ROR. ROR1 представляет собой онкоэмбриональный антиген, который экспрессируется многими тканями во время эмбриогенеза, отсутствует в большинстве зрелых тканей и экспрессируется при множестве злокачественных заболеваний крови и солидных злокачественных образованиях, включая рак яичников, толстой кишки, легкого, лимфому, рак кожи, поджелудочной железы, яичек, мочевого пузыря, матки, предстательной железы, надпочечника, молочной железы, В-клеточные злокачественные образования, а также в некоторых раковых стволовых клетках. Экспрессия ROR1 связана с

низкодифференцированными опухолями, обладающими менее дифференцированной морфологией, и коррелирует с плохим клиническим исходом. Сайт связывания эпитопа любого антитела против ROR1 может применяться в соответствии с настоящим изобретением. Ниже представлено репрезентативное гуманизованное/оптимизированное антитело против ROR1, которое может применяться для создания молекул согласно настоящему изобретению, варианты указанного антитела описаны в публикации международной заявки WO 2017/142928.

(1) Антитело против ROR1

[00237] Аминокислотная последовательность репрезентативного VH антитела против ROR1 представляет собой (SEQ ID NO:114) (остатки CDR подчеркнуты):

QEQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYYMSWXRQA PGKGLEWVAT
IYPSSGKTY ADSAKGRLTl SSDNAKDSL Y LQMNSLRAED TAVYYCTRDS
YADDAALFDI WGQGT TVTVS S
где X is I или V

[00238] Аминокислотная последовательность репрезентативного VL антитела против ROR1 представляет собой (SEQ ID NO:115) (остатки CDR подчеркнуты):

QLVLTQSPSA SASLGSSVKL TCTLSSGHKT DTIDWYQQQP GKAPRYLMKL
EGSGSYNKGS GVPDRFSGSS SGADWYLTIS SLQSEDEADY YCGTDYPGNY
LFGGGTQLTV LG

(2) Другие ROR1-связывающие домены

[00239] Помимо идентифицированных выше ROR1-связывающих доменов изобретение рассматривает применение любого из сайтов связывания эпитопа любого из следующих антител против ROR1: **4A5** (см. патент США 8 212 009); **R11**, **R12** и **Y31** (см. патент США 9 758 586) и **A1-A14** (см., например, патент США 9 228 023).

[00240] Настоящее изобретение охватывает и конкретно включает **CD137 x ROR1-связывающие молекулы**, которые содержат VL- и/или VH-домен и/или 1, 2 или все 3 из CDR_L VL-домена и/или 1, 2 или все 3 из CDR_H VH-домен любого из моноклональных антител против ROR1, предложенных в настоящей заявке.

D. CD137 x OA-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению

[00241] Настоящее изобретение, в частности, направлено на Fc-содержащие тетравалентные и трехвалентные **CD137 x OA-связывающие молекулы**, способные одновременное связываться с CD137 и OA, и другие Fc-содержащие **CD137 x OA-связывающие молекулы**, способные одновременное связываться с CD137 и OA.

Настоящее изобретение также направлено на применение таких молекул для лечения рака и других заболеваний и состояний.

1. Тетравалентные Fc-содержащие CD137 x OA-диатела

[00242] Настоящее изобретение, в частности, включает широкое разнообразие Fc-содержащих диател, способных одновременно связываться с CD137 и OA. Репрезентативные Fc-содержащие CD137 x OA-диатела описаны ниже.

[00243] Такие тетравалентные Fc-содержащие диатела содержат две полипептидные цепи. Первая из таких полипептидных цепей может содержать в направлении от N-конца к C-концу: N-конец, вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела, способный связываться с эпитопом «первого» антигена (VL1) (CD137 или OA), вариабельный домен тяжелой цепи (VH) антитела, способный связываться с эпитопом «второго» антигена (VH2) (OA, если был выбран VL1, связывающийся с эпитопом CD137; CD137, если был выбран VL1, связывающийся с эпитопом OA), цистеин-содержащий домен, один или более дополнительных доменов, как описано более подробно ниже, и C-конец.

Вторая из таких полипептидных цепей может содержать в направлении от N-конца к C-концу: N-конец, вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела, способный связываться с эпитопом «второго» антигена (VL2) (OA, если первый антиген представлял собой CD137; CD137, если первый антиген представлял собой OA), вариабельный домен тяжелой цепи (VH) антитела, способный связываться с эпитопом «второго» антигена (VH2) (OA, если был выбран VL2, связывающийся с эпитопом CD137; CD137, если был выбран VL2, связывающийся с эпитопом OA), цистеин-содержащий домен, один или более дополнительных доменов, как описано более подробно ниже, и C-конец. Промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**) отделяет вариабельный домен легкой цепи (VL1 или VL2) от вариабельного домена тяжелой цепи (VH1 или VH2).

[00244] Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, Fc-содержащие диатела согласно настоящему изобретению представляют собой ковалентно связанные тетравалентные диатела, содержащие четыре сайта связывания эпитопа, которые содержат четыре полипептидных цепи и имеют общую структуру, изображенную на **Фигуре 1А**. Первая и третья полипептидные цепи такого диатела содержат в направлении от N-конца к C-концу: (i) VL1-содержащий домен, (ii) VH2-содержащий домен, (iii) домен гетеродимеризации и (iv) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Вторая и четвертая полипептидные цепи содержат: (i) VL2-содержащий

домен, (ii) VH1-содержащий домен и (iii) домен гетеродимеризации, где указанные домены гетеродимеризации обеспечивают димеризацию и ковалентное связывание первой/третьей полипептидных цепей со второй/четвертой полипептидными цепями. VH-домены связаны с доменами гетеродимеризации с помощью промежуточных линкерных пептидов (**линкер 2**), которые могут содержать цистеиновый остаток. Не обязательно или дополнительно обеспечивающие гетеродимеризацию домены могут содержать цистеиновые остатки. В репрезентативном варианте реализации **CD137 х OA**-биспецифичного Fc-содержащего диатела С-конец домена гетеродимеризации первой полипептидной цепи связан с CH2-CH3-доменами с помощью промежуточного линкерного пептида (**линкер 3**). VL- и/или VH-домены третьей и четвертой полипептидных цепей и VL- и/или VH-домены первой и второй полипептидных цепей могут быть одинаковыми или различаться таким образом, чтобы позволить тетравалентное связывание, которое является моноспецифичным, биспецифичным или тетраспецифичным. В Таблице 3, ниже, обозначения «**VL3**» и «**VH3**» относятся, соответственно, к переменному домену легкой цепи и переменному домену тяжелой цепи, которые связываются с «третьим» эпитопом такого диатела. Подобным образом, обозначения «**VL4**» и «**VH4**» означают, соответственно, переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи такого диатела, которые связываются с «четвертым» эпитопом. Общая структура полипептидных цепей репрезентативных четырехцепочечных биспецифичных Fc-содержащих диател согласно изобретению предложена в **Таблице 3**:

Таблица 3		
Биспецифичное	2-ая цепь	NH ₂ -VL2-VH1-⊙-HPD-COOH
	1-ая цепь	NH ₂ -VL1-VH2-⊙-HPD-⊙-CH2-CH3-COOH
	1-ая цепь	NH ₂ -VL1-VH2-⊙-HPD-⊙-CH2-CH3-COOH
	2-ая цепь	NH ₂ -VL2-VH1-⊙-HPD-COOH
Тетраспецифичное	2-ая цепь	NH ₂ -VL2-VH1-⊙-HPD-COOH
	1-ая цепь	NH ₂ -VL1-VH2-⊙-HPD-⊙-CH2-CH3-COOH
	3-я цепь	NH ₂ -VL3-VH4-⊙-HPD-⊙-CH2-CH3-COOH
	4-ая цепь	NH ₂ -VL4-VH3-⊙-HPD-COOH

(– ⊙) – обозначает цистеин-содержащий полипептидный домен, который содержит один, два или более двух цистеиновых остатков. Предполагается, что данная схема является иллюстративной и неограничивающей. Цистеиновые остатки могут присутствовать в дополнительных или альтернативных доменах, например, в пределах домена гетеродимеризации (HPD))

5

[00245] Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, **CD137 х ОА-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению представляют собой биспецифичные тетравалентные (т.е. содержащие четыре сайта связывания эпитопа) Fc-содержащие диатела, которые состоят в общем из четырех полипептидных цепей (Фигуры 1А-1С). **CD137 х ОА-связывающие молекулы** согласно изобретению представляют собой биспецифичные тетравалентные Fc-содержащие диатела, которые содержат два сайта связывания эпитопа, иммуноспецифичных в отношении CD137 (которые могут быть способны связываться с одним и тем же эпитопом CD137 или с разными эпитопами CD137), и два сайта связывания эпитопа, иммуноспецифичных в отношении опухолевого антигена (которые могут быть способны связываться с одним и тем же эпитопом **ОА** или с разными эпитопами **ОА** или с разными эпитопами различных **ОА**).

10

15

20

25

[00246] Согласно дополнительному варианту реализации изобретения, содержащие Fc-домен диатела согласно настоящему изобретению могут содержать три полипептидные цепи. Первый полипептид такого диатела часто содержит три домена: (i) VL1-содержащий домен, (ii) VH2-содержащий домен и (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Второй полипептид такого диатела часто содержит: (i) VL2-содержащий домен, (ii) VH1-содержащий домен и (iii) домен, который обеспечивает гетеродимеризацию и ковалентное связывание с первой полипептидной цепью диатела. Третий полипептид такого диатела часто содержит последовательность CH2-CH3. Таким образом, первая и вторая полипептидные цепи такого диатела часто

объединяются вместе с образованием эпитоп-связывающего домена VL1/VH1, который способен связываться либо с первым, либо со вторым эпитопом, а также эпитоп-связывающего домена VL2/VH2, который способен связываться с другими из таких эпитопов. Первый и второй полипептиды часто связаны друг с другом с помощью дисульфидной связи, включающей цистеиновый остаток в их соответствующих третьих доменах. Следует отметить, что первая и третья полипептидные цепи часто объединяются друг с другом с образованием Fc-домена, который стабилизируется с помощью дисульфидной связи. На **Фигуре 1D** показана репрезентативная структура таких диател.

10 [00247] Согласно каждому из указанных выше вариантов реализации изобретения, переменный домен легкой цепи первой полипептидной цепи (**VL1**) координационно выбран таким образом, чтобы позволить его взаимодействие с переменным доменом тяжелой цепи второй полипептидной цепи (**VH1**) с образованием таким образом функционального сайта связывания эпитопа, который способен иммуноспецифично связываться с эпитопом первого антигена (т.е. **OA** или CD137). Подобным образом, переменный домен легкой цепи второй полипептидной цепи (**VL2**) координационно выбран таким образом, чтобы позволить его взаимодействие с переменным доменом тяжелой цепи первой полипептидной цепи (**VH2**) с образованием таким образом функционального сайта связывания эпитопа, который способен иммуноспецифично связываться с эпитопом второго антигена (т.е. **OA** или CD137). Таким образом, переменные домены легких цепей и переменные домены тяжелых цепей координационно выбраны таким образом, что две полипептидные цепи вместе содержат сайты связывания эпитопа, способные связываться с CD137 и **OA**.

25 [00248] Дополнительные Fc-содержащие диатела согласно настоящему изобретению содержат пять полипептидных цепей и изображены на **Фигуре 2**. Первая полипептидная цепь такого диатела содержит: (i) VH1-содержащий домен, (ii) CH1-содержащий домен и (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Первая полипептидная цепь может представлять собой тяжелую цепь антитела, которая содержит VH1 и константный участок тяжелой цепи. Вторая и пятая полипептидные цепи такого диатела содержат: (i) VL1-содержащий домен и (ii) CL-содержащий домен. Вторая и/или пятая полипептидные цепи такого диатела могут представлять собой легкие цепи антитела, которые содержат VL1, комплементарный VH1-домен первой/третьей полипептидной цепи. Первая, вторая и/или пятая полипептидные цепи могут быть выделены из

природного антитела. Альтернативно, они могут быть сконструированы рекомбинантным путем. Согласно одному варианту реализации изобретения, вторая и пятая полипептидные цепи имеют одинаковую аминокислотную последовательность. Третья полипептидная цепь такого диатела содержит: (i) VH1-содержащий домен, (ii) CH1-содержащий домен, (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3, (iv) VL2-содержащий домен, (v) VH3-содержащий домен и (vi) домен гетеродимеризации, где указанные домены гетеродимеризации обеспечивают димеризацию третьей цепи с четвертой цепью. Четвертый полипептид таких диател содержит: (i) VL3-содержащий домен, (ii) VH2-содержащий домен и (iii) домен, который обеспечивает гетеродимеризацию и ковалентное связывание с третьей полипептидной цепью диатела. С-конец VH3- и VH2-содержащих доменов третьей и четвертой полипептидных цепей связан с доменом гетеродимеризации с помощью промежуточного линкерного пептида (**линкер 2**), и С-конец CH2-CH3-доменов третьей полипептидной цепи связан с VL2-содержащим доменом с помощью промежуточного линкерного пептида (**линкер 4**).

15 [00249] Таким образом, первая и вторая, а также третья и пятая полипептидные цепи таких диател соединяются с образованием двух сайтов связывания VL1/VH1, способных связываться с первым эпитопом. Третья и четвертая полипептидные цепи таких диател соединяются с образованием одного связывающего домена диатела, содержащего сайт связывания VL2/VH2, который способен связываться со вторым эпитопом, а также сайт связывания VL3/VH3, который способен связываться с третьим эпитопом. Первый и

20 третий полипептиды связаны друг с другом с помощью дисульфидной связи, включающей цистеиновые остатки в их соответствующих константных участках. Следует отметить, что первая и третья полипептидные цепи соединяются друг с другом с образованием Fc-участка. Такие биспецифичные диатела обладают повышенной

25 активностью. На **Фигуре 2** показана структура таких диател. Необходимо понимать, что домены VL1/VH1, VL2/VH2 и VL3/VH3 могут быть одинаковыми или могут различаться таким образом, чтобы позволить связывание, которое является моноспецифичным, биспецифичным или триспецифичным. Однако, как предложено в настоящей заявке, указанные домены выбраны таким образом, чтобы обеспечивать

30 связывание с CD137 и **ОА**.

[00250] VL- и VH-домены полипептидных цепей выбраны таким образом, чтобы образовывались сайты связывания VL/VH, специфичные в отношении желаемого эпитопа. Сайты связывания VL/VH, образованные в результате объединения

полипептидных цепей, могут быть одинаковыми или могут различаться таким образом, чтобы позволить тетравалентное связывание, которое является моноспецифичным, биспецифичным, триспецифичным или тетраспецифичным. В частности, VL- и VH-домены могут быть выбраны таким образом, что биспецифичное диатело может содержать два сайта связывания первого эпитопа и два сайта связывания второго эпитопа или три сайта связывания первого эпитопа и один сайт связывания второго эпитопа или два сайта связывания первого эпитопа, один сайт связывания второго эпитопа и один сайт связывания третьего эпитопа (как изображено на **Фигуре 2**). Общая структура полипептидных цепей репрезентативных пятицепочечных содержащих Fc-участок диател согласно изобретению предложена в Таблице 4:

Таблица 4		
Биспецифичное (2x2)	2-ая цепь	NH ₂ -VL1—CL-©-COOH
	1-ая цепь	NH ₂ -VH1-CH1-©-©-CH2-CH3-COOH
	3-я цепь	NH ₂ -VH1-CH1-©-©-CH2-CH3-VL2-VH2-©-HPD-COOH
	5-ая цепь	NH ₂ -VL1—CL-©-COOH
	4-ая цепь	NH ₂ -VL2-VH2-©-HPD-COOH
Биспецифичное (3x1)	2-ая цепь	NH ₂ -VL1—CL-©-COOH
	1-ая цепь	NH ₂ -VH1-CH1-©-©-CH2-CH3-COOH
	3-я цепь	NH ₂ -VH1-CH1-©-©-CH2-CH3-VL1-VH2-©-HPD-COOH
	5-ая цепь	NH ₂ -VL1—CL-©-COOH
	4-ая цепь	NH ₂ -VL2-VH1-©-HPD-COOH
Триспецифичное (2x1x1)	2-ая цепь	NH ₂ -VL1—CL-©-COOH
	1-ая цепь	NH ₂ -VH1-CH1-©-©-CH2-CH3-COOH
	3-я цепь	NH ₂ -VH1-CH1-©-©-CH2-CH3-VL2-VH3-©-HPD-COOH
	5-ая цепь	NH ₂ -VL1—CL-©-COOH
	4-ая цепь	NH ₂ -VL3-VH2-©-HPD-COOH

(— ©) – обозначает цистеин-содержащий полипептидный домен, который содержит один, два или более двух цистеиновых остатков. Предполагается, что данная схема является иллюстративной и неограничивающей. Цистеиновые остатки могут присутствовать в дополнительных или альтернативных доменах, таких как домен гетеродимеризации (HPD))

[00251] Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, **CD137 x OA-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению представляют собой биспецифичные тетравалентные (т.е. содержащие четыре сайта связывания эпитопа) Fc-содержащие диатела, которые состоят в целом из пяти полипептидных цепей,

содержащих два сайта связывания эпитопа, иммуноспецифичных в отношении CD137 (которые могут быть способны связываться с одним и тем же эпитопом CD137 или с разными эпитопами CD137), и два сайта связывания эпитопа, иммуноспецифичных в отношении **ОА** (которые могут быть способны связываться с одним и тем же эпитопом **ОА** или с разными эпитопами **ОА** или с разными эпитопами различных **ОА**). Согласно другому варианту реализации изобретения, **CD137 x ОА-связывающие молекулы** согласно изобретению представляют собой биспецифичные тетравалентные Fc-содержащие диатела, которые содержат три сайта связывания эпитопа, иммуноспецифичных в отношении CD137 (которые могут быть способны связываться с одним и тем же эпитопом CD137 или с двумя или тремя различными эпитопами CD137), и один сайт связывания эпитопа, специфичный в отношении **ОА**.

2. Трехвалентные CD137 x ОА-связывающие молекулы

[00252] Согласно одному варианту реализации изобретения **CD137 x ОА-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению являются трехвалентными и содержат первый сайт связывания эпитопа (например, VL1 и VH1), второй сайт связывания эпитопа (например, VL2 и VH2) и третий сайт связывания эпитопа (например, VL3 и VH3) и, таким образом, способны связываться с эпитопом **ОА**, эпитопом CD137 и третьим эпитопом, где указанный третий эпитоп может представлять собой:

- (a) тот же или другой эпитоп **ОА**;
- (b) тот же или другой эпитоп CD137 или
- (c) эпитоп другого **ОА**.

[00253] Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, такие «**трехвалентные CD137 x ОА-связывающие молекулы**» согласно настоящему изобретению содержат два сайта связывания эпитопа для эпитопа CD137 (где указанные эпитопы могут быть одинаковыми или разными) и один сайт связывания эпитопа для эпитопа **ОА**.

[00254] В целом, такие **трехвалентные CD137 x ОА-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению состоят из трех, четырех, пяти или более полипептидных цепей, которые с помощью одной или более дисульфидных связей между парами таких полипептидов образуют ковалентно связанный молекулярный комплекс, который содержит «**связывающий домен по типу диатела**» и «**связывающий домен не по типу диатела**».

[00255] «Связывающий домен по типу диатела» представляет собой эпитоп-связывающий домен диатела и, в частности, диатела DART®. Термины «диатело» и «диатело DART®» обсуждались выше. Предполагается, что **связывающий домен «не по типу диатела»** означает связывающий домен, который не имеет структуру связывающего домена по типу диатела. Как правило, связывающий домен не по типу диатела представляет собой **связывающий домен по типу Fab** или **связывающий домен по типу ScFv**. При использовании в настоящей заявке термин «**связывающий домен по типу Fab**» относится к эпитоп-связывающему домену, который образуется в результате взаимодействия VL-домена легкой цепи иммуноглобулина и комплементарного VH-домена тяжелой цепи иммуноглобулина. Связывающие домены по типу Fab отличаются от связывающего домена по типу диатела тем, что две полипептидные цепи, которые образуют связывающий домен по типу Fab, содержат только один эпитоп-связывающий домен, тогда как две полипептидные цепи, которые образуют связывающий домен по типу диатела, содержат по меньшей мере два эпитоп-связывающих домена. Связывающие домены по типу ScFv отличаются от связывающего домена по типу диатела тем, что VL- и VH-домены одной полипептидной цепи взаимодействуют с образованием эпитоп-связывающего домена. Таким образом, при использовании в настоящей заявке связывающие домены по типу Fab и связывающие домены по типу ScFv отличаются от связывающего домена по типу диатела.

20 [00256] Таким образом, **трехвалентные CD137 x OA-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению содержат:

- (I) «первый» эпитоп-связывающий домен, который способен иммуноспецифично связываться с «первым» эпитопом;
- (II) «второй» эпитоп-связывающий домен, который способен иммуноспецифично связываться со «вторым» эпитопом;
- (III) «третий» эпитоп-связывающий домен, который способен иммуноспецифично связываться с «третьим» эпитопом; и
- (IV) Fc-домен, который образуется в результате объединения двух CH2-CH3-доменов друг с другом;

30 где:

- (A) оба из «первого» эпитоп-связывающего домена и «второго» эпитоп-связывающего домена являются «связывающими доменами по типу диатела»;

(В) «третий» эпитоп-связывающий домен представляет собой связывающий домен не по типу диатела и

(С) один из таких «первого», «второго» или «третьего» эпитоп-связывающих доменов связывается с эпитопом **ОА**, и другой из таких «первого», «второго» или «третьего» эпитоп-связывающих доменов связывается с эпитопом **CD137**;

5

[00257] Эпитоп, с которым связывается оставшийся эпитоп-связывающий домен, может представлять собой любой желаемый эпитоп, например, эпитоп **CD137**. Такой эпитоп может быть таким же или может отличаться от эпитопа **CD137**, с которым связываются другие эпитоп-связывающие домены указанной молекулы.

10

[00258] На **Фигурах 3А-3С** представлено схематичное изображение доменов репрезентативных трехвалентных **CD137 x ОА-связывающих молекул**. На **Фигуре 3А** схематично показаны домены репрезентативных **трехвалентных CD137 x ОА-связывающих молекул**, которые собраны в результате ковалентного объединения четырех полипептидных цепей и содержат один сайт связывания не по типу диатела (**VL3/VH3** и, таким образом, являются одновалентными в отношении такого эпитопа) и два сайта связывания по типу диатела (**VL1/VH1** и **VL2/VH2** и, таким образом, являются одновалентными в отношении каждого из таких эпитопов). На **Фигурах 3В-3С** схематично показаны домены репрезентативных **трехвалентных CD137 x ОА-связывающих молекул**, которые собраны в результате ковалентного объединения трех полипептидных цепей и одержат один сайт связывания не по типу диатела (**VL3/VH3** и, таким образом, являются одновалентными в отношении такого эпитопа) и два сайта связывания по типу диатела (**VL1/VH1** и **VL2/VH2** и, таким образом, являются одновалентными в отношении каждого из таких эпитопов). Сайт связывания не по типу диатела представляет собой **связывающий домен по типу Fab** на **Фигурах 3А-3В** и представляет собой **связывающий домен по типу scFv** на **Фигуре 3С**. Как предложено ниже, сайты связывания **VL/VH**, образованные в результате объединения полипептидных цепей, могут быть одинаковыми или могут различаться таким образом, чтобы позволить трехвалентное связывание, которые является моноспецифичным, биспецифичным или триспецифичным.

15

20

25

30

II. Репрезентативные CD137 x ОА-связывающие молекулы

[00259] Изобретение обеспечивает **CD137 x ОА-связывающие молекулы**, которые представляют собой биспецифичные тетравалентные Fc-диатела, способные

одновременно и специфично связываться с CD137 и **ОА**. Как указано выше, **CD137 x ОА-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению могут содержать три, четыре или пять полипептидных цепей. Полипептидные цепи репрезентативных **CD137 x ОА-связывающих молекул**, способных связываться с CD137 и **ОА** PD-L1 или HER2, представлены ниже (обозначены как «**DART-A**», «**DART-A1**», «**DART-A2**», «**DART-A3**», «**DART-A4**», «**DART-A5**», «**DART-A6**», «**DART-A7**», «**DART-A8**», «**DART-A9**», «**DART-A10**», «**DART-B1**» и «**DART-B2**»). Изобретение дополнительно обеспечивает **CD137 x ОА-связывающие молекулы**, которые представляют собой биспецифичные трехвалентные связывающие молекулы, способные одновременно и специфично связываться с CD137 и **ОА**. Как указано выше, трехвалентные **CD137 x ОА-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению могут содержать четыре полипептидные цепи. Полипептидные цепи репрезентативных трехвалентных **CD137 x ОА-связывающих молекул**, способных связываться с CD137 и **ОА** PD-L1 или HER2, обозначены как «**TRIDENT-A**», «**TRIDENT-A4**», «**TRIDENT-A5**», «**TRIDENT-A6**», «**TRIDENT-B1**», «**TRIDENT-B1**».

А. Тетравалентные CD137 x ОА-связывающие молекулы

1. DART-A

[00260] **DART-A** представляет собой тетравалентную **CD137 x CD137 x ОА x ОА-связывающую молекулу**, содержащую два сайта связывания CD137 и два сайта связывания репрезентативного **ОА**, PD-L1. **DART-A** состоит из четырех полипептидных цепей, из которых первая и третья полипептидные цепи являются одинаковыми, и вторая и четвертая полипептидные цепи являются одинаковыми (см. **Фигуру 1В**). **DART-A** содержит связывающие домены **MAВ-6 против CD137 (1.1)** и **MAВ-2 против hPD-L1 (1.1)**.

[00261] Первая и третья полипептидные цепи **DART-A** содержат в направлении от N-конца к С-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-L1 (VL_{PD-L1}) (**VL1 MAВ-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:58)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:16**)), VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VH_{CD137}) (**VH1 MAВ-6 против CD137 (SEQ ID NO:46)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 2**; GGCGGG (**SEQ ID NO:18**)), обеспечивающий гетеродимеризацию домен (E-coil) (**EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:39)**), линкер (**LEPKSADKTHTCPPCP (SEQ ID NO:30)**), CH2-CH3-домен репрезентативного IgG1

человека, содержащий замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO:43**, где X отсутствует), и С-конец.

[00262] Таким образом, первая и третья полипептидные цепи DART-A состоят из:
SEQ ID NO:58 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:39 –
5 SEQ ID NO:30 – SEQ ID NO:43.

[00263] Аминокислотная последовательность первой и третьей полипептидных цепей **DART-A** представляет собой (**SEQ ID NO:116**):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYW
 ASTRHTGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYNTPLTFGQ
 GTKVEIKGGG SGGGGQVQLQ ESGPGLVKPS ETLSLTCTVS GGSISSYYWS
 WIRQPPGKGL EWIGRIYTSG STNYNPSLKS RVTMSVDTSK NQFSLKLSSV
 5 TAADTAVYYC ARDGWYDEDY NYYGMDVWGQ GTTQTVVSSGG CGGGEVAACE
 KEVAALEKEV AALEKEVAAL EKLEPKSADK THTCPPCPAP EAAGGPSVFL
 FPPKPKDTLY ITREPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ
 PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGK YPSDIAVEWE SNGQPENNYK
 10 TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSL
 LSPG

[00264] Могут использоваться альтернативные первая и третья полипептидные цепи **DART-A**, которые содержат обеспечивающий гетеродимеризацию домен (E-coil) без цистеинового остатка (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:37)).

15 Такие альтернативные первая и третья полипептидные цепи **DART-A** состоят из: SEQ ID NO:58 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:37 – SEQ ID NO:30 – SEQ ID NO:43. Могут использоваться дополнительные альтернативные первая и третья полипептидные цепи **DART-A**, в которых аминокислотные остатки последовательности SEQ ID NO:58 (VL1 MAB-2 против hPD-L1) замещены на
 20 аминокислотные остатки последовательности SEQ ID NO:72 (VL2 MAB-2 против hPD-L1). Альтернативные молекулы, содержащие многие из таких полипептидных цепей, описаны ниже.

[00265] Вторая и четвертая полипептидные цепи **DART-A** содержат в направлении от N-конца к C-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного
 25 связываться с CD137 (VL_{CD137} (VL1 MAB-6 против CD137 (SEQ ID NO:50)), промежуточный линкерный пептид (линкер 1; GGGSGGGG (SEQ ID NO:16)), VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-L1 (VH_{PD-L1} (VH1 MAB-2 против hPD-L1, SEQ ID NO:57)), промежуточный линкерный пептид (Линкер 2; GGCGGG (SEQ ID NO:18)), обеспечивающий гетеродимеризацию домен (K-coil)
 30 (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:40) и C-конец.

[00266] Таким образом, вторая и четвертая полипептидные цепи **DART-A** состоят из: SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:57 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40.

[00267] Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей **DART-A** представляет собой (SEQ ID NO:117):

5 EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYQC QDYDLPWTFG
QGTKVEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSLRLSCAA SGFTFSSYTM
SWVRQAPGKG LEWVAYISIG GGTTYYPDTV KGRFTISRDN AKNTLYLQMN
SLKTЭДТАVY YCARQGLPYY FDYWGQGLV TVSSGGCGGG KVAALKEKEKVA
ALKEKVAALK EKVAALKE

[00268] Могут использоваться альтернативные вторая и четвертая полипептидные цепи **DART-A**, которые содержат обеспечивающий гетеродимеризацию домен (K-coil) без цистеинового остатка (например, KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:38**)). Такие альтернативные вторая и четвертая полипептидные цепи **DART-A** иногда состоят из: **SEQ ID NO:50** — **SEQ ID NO:16** — **SEQ ID NO:57** — **SEQ ID NO:18** — **SEQ ID NO:38**. Могут использоваться дополнительные альтернативные первая и третья полипептидные цепи **DART-A**, в которых аминокислотные остатки последовательности **SEQ ID NO:50** (**VL1 MAB-6 против CD137**) замещены на аминокислотные остатки последовательности **SEQ ID NO:55** (**VL2 MAB-6 против CD137**) или **SEQ ID NO:56** (**VL3 MAB-6 против CD137**) и/или аминокислотные остатки последовательности **SEQ ID NO:57** (**VH1 MAB-2 против hPD-L1**) замещены на аминокислотные остатки последовательности **SEQ ID NO:67** (**VH2 MAB-2 против hPD-L1**), **SEQ ID NO:68** (**VH3 MAB-2 против hPD-L1**), **SEQ ID NO:69** (**VH4 MAB-2 против hPD-L1**), **SEQ ID NO:70** (**VH5 MAB-2 против hPD-L1**) или **SEQ ID NO:72** (**VH6 MAB-2 против hPD-L1**). Альтернативно, VL/VH-домены PD-L1 могут быть замещены на VL/VH-домены **ОА-связывающей молекулы**, которая связывается с другим эпитопом PD-L1 или которая связывается с другим **ОА**. Альтернативные молекулы, содержащие многие из таких полипептидных цепей, описаны ниже.

25

2. DART-A1

[00269] **DART-A1** представляет собой тетравалентную **CD137 x CD137 x ОА x ОА**-связывающую молекулу, содержащую два сайта связывания CD137 и два сайта связывания репрезентативного **ОА**, PD-L1. **DART-A1** состоит из четырех полипептидных цепей, из которых первая и третья полипептидные цепи являются одинаковыми, и вторая и четвертая полипептидные цепи являются одинаковыми (см. **Фигура 3В**). **DART-A1** содержит связывающие домены **MAB-6 против CD137 (1.1)** и **MAB-2 против hPD-L1 (2.1)**.

[00270] Первая и третья полипептидные цепи **DART-A1** содержат в направлении от N-конца к С-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного

35

связываться с PD-L1 (VL_{PD-L1}) (**VL1 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:58)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:16**)), VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VH_{CD137}) (**VH1 MAB-6 против CD137 (SEQ ID NO:46)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 2**; GGCGGG (**SEQ ID NO:18**)), обеспечивающий гетеродимеризацию домен (E-coil) (**EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:39)**), линкер (LEPKSADKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:30**)), CH2-CH3-домен репрезентативного IgG1 человека, содержащий замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO:43**), и С-конец.

10 [00271] Таким образом, первая и третья полипептидные цепи **DART-A1** состоят из: SEQ ID NO:58 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:39 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:43.

[00272] Аминокислотная последовательность первой и третьей полипептидных цепей **DART-A1** представляет собой (**SEQ ID NO:118**):

15 DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT TCKASQDVN TAVAWYQQKPKAPKLLIYW
ASTRHTGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYNTPLEFGQ
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSISSYYWS
WIRQPPGKGL EWIGRIYTSSTNYNPSLKS RVTMSVDTSKNQFSLKLSSV
20 TAADTAVYYCAR DGWYDEYNYGMDVWGQGTITVTVSSGCGGGEVAACE
KEVAALEKEVAALAEKEVAALAEKLEPKSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL
FPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQ
PREPQVYITLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK
25 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

[00273] Вторая и четвертая полипептидные цепи **DART-A1** содержат в направлении от N-конца к С-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VL_{CD137}) (**VL1 MAB-6 против CD137 (SEQ ID NO:50)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:16**)), VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-L1 (VH_{PD-L1}) (**VH2 MAB-2 против hPD-L1, SEQ ID NO:67**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 2**; GGCGGG (**SEQ ID NO:18**)), обеспечивающий гетеродимеризацию домен (K-coil) (**KVAACKE-KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE (SEQ ID NO:40)**) и С-конец.

[00274] Таким образом, вторая и четвертая полипептидные цепи **DART-A1** состоят из: SEQ ID NO:50 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:67 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:40.

[00275] Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей **DART-A1** представляет собой (**SEQ ID NO:119**):

5 EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTKVEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSLRLSCAA SGFTFSSYTM
SWVRQAPGKG LEWVAYISIG GGTYYPDTV KGRFTISRDN AKNSLYLQMN
SLRAЭДТАVY YCARQGLPYY FDYWGQGLTV TVSSGGCGGG KVAACКKEKVA
ALKEKVAALK EKVAALKE

[00276] Специально предполагается, что могут использоваться альтернативные первая/третья и вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-A1**, которые содержат обеспечивающие гетеродимеризацию домены (E-coil и K-coil) без цистеинового остатка (например, EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:37**) и KVAALКE-KVAALКE-KVAALКE (**SEQ ID NO:38**)). Такие альтернативные первая/третья полипептидные цепи **DART-A1** иногда состоят из: **SEQ ID NO:58 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:37 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:43**, и такие альтернативные вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-A1** иногда состоят из: **SEQ ID NO:50 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:67 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:38**.

3. DART-A2

[00277] **DART-A2** представляет собой тетравалентную **CD137 x CD137 x OA x OA-связывающую молекулу**, содержащую два сайта связывания CD137 и два сайта связывания репрезентативного **OA**, PD-L1. **DART-A2** состоит из четырех полипептидных цепей, из которых первая и третья полипептидные цепи являются одинаковыми, и вторая и четвертая полипептидные цепи являются одинаковыми (см. **Фигура 3B**). **DART-A2** содержит связывающие домены **MAВ-6 против CD137 (1.1)** и **MAВ-2 против hPD-L1 (2.2)**.

[00278] Первая и третья полипептидные цепи **DART-A2** содержат в направлении от N-конца к C-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-L1 (VL_{PD-L1}) (**VL2 MAВ-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:72)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:16**)), VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VH_{CD137}) (**VH1 MAВ-6 против CD137 (SEQ ID NO:46)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 2**; GGCGGG (**SEQ ID NO:18**)), обеспечивающий гетеродимеризацию доменов (E-coil) (EVAAСEК-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:39**)), линкер

(LEPKSADKTHTCPPCP (SEQ ID NO:30)), CH2-CH3-домен репрезентативного IgG1 человека, содержащий замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (SEQ ID NO:43), и С-конец.

[00279] Таким образом, первая и третья полипептидные цепи **DART-A2** состоят из:
5 SEQ ID NO:72 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:39 —
SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:43.

[00280] Аминокислотная последовательность первой и третьей полипептидных цепей **DART-A2** представляет собой (SEQ ID NO:120):

DIQMTQSPSS LSASVGDVRT ITCKASQDVN EAVAWYQQKP GKAPKLLIYW
 ASTRHTGVPS RFGSGSGTD FTLTISLQP EDFATYYCQQ HYNTPPLTFGQ
 GTKVEIKGGG SGGGGQVQLQ ESGPGLVKPS ETLSLTCTVS GGSISSYYWS
 WIRQPPGKGL EWIGRIYTSG STNYNPSLKS RVTMSVDTSK NQFSLKLSSV
 5 TAADTAVYYC ARDGWYDEDY NYYGMDVWGQ GTTVTVSSGG CGGGEVAACE
 KEVAALEKEV AALEKEVAAL EKLEPKSADK THTCPPCPAP EAAGGPSVFL
 FPPKPKDTLY ITREPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ
 PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKG F YPSDIAVEWE SNGQPENNYK
 10 TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSL
 LSPGK

[00281] Вторая и четвертая полипептидные цепи **DART-A2** являются такими же, как вторая и четвертая полипептидные цепи **DART-A1 (SEQ ID NO:119)**.

[00282] Специально предполагается, что могут использоваться альтернативные
 15 первая/третья и вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-A2**, которые содержат
 обеспечивающие гетеродимеризацию домены (E-coil и K-coil) без цистеинового остатка
 (например, EVAALEEK-EVAALEEK-EVAALEEK-EVAALEEK (SEQ ID NO:37) и KVAAALKE-
KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE (SEQ ID NO:38)). Такие альтернативные **DART-A2**
 первая/третья полипептидные цепи иногда состоят из: SEQ ID NO:72 — SEQ ID NO:16
 20 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:37 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:43,
 и такие альтернативные вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-A2** иногда
 состоят из: SEQ ID NO:50 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:67 — SEQ ID NO:18 — SEQ
ID NO:38.

4. DART-A3

25 [00283] **DART-A3** представляет собой тетравалентную **CD137 x CD137 x OA x OA**-
 связывающую молекулу, содержащую два сайта связывания CD137 и два сайта
 связывания репрезентативного **OA**, PD-L1. **DART-A3** состоит из четырех
 полипептидных цепей, из которых первая и третья полипептидные цепи являются
 одинаковыми, и вторая и четвертая полипептидные цепи являются одинаковыми (см.
 30 **Фигуру 3В**). **DART-A3** содержит связывающие домены **MAВ-6 против CD137 (1.1)** и
MAВ-2 против hPD-L1 (3.1).

[00284] Первая и третья полипептидные цепи **DART-A3** являются такими же, как первая и третья полипептидные цепи **DART-A1 (SEQ ID NO:118)**.

[00285] Вторая и четвертая полипептидные цепи **DART-A3** содержат в направлении
 35 от N-конца к C-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного
 связываться с CD137 (VL_{CD137} (VL1 **MAВ-6 против CD137 (SEQ ID NO:50)**),

промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**; GGGSGGGG (SEQ ID NO:16)), VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-L1 (VH_{PD-L1} (**VH3 MAB-2 против hPD-L1, SEQ ID NO:68**)), промежуточный линкерный пептид (**линкер 2**; GGCGGG (SEQ ID NO:18)), обеспечивающий гетеродимеризацию домен (K-coil)
5 (KVAACCKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:40) и С-конец.

[00286] Таким образом, вторая и четвертая полипептидные цепи DART-A3 состоят из: SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:68 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40.

[00287] Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей **DART-A3** представляет собой (SEQ ID NO:121):

10 EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTKVEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSLRLSCAA SGFTFSSYTM
SWVRQAPGKG LEWVAYISIK GGTYYPTV KGRFTISRDN AKNSLYLQMN
15 SLRAЭДТАVY YCARQGLPYY GDYWGQGLV TVSSGGCGGG KVAACCKEKVA
ALKEKVAALK EKVAALKE

[00288] Специально предполагается, что могут использоваться альтернативные первая/третья и вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-A3**, которые содержат обеспечивающие гетеродимеризацию домены (E-coil и K-coil) без цистеинового остатка (например, EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:37) и KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:38)). Такие альтернативные первая/третья
20 полипептидные цепи **DART-A3** иногда состоят из: SEQ ID NO:58 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:37 – SEQ ID NO:30 – SEQ ID NO:43, и такие альтернативные вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-A3** иногда состоят из: SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:68 – SEQ ID NO:18 – SEQ
25 ID NO:38.

5. DART-A4

[00289] **DART-A4** представляет собой тетравалентную CD137 x CD137 x OA x OA-связывающую молекулу, содержащую два сайта связывания CD137 и два сайта связывания репрезентативного OA, PD-L1. **DART-A4** состоит из четырех
30 полипептидных цепей, из которых первая и третья полипептидные цепи являются одинаковыми, и вторая и четвертая полипептидные цепи являются одинаковыми (см. **Фигуру 3B**). **DART-A4** содержит связывающие домены **MAB-6 против CD137 (1.1)** и **MAB-2 против hPD-L1 (3.2)**.

[00290] Первая и третья полипептидные цепи **DART-A4** являются такими же, как первая и третья полипептидные цепи **DART-A2 (SEQ ID NO:120)**.

[00291] Вторая и четвертая полипептидные цепи **DART-A4** являются такими же, как вторая и четвертая полипептидные цепи **DART-A3 (SEQ ID NO:121)**.

5 [00292] Специально предполагается, что могут использоваться альтернативные первая/третья и вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-A4**, которые содержат обеспечивающие гетеродимеризацию домены (E-coil и K-coil) без цистеинового остатка (например, EVAAALEK-EVAAALEK-EVAAALEK-EVAAALEK (SEQ ID NO:37) и KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE (SEQ ID NO:38)). Такие альтернативные первая/третья
10 полипептидные цепи **DART-A4** иногда состоят из: SEQ ID NO:72 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:37 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:43, и такие альтернативные вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-A4** иногда состоят из: SEQ ID NO:50 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:68 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:38.

15 6. DART-A5

[00293] **DART-A5** представляет собой тетравалентную **CD137 x CD137 x OA x OA**-связывающую молекулу, содержащую два сайта связывания CD137 и два сайта связывания репрезентативного **OA**, PD-L1. **DART-A5** состоит из четырех полипептидных цепей, из которых первая и третья полипептидные цепи являются
20 одинаковыми, и вторая и четвертая полипептидные цепи являются одинаковыми (см. **Фигуру 3B**). **DART-A5** содержит связывающие домены **MAВ-6 против CD137 (1.2)** и **MAВ-2 против hPD-L1 (3.2)**.

[00294] Первая и третья полипептидные цепи **DART-A5** являются такими же, как первая и третья полипептидные цепи **DART-A2 (SEQ ID NO:120)**.

25 [00295] Вторая и четвертая полипептидные цепи **DART-A5** содержат в направлении от N-конца к С-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VL_{CD137} (**VL2 MAВ-6 против CD137 (SEQ ID NO:55)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**; GGGSGGGG (SEQ ID NO:16)), VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-L1 (VH_{PD-L1} (**VH2 MAВ-2 против hPD-L1, SEQ ID NO:68**)), промежуточный линкерный пептид (**линкер 2**; GGCGGG (SEQ ID NO:18)), обеспечивающий гетеродимеризацию доменов (K-coil) (KVAAALSKE-KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE (SEQ ID NO:40) и С-конец.

30

[00296] Таким образом, вторая и четвертая полипептидные цепи DART-A5 состоят из: SEQ ID NO:55 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:68 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:40.

[00297] Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей **DART-A5** представляет собой (**SEQ ID NO:122**):

5 EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWYQQK PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTKVEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSLRLSCAA SGFTFSSYTM
SWVRQAPGKG LEWVAYISIK GGTYYPTDV KGRFTISRDN AKNSLYLQMN
10 SLRAЭДТАVY YCARQGLPYY GDYWGQGLTV TVSSGGCGGG KVAACKEKVA
ALKEKVAALK EKVAALKE

[00298] Специально предполагается, что могут использоваться альтернативные первая/третья и вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-A5**, которые содержат обеспечивающие гетеродимеризацию домены (E-coil и K-coil) без цистеинового остатка (например, EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:37**) и KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE (**SEQ ID NO:38**)). Такие альтернативные первая/третья полипептидные цепи **DART-A5** иногда состоят из: **SEQ ID NO:72 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:37 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:43**, и такие альтернативные вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-A5** иногда состоят из: **SEQ ID NO:55 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:68 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:38**.

7. DART-A6

[00299] **DART-A6** представляет собой тетравалентную **CD137 x CD137 x OA x OA**-связывающую молекулу, содержащую два сайта связывания CD137 и два сайта связывания репрезентативного **OA**, PD-L1. **DART-A6** состоит из четырех полипептидных цепей, из которых первая и третья полипептидные цепи являются одинаковыми, и вторая и четвертая полипептидные цепи являются одинаковыми (см. **Фигура 3B**). **DART-A6** содержит связывающие домены **MAВ-6 против CD137 (1.3)** и **hPD-L1 MAВ -2(3.2)**.

[00300] Первая и третья полипептидные цепи **DART-A6** являются такими же, как первая и третья полипептидные цепи **DART-A2 (SEQ ID NO:120)**.

[00301] Вторая и четвертая полипептидные цепи **DART-A6** содержат в направлении от N-конца к C-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VL_{CD137} (**VL3 MAВ-6 против CD137 (SEQ ID NO:56)**)), промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:16**)), VH-домен

моноклонального антитела, способного связываться с PD-L1 (VH_{PD-L1} (**VH3 MAB-2 против hPD-L1, SEQ ID NO:68**)), промежуточный линкерный пептид (**линкер 2**; GGCGGG (**SEQ ID NO:18**)), обеспечивающий гетеродимеризацию домен (K-coil) (**KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:40)** и С-конец.

5 [00302] Таким образом, вторая и четвертая полипептидные цепи DART-A6 состоят из: SEQ ID NO:56 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:68 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:40.

[00303] Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей **DART-A6** представляет собой (**SEQ ID NO:123**):

5 EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQOK PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTKVEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSLRLSCAA SGFTFSSYTM
SWVRQAPGKG LEWVAYISIK GGTYYPDTV KGRFTISRDN AKNSLYLQMN
SLRAЭДТАVY YCARQGLPYY GDYWGQGLTV TVSSGGCGGG KVAACKEKVA
ALKEKVAALK EKVAALKE

[00304] Специально предполагается, что могут использоваться альтернативные первая/третья и вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-A6**, которые содержат обеспечивающие гетеродимеризацию домены (E-coil и K-coil) без цистеинового остатка (например, EVAALEEK-EVAALEEK-EVAALEEK-EVAALEEK (SEQ ID NO:37) и KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE (SEQ ID NO:38)). Такие альтернативные первая/третья полипептидные цепи **DART-A6** иногда состоят из: SEQ ID NO:72 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:37 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:43, и такие альтернативные вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-A6** иногда состоят из: SEQ ID NO:56 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:68 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:38.

8. DART-A7

[00305] **DART-A7** представляет собой тетравалентную **CD137 x CD137 x OA x OA**-связывающую молекулу, содержащую два сайта связывания CD137 и два сайта связывания репрезентативного **OA**, PD-L1. **DART-A7** состоит из четырех полипептидных цепей, из которых первая и третья полипептидные цепи являются одинаковыми, и вторая и четвертая полипептидные цепи являются одинаковыми (см. **Фигура 3B**). **DART-A7** содержит связывающие домены **MAВ-6 против CD137 (1.1)** и **MAВ-2 против hPD-L1 (4.2)**.

[00306] Первая и третья полипептидные цепи **DART-A7** являются такими же, как первая и третья полипептидные цепи **DART-A2 (SEQ ID NO:120)**.

[00307] Вторая и четвертая полипептидные цепи **DART-A7** содержат в направлении от N-конца к С-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VL_{CD137} (**VL1 MAВ-6 против CD137 (SEQ ID NO:50)**)), промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**; GGGSGGGG (SEQ ID NO:16)), VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-L1 (VH_{PD-L1} (**VH4 MAВ-2 против hPD-L1, SEQ ID NO:69**)), промежуточный линкерный пептид (**линкер 2**; GGCGGG (SEQ ID NO:18)), обеспечивающий гетеродимеризацию доменов (K-coil) (KVAACKE-KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE (SEQ ID NO:40) и С-конец.

[00308] Таким образом, вторая и четвертая полипептидные цепи DART-A7 состоят из: SEQ ID NO:50 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:69 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:40.

[00309] Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей **DART-A7** представляет собой (**SEQ ID NO:124**):

5 EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTKVEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSLRLSCAA SGFTFSSYTM
SWVRQAPGKG LEWVAYISIG GGTYYPTDV KGRFTISRDN AKNSLYLQMN
10 SLRAЭДТАVY YCARAGLPYY FDYWGQGLTV TVSSGGCGGG KVAACKEKVA
ALKEKVAALK EKVAALKE

[00310] Специально предполагается, что могут использоваться альтернативные первая/третья и вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-A7**, которые содержат обеспечивающие гетеродимеризацию домены (E-coil и K-coil) без цистеинового остатка (например, EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:37**) и KVAAALKE-
15 KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE (**SEQ ID NO:38**)). Такие альтернативные первая/третья полипептидные цепи **DART-A7** иногда состоят из: **SEQ ID NO:72 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:37 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:43**, и такие альтернативные вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-A7** иногда состоят из: **SEQ ID NO:50 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:69 — SEQ ID NO:18 — SEQ**
20 **ID NO:38**.

9. DART-A8

[00311] **DART-A8** представляет собой тетравалентную **CD137 x CD137 x OA x OA**-связывающую молекулу, содержащую два сайта связывания CD137 и два сайта связывания репрезентативного **OA**, PD-L1. **DART-A8** состоит из четырех
25 полипептидных цепей, из которых первая и третья полипептидные цепи являются одинаковыми, и вторая и четвертая полипептидные цепи являются одинаковыми (см. **Фигура 3B**). **DART-A8** содержит связывающие домены **MAВ-6 против CD137 (1.1)** и **MAВ-2 против hPD-L1 (5.2)**.

[00312] Первая и третья полипептидные цепи **DART-A8** являются такими же, как
30 первая и третья полипептидные цепи **DART-A2 (SEQ ID NO:120)**.

[00313] Вторая и четвертая полипептидные цепи **DART-A8** содержат в направлении от N-конца к C-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VL_{CD137} (**VL1 МАВ-6 против CD137 (SEQ ID NO:50)**)), промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:16**)), VH-домен

моноклонального антитела, способного связываться с PD-L1 (VH_{PD-L1} (**VH5 MAB-2 против hPD-L1, SEQ ID NO:70**)), промежуточный линкерный пептид (**линкер 2; GGCGGG (SEQ ID NO:18)**), обеспечивающий гетеродимеризацию доменов (K-coil) (**KVAACKE-KVAALK-KVAALK-KVAALK (SEQ ID NO:40)** и С-конец.

5 [00314] Таким образом, вторая и четвертая полипептидные цепи DART-A8 состоят из: SEQ ID NO:50 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:70 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:40.

[00315] Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей **DART-A8** представляет собой (**SEQ ID NO:125**):

10 EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISSLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTKVEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSLRLSCAA SGFTFSSYTM
SWVRQAPGKG LEWVAYISIK GGTYYPTDV KGRFTISRDN AKNSLYLQMN
SLRAЭДТАVY YCARAGLPYY FDYWGQGTLV TVSSGGCGGG KVAACKEKVA
ALKEKVAALK EKVAALKE

15 [00316] Специально предполагается, что могут использоваться альтернативные первая/третья и вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-A8**, которые содержат обеспечивающие гетеродимеризацию домены (E-coil и K-coil) без цистеинового остатка (например, **EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:37)** и **KVAALK-KVAALK-KVAALK-KVAALK (SEQ ID NO:38)**). Такие альтернативные первая/третья
20 полипептидные цепи **DART-A8** иногда состоят из: **SEQ ID NO:72 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:37 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:43**, и такие альтернативные вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-A8** иногда состоят из: **SEQ ID NO:50 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:70 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:38**.

25 10. DART-A9

[00317] **DART-A9** представляет собой тетравалентную **CD137 x CD137 x OA x OA**-связывающую молекулу, содержащую два сайта связывания CD137 и два сайта связывания репрезентативного **OA**, PD-L1. **DART-A9** состоит из четырех полипептидных цепей, из которых первая и третья полипептидные цепи являются
30 одинаковыми, и вторая и четвертая полипептидные цепи являются одинаковыми (см. **Фигуру 3B**). **DART-A9** содержит связывающие домены **MAB-6 против CD137 (1.1)** и **MAB-2 против hPD-L1 (6.2)**.

[00318] Первая и третья полипептидные цепи **DART-A9** являются такими же, как первая и третья полипептидные цепи **DART-A2 (SEQ ID NO:120)**.

[00319] Вторая и четвертая полипептидные цепи **DART-A9** содержат в направлении от N-конца к С-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VL_{CD137} (**VL1 MAB-6 против CD137 (SEQ ID NO:50)**)), промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:16**)), VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-L1 (VH_{PD-L1} (**VH6 MAB-2 против hPD-L1, SEQ ID NO:71**)), промежуточный линкерный пептид (**линкер 2**; GGCGGG (**SEQ ID NO:18**)), обеспечивающий гетеродимеризацию домен (K-coil) (**KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:40**)** и С-конец.

[00320] Таким образом, вторая и четвертая полипептидные цепи **DART-A9** состоят из: SEQ ID NO:50 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:71 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:40.

[00321] Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей **DART-A9** представляет собой (**SEQ ID NO:126**):

```
EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
15 QGTKVEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSLRLSCAA SGFTFSSYTM
SWVRQAPGKG LEWVAYISIG GGTTYYPDTV KGRFTISRDN AKNSLYLQMN
SLRAЭДТАVY YCARAGLPYY GDYWGQGTLV TVSSGGCGGG KVAACKEKVA
ALKEKVAALK EKVAALKE
```

[00322] Специально предполагается, что могут использоваться альтернативные первая/третья и вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-A9**, которые содержат обеспечивающие гетеродимеризацию домены (E-coil и K-coil) без цистеинового остатка (например, **EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:37**)** и **KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:38**)**). Такие альтернативные первая/третья полипептидные цепи **DART-A9** иногда состоят из: **SEQ ID NO:72 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:37 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:43**, и такие альтернативные вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-A9** иногда состоят из: **SEQ ID NO:50 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:71 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:38**.

11. DART-A10

[00323] **DART-A10** представляет собой тетравалентную **CD137 x CD137 x OA x OA**-связывающую молекулу, содержащую два сайта связывания CD137 и два сайта связывания репрезентативного **OA**, PD-L1. **DART-A10** состоит из четырех полипептидных цепей, из которых первая и третья полипептидные цепи являются одинаковыми, и вторая и четвертая полипептидные цепи являются одинаковыми (см.

Фигура 3В). DART-A10 содержит связывающие домены **MAВ-6 против CD137 (1.3)** и **MAВ-2 против hPD-L1 (4.2)**.

[00324] Первая и третья полипептидные цепи **DART-A10** являются такими же, как первая и третья полипептидные цепи **DART-A2 (SEQ ID NO:120)**.

5 [00325] Вторая и четвертая полипептидные цепи **DART-A10** содержат в направлении от N-конца к С-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VL_{CD137} (**VL3 MAВ-6 против CD137 (SEQ ID NO:56)**)), промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:16**)), VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-L1 (VH_{PD-L1} (**VH4 MAВ-2**
10 **против hPD-L1, SEQ ID NO:69**)), промежуточный линкерный пептид (**линкер 2**; GCGGGG (**SEQ ID NO:18**)), обеспечивающий гетеродимеризацию домен (K-coil) (**KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:40)**) и С-конец.

[00326] Таким образом, вторая и четвертая полипептидные цепи DART-A10 состоят из: SEQ ID NO:56 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:69 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40.

15 [00327] Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей **DART-A10** представляет собой (**SEQ ID NO:139**):

```
EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQOK PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTKVEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSLRLSCAA SGFTFSSYTM
20 SWVRQAPGKG LEWVAYISIG GGTYYPTDV KGRFTISRDN AKNSLYLQMN
SLRAЭДТАVY YCARAGLPYY FDYWGQGLV TVSSGGCGGG KVAACKEKVA
ALKEKVAALK EKVAALKE
```

[00328] Специально предполагается, что могут использоваться альтернативные первая/третья и вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-A10**, которые содержат обеспечивающие гетеродимеризацию домены (E-coil и K-coil) без цистеинового остатка (например, **EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:37)** и **KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:38)**). Такие альтернативные первая/третья полипептидные цепи **DART-A10** иногда состоят из: **SEQ ID NO:72 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:37 – SEQ ID NO:30 – SEQ ID NO:43**,
30 и такие альтернативные вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-A10** иногда состоят из: **SEQ ID NO:56 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:69 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:38**.

12. DART-B1

[00329] **DART-B1** представляет собой бивалентную **CD137 x OA-связывающую молекулу**, содержащую один сайт связывания CD137 и один сайт связывания репрезентативного **OA**, HER2. **DART-B1** состоит из трех полипептидных цепей, из
5 которых первая, вторая и третья полипептидные цепи являются различными (см. **Фигуру 1D**). **DART-B1** содержит связывающие домены **MAВ-6 против CD137 (1.1)** и **MAВ-1 против hHER2 (1.3)**.

[00330] Первая полипептидная цепь **DART-B1** содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с
10 CD137 (VL_{CD137} (**VL1 MAВ-6 против CD137 (SEQ ID NO:50)**)), промежуточный линкерный пептид (**Линкер 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:16**)), VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с HER2 (VH_{HER2} (**VH1 MAВ-1 против hHER2, SEQ ID NO:80**)), промежуточный линкерный пептид (**линкер 2**; GGCGGG (**SEQ ID NO:18**)), обеспечивающий гетеродимеризацию доменов (E-coil)
15 (**EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:37)**), промежуточный линкерный пептид (GGGDKTHTCPCP (**SEQ ID NO:21**)), содержащий «выступ» CH2-CH3-домен, содержащий замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO:146**), и C-конец.

[00331] Таким образом, первая полипептидная цепь **DART-B1** состоит из: SEQ ID
20 NO:50 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:80 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:37 — SEQ ID NO:21 — SEQ ID NO:146.

[00332] Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи **DART-B1** представляет собой (**SEQ ID NO:143**):

```
25 EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
   GASTRATGIP ARFSGSGSGT DF1TLTISSLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
   QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL VQSGAEVKKP GASVKVSCKA SGYTFTNYGM
   NWVRQAPGQG LEWMGWINTN IGEPTYTEEF KGRVTMTRDT SISTAYMELS
   RLRSDDTAVY YCARD2DGYGN RVSYWGQGT3L VTVSSGGCGG GEVAALEKEV
   AALEKEVAAL EKEVAALEKG GGD4KTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
30 DTLYITREPE VTCVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
   TYRVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
   YTLPPSREEM TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTT5PPVL
   DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNV6FSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK
```

[00333] Вторая полипептидная цепь **DART-B1** содержит в направлении от N-конца к
35 C-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с HER2 (VL_{HER2} (**VL3 MAВ-1 против hHER2, SEQ ID NO:85**)), промежуточный

линкерный пептид (**линкер 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:16**)), VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VH_{CD137}) (**VH1 MAB-6 против CD137 (SEQ ID NO:46)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 2**; GGCGGG (**SEQ ID NO:18**)), обеспечивающий гетеродимеризацию домен (K-coil)
5 (**KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE (SEQ ID NO:38)) и C-конец.**

[00334] Таким образом, вторая полипептидная цепь DART-B1 состоит из: SEQ ID NO:85 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:38.

[00335] Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи **DART-B1** представляет собой (**SEQ ID NO:144**):

10 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIS NYLSWFQQKP GKAPKTLIYR
ANRLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCLQ HDEFPWTFGQ
GTKLEIKGGG SGGGGQVQLQ ESGPGLVKPS ETLSLTCTVS GGSISSYYWS
WIRQPPGKGL EWIGRIYTSG STNYNPSLKS RVTMSVDTSK NQFSLKLSSV
15 TAADTAVYYC ARDGWYDEY NYYGMDVWGQ GTTQTVSSGG CGGGKVAALK
EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

[00336] Третья полипептидная цепь **DART-B1** содержит в направлении от N-конца к C-концу: линкер DKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:20**) и содержащий «впадину» CH2-CH3-домен, содержащий замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/H435R (**SEQ ID NO:149**).

20 [00337] Таким образом, третья полипептидная цепь **DART-B1** состоит из: **SEQ ID NO:20 – SEQ ID NO:149**.

[00338] Как очевидно, третья полипептидная цепь **DART-B** не содержит каких-либо эпитоп-связывающих доменов и может, таким образом, использоваться в различных **CD137 x OA-связывающих молекулах**, имеющих структуру диатела, показанную на
25 **Фигуре 1D**.

[00339] Третья полипептидная цепь **DART-B1** имеет аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:145**:

30 DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK

13. DART-B2

[00340] **DART-B2** представляет собой тетравалентную **CD137 x CD137 x OA x OA-**
35 **связывающую молекулу**, содержащую два сайта связывания CD137 и два сайта

связывания репрезентативного **ОА, HER2. DART-B1** состоит из четырех полипептидных цепей, из которых первая и третья полипептидные цепи являются одинаковыми, и вторая и четвертая полипептидные цепи являются одинаковыми (см. **Фигуру 1B**). **DART-B1** содержит связывающие домены **МАВ-6 против CD137 (1.1)** и **МАВ-1 против hHER2 (1.3)**.

[00341] Первая и третья полипептидные цепи **DART-B2** содержат в направлении от N-конца к С-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с HER2 (VL_{HER2} (**VL3 МАВ-1 против hHER2, SEQ ID NO:85**)), промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:16**)), VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VH_{CD137}) (**VH1 МАВ-6 против CD137 (SEQ ID NO:46)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 2**; GGCGGG (**SEQ ID NO:18**)), обеспечивающий гетеродимеризацию доменов (E-coil) (**EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:39)**), линкер (**LEPKSADKTHTCPPCP (SEQ ID NO:30)**), CH2-CH3-домен репрезентативного IgG1 человека, содержащий замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO:43**, где X отсутствует), и С-конец.

[00342] Таким образом, первая и третья полипептидные цепи **DART-B2** состоят из: SEQ ID NO:85 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:39 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:43.

[00343] Аминокислотная последовательность первой и третьей полипептидных цепей **DART-B2** представляет собой (**SEQ ID NO:151**):

```
DIQMTQSPSS LSASVGRVIT ITCKASQDIS NYLSWFQQKP GKAPKTLIYR
ANRLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCLQ HDEFPWTFGQ
GTKLEIKGGG SGGGQVQLQ ESGPGLVKPS ETLSLTCTVS GGSISSYYWS
WIRQPPGKGL EWIGRIYTSG STNYNPSLKS RVTMSVDTSK NQFSLKLSSV
25 TAADTAVYYC ARDGWYDEDY NYYGMDVWGQ GTTVTVSSGG CGGGEVAACE
KEVAALEKEV AALEKEVAAL EKLEPKSADK THTCPPCPAP EAAGGPSVFL
FPPKPKDTLY ITREPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR
EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNQKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ
30 PREPQVYTLPS PSREEMTKNQ VSLTCLVKG FYPDIAVEWE SNGQPENNYK
TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSL
LSPGK
```

[00344] Вторая и четвертая полипептидные цепи **DART-B2** содержат в направлении от N-конца к С-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VL_{CD137}) (**VL1 МАВ-6 против CD137 (SEQ ID NO:50)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:16**)), VH-домен

моноклонального антитела, способного связываться с HER2 (VH_{HER2} (VH1 MAB-1 против hHER2, SEQ ID NO:80)), промежуточный линкерный пептид (линкер 2; GGCGGG (SEQ ID NO:18)), обеспечивающий гетеродимеризацию домен (K-coil) (KVAACKE-KVAALK-KVAALK-KVAALK (SEQ ID NO:40) и С-конец.

5 [00345] Таким образом, вторая и четвертая полипептидные цепи DART-B2 состоят из: SEQ ID NO:50 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:80 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:40.

[00346] Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей **DART-B2** представляет собой (SEQ ID NO:152):

10 EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL VQSGAEVKKP GASVKVSCKA SGYTFTNYGM
NWVRQAPGQG LEWMGWINTN IGEPTYTEEF KGRVTMTRDT SISTAYMELS
RLRSDDTAVY YCARDGYN RVSYWGGTL VTVSSGGCGG GKVAACKKVAAL
AALKEKVAAL KEKVAALKE

15 [00347] Специально предполагается, что могут использоваться альтернативные первая/третья и вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-B2**, которые содержат обеспечивающие гетеродимеризацию домены (E-coil и K-coil) без цистеинового остатка (например, EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:37) и KVAALK-KVAALK-KVAALK-KVAALK (SEQ ID NO:38)). Такие альтернативные первая/третья
20 полипептидные цепи **DART-B2** иногда состоят из: SEQ ID NO:85 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:37 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:43, и такие альтернативные вторая/четвертая полипептидные цепи **DART-B2** иногда состоят из: SEQ ID NO:50 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:80 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:38.

25 **В. Трехвалентные CD137 x OA-связывающие молекулы**

1. TRIDENT-A

[00348] **TRIDENT-A** представляет собой трехвалентную **CD137 x CD137 x OA-связывающую молекулу**, содержащую два сайта связывания CD137 и один сайт связывания репрезентативного **OA**, PD-L1. **TRIDENT-A** состоит из четырех
30 полипептидных цепей (см. **Фигуру 3A**, где VL1/VH1 (сайт A) являются такими же, как VL2/VH2 (сайт B), и связываются с CD137, и VL3/VH3 (сайт C) связываются с PD-L1). **TRIDENT-A** содержит связывающие домены **MAB-6 против CD137 (1.1)** и **MAB-2 против hPD-L1 (1.1)**.

[00349] Первая полипептидная цепь **TRIDENT-A** содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VL_{CD137}) (**VL1 MAB-6 против CD137 (SEQ ID NO:50)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:16**)), VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VH_{CD137}) (**VH1 MAB-6 против CD137 (SEQ ID NO:46)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 2**; GGCGGG (**SEQ ID NO:18**)), обеспечивающий гетеродимеризацию доменов (E-coil) (**EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:37)**), промежуточный линкерный пептид (GGGDKTHTCPCP (**SEQ ID NO:21**)), содержащий «выступ» CH2-CH3-домен, содержащий замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO:146**), и C-конец.

[00350] Таким образом, первая полипептидная цепь **TRIDENT-A** состоит из: SEQ ID NO:50 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:37 — SEQ ID NO:21 — SEQ ID NO:146.

15 [00351] Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи **TRIDENT-A** представляет собой (**SEQ ID NO:127**):

EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
 GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
 QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL QESGPGLVKP SETLSLTCTV SGGSISSYYW
 SWIRQPPGKG LEWIGRIYTS GSTNYNPSLK SRVTMSVDTS KNQFSLKLSS
 5 VTAADTAVYY CARDGWYDED YNYYGMDVWG QGTTVTVSSG GCGGGEVAAL
 EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
 PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 10 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL
 PGK

[00352] Вторая полипептидная цепь **TRIDENT-A** содержит в направлении от N-конца к С-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VL_{CD137}) (**VL1 MAB-6 против CD137 (SEQ ID NO:50)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:16**)), VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VH_{CD137}) (**VH1 MAB-6 против CD137 (SEQ ID NO:46)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 2**; GCGGGG (**SEQ ID NO:18**)), обеспечивающий гетеродимеризацию домен (K-coil) (**KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:38)**) и С-конец.

[00353] Таким образом, вторая полипептидная цепь **TRIDENT-A** состоит из: SEQ ID NO:50 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:38.

[00354] Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи **TRIDENT-A** представляет собой (**SEQ ID NO:128**):

EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
 25 GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
 QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL QESGPGLVKP SETLSLTCTV SGGSISSYYW
 SWIRQPPGKG LEWIGRIYTS GSTNYNPSLK SRVTMSVDTS KNQFSLKLSS
 VTAADTAVYY CARDGWYDED YNYYGMDVWG QGTTVTVSSG GCGGGKVAAL
 KEKVAALKEK VAALKEKVAAL LKE

[00355] Могут использоваться альтернативные первая и вторая полипептидные цепи **TRIDENT-A**, которые содержат обеспечивающие гетеродимеризацию домены (E-coil и K-coil), содержащие цистеиновый остаток (например, **EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:39) и KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:40)**). В таких альтернативных молекулах **TRIDENT-A** первая полипептидная цепь иногда состоит из: SEQ ID NO:50 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:39 — SEQ ID NO:21 — SEQ ID NO:146, и вторая полипептидная цепь иногда состоит из SEQ ID NO:50 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:40. Могут использоваться дополнительные альтернативные первая и

вторая полипептидные цепи **TRIDENT-A**, в которых аминокислотные остатки последовательности **SEQ ID NO:50 (VL1 MAB-6 против CD137)** замещены на аминокислотные остатки последовательности **SEQ ID NO:55 (VL2 MAB-6 против CD137)** или **SEQ ID NO:56 (VL3 MAB-6 против CD137)**. Также специально предполагается, что одна пара VL/VH-доменов CD137 может быть замещена на пару VL/VH **OA**-связывающей молекулы. Альтернативные молекулы, содержащие многие из таких полипептидных цепей, описаны ниже.

[00356] Третья полипептидная цепь **TRIDENT-A** содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец, VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-L1 (VH_{PD-L1}) (**VH1 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:57)**), CH1-домен IgG1 человека (**SEQ ID NO:3**), шарнирный участок IgG1 человека (**SEQ ID NO:7**) и содержащий «впадину» CH2-CH3-домен, содержащий замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/H435R (**SEQ ID NO:149**).

[00357] Таким образом, третья полипептидная цепь **TRIDENT-A** состоит из: **SEQ ID NO:57 — SEQ ID NO:3 — SEQ ID NO:7 — SEQ ID NO:149**.

[00358] Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи **TRIDENT-A** представляет собой (**SEQ ID NO:129**):

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAY
ISIGGGTTY PDTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLKTED TAVYYCARQG
LPYYFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD
TLYITREPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK
```

[00359] Четвертая полипептидная цепь **TRIDENT-A** содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-L1 (VL_{PD-L1}) (**hPD-L1 MAB-1 VL1 (SEQ ID NO:58)**), CL-домен каппа-цепи IgG человека (**SEQ ID NO:1**) и C-конец.

[00360] Таким образом, четвертая полипептидная цепь **TRIDENT-A** состоит из: **SEQ ID NO:69 — SEQ ID NO:1**.

[00361] Аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи **TRIDENT-A** представляет собой (**SEQ ID NO:130**):

DIQMTQSPSS LSASVGDVRT ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYW
ASTRHTGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYNTPPLTFGQ
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC

5

[00362] Могут использоваться альтернативные третья и четвертая полипептидные цепи **TRIDENT-A**, в которых аминокислотные остатки **SEQ ID NO:57 (VH1 MAB-2 против hPD-L1)** замещены на аминокислотные остатки **SEQ ID NO:67 (VH2 MAB-2 против hPD-L1)**, **SEQ ID NO:68 (VH3 MAB-2 против hPD-L1)**, **SEQ ID NO:69 (VH4 MAB-2 против hPD-L1)**, **SEQ ID NO:70 (VH5 MAB-2 против hPD-L1)** или **SEQ ID NO:72 (VH6 MAB-2 против hPD-L1)**, и/или аминокислотные остатки **SEQ ID NO:58 (VL1 MAB-2 против hPD-L1)** замещены на аминокислотные остатки **SEQ ID NO:72 (VL2 MAB-2 против hPD-L1)**. Альтернативно, VL/VH-домены PD-L1 могут быть замещены на VL/VH-домены **ОА**-связывающей молекулы, которая связывается с другим эпитопом PD-L1 или которая связывается с другим **ОА**. Также специально предполагается, что когда сайт связывания **ОА** образуется путем ассоциации первой и второй полипептидных цепей, VL/VH-домены третьей и четвертой полипептидных цепей могут быть замещены на любые из VL/VH-доменов **MAB-6 против CD137**, предложенных в настоящей заявке. Альтернативные молекулы, содержащие нескольких таких полипептидных цепей, описаны ниже.

10

15

20

2. TRIDENT-A4

[00363] **TRIDENT-A4** представляет собой трехвалентную **CD137 x CD137 x ОА-связывающую молекулу**, содержащую два сайта связывания CD137 и один сайт связывания репрезентативного **ОА**, PD-L1. **TRIDENT-A4** состоит из четырех полипептидных цепей (см. **Фигуру 3А**, где VL1/VH1 (сайт А) являются такими же, как VL2/VH2 (сайт В) и связываются с CD137, и VL3/VH3 (сайт С) связываются с PD-L1). **TRIDENT-A4** содержит связывающие домены **MAB-6 против CD137 (1.1)** и **MAB-2 против hPD-L1 (3.2)**.

25

30

[00364] Первая полипептидная цепь **TRIDENT-A4** является такой же, как первая полипептидная цепь **TRIDENT-A (SEQ ID NO:127)**.

[00365] Вторая полипептидная цепь **TRIDENT-A4** является такой же, как вторая полипептидная цепь **TRIDENT-A (SEQ ID NO:128)**.

[00366] Специально предполагается, что могут использоваться альтернативные первая и вторая полипептидные цепи **TRIDENT-A4**, которые содержат

обеспечивающие гетеродимеризацию домены (E-coil и K-coil), содержащие цистеиновый остаток (например, EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:39) и KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:40)). В таких альтернативных молекулах **TRIDENT-A4** первая полипептидная цепь иногда состоит из: SEQ ID NO:50 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:39 — SEQ ID NO:21 — SEQ ID NO:146, и вторая полипептидная цепь иногда состоит из SEQ ID NO:50 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:40.

[00367] Третья полипептидная цепь **TRIDENT-A4** содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец, VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-L1 (VH_{PD-L1}) (**VH3 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:68)**), CH1-домен IgG1 человека (SEQ ID NO:3), шарнирный участок IgG1 человека (SEQ ID NO:7) и содержащий «впадину» CH2-CH3-домен, содержащий замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/H435R (SEQ ID NO:149).

[00368] Таким образом, третья полипептидная цепь **TRIDENT-A4** состоит из: SEQ ID NO:68 — SEQ ID NO:3 — SEQ ID NO:7 — SEQ ID NO:149.

[00369] Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи **TRIDENT-A4** представляет собой (SEQ ID NO:131):

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAY
ISIKGGTTY PDTVKGRTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQG
20 LPYYGDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD
TLYITREPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
25 TLPSPREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK
```

[00370] Четвертая полипептидная цепь **TRIDENT-A4** содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-L1 (VL_{PD-L1}) (**hPD-L1 MAB-1 VL2 (SEQ ID NO:72)**), CL-домен каппа-цепи IgG человека (SEQ ID NO:1) и C-конец.

[00371] Таким образом, четвертая полипептидная цепь **TRIDENT-A4** состоит из: SEQ ID NO:72 — SEQ ID NO:1.

[00372] Аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи **TRIDENT-A** представляет собой (SEQ ID NO:132):

DIQMTQSPSS LSASVGDVRT ITCKASQDVN EAVAWYQQK GKAPKLLIYW
ASTRHTGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYNTPPLTFGQ
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC

5

3. TRIDENT-A5

[00373] **TRIDENT-A5** представляет собой трехвалентную **CD137 x CD137 x OA-связывающую молекулу**, содержащую два сайта связывания CD137 и один сайт связывания репрезентативного **OA**, PD-L1. **TRIDENT-A5** состоит из четырех полипептидных цепей (см. **Фигуру 3A**, где VL1/VH1 (сайт A) являются такими же, как VL2/VH2 (сайт B), и связываются с CD137, и VL3/VH3 (сайт C) связываются с PD-L1). **TRIDENT-A5** содержит связывающие домены **MAВ-6 против CD137 (1.2)** и **MAВ-2 против hPD-L1 (3.2)**.

[00374] Первая полипептидная цепь **TRIDENT-A5** содержит в направлении от N-конца к С-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VL_{CD137}) (**VL2 MAВ-6 против CD137 (SEQ ID NO:55)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:16**)), VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VH_{CD137}) (**VH1 MAВ-6 против CD137 (SEQ ID NO:46)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 2**; GGCGGG (**SEQ ID NO:18**)), обеспечивающий гетеродимеризацию доменов (E-coil) (**EVAALEEK-EVAALEEK-EVAALEEK-EVAALEEK (SEQ ID NO:37)**), промежуточный линкерный пептид (GGGDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:21**)), содержащий «выступ» CH2-CH3-домен, содержащий замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO:146**) и С-конец.

[00375] Таким образом, первая полипептидная цепь **TRIDENT-A5** состоит из: SEQ ID NO:55 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:37 — SEQ ID NO:21 — SEQ ID NO:146.

[00376] Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи **TRIDENT-A5** представляет собой (**SEQ ID NO:133**):

EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWYQQK PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFGSGSGT DFTLTISSLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL QESGPGLVKP SETLSLTCTV SGGSISSYYW
SWIRQPPGKG LEWIGRIYTS GSTNYNPSLK SRVTMSVDTS KNQFSLKLSS
VTAADTAVYY CARDGWYDED YNYYGMDVWG QGTTVTVSSG GCGGGEVAAL
EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE

35

QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GOPENNYKTT
PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL
PGK

5 [00377] Вторая полипептидная цепь **TRIDENT-A5** содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VL_{CD137}) (**VL2 MAB-6 против CD137 (SEQ ID NO:55)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:16**)), VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VH_{CD137}) (**VH1 MAB-6 против CD137 (SEQ ID NO:46)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 2**; GGCGGG (**SEQ ID NO:18**)), обеспечивающий гетеродимеризацию домен (K-coil) (**KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:38)**) и C-конец.

[00378] Таким образом, вторая полипептидная цепь TRIDENT-A5 состоит из: SEQ ID NO:55 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:38.

15 [00379] Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи **TRIDENT-A5** представляет собой (**SEQ ID NO:134**):

EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWYQQK PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
20 QGTKVEIKGG GSGGGQVQL QESGGLVKP SETLSLTCTV SGGSISSYYW
SWIRQPPGKG LEWIGRIYTS GSTNYPNPSLK SRVTMSVDTS KNQFSLKLSS
VTAADTAVYY CARDGWYDED YNYYGMDVWG QGTTVTVSSG GCGGGKVAAL
KEKVAALKEK VAALKEKVAALKE

[00380] Специально предполагается, что могут использоваться альтернативные первая и вторая полипептидные цепи **TRIDENT-A5**, которые содержат обеспечивающие гетеродимеризацию домены (E-coil и K-coil), содержащие цистеиновый остаток (например, **EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:39)** и **KVAACEK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:40)**). В таких альтернативных молекулах **TRIDENT-A5** первая полипептидная цепь иногда состоит из: **SEQ ID NO:55 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:39 — SEQ ID NO:21 — SEQ ID NO:146**, и вторая полипептидная цепь иногда состоит из **SEQ ID NO:55 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:40**.

[00381] Третья полипептидная цепь **TRIDENT-A5** является такой же, как третья полипептидная цепь **TRIDENT-A4 (SEQ ID NO:131)**.

[00382] Четвертая полипептидная цепь **TRIDENT-A5** является такой же, как четвертая полипептидная цепь **TRIDENT-A4 (SEQ ID NO:132)**.

4. TRIDENT-A6

[00383] TRIDENT-A6 представляет собой трехвалентную CD137 x CD137 x OA-связывающую молекулу, содержащую два сайта связывания CD137 и один сайт связывания репрезентативного OA, PD-L1. TRIDENT-A6 состоит из четырех полипептидных цепей (см. **Фигуру 3А**, где VL1/VH1 (сайт А) являются такими же, как VL2/VH2 (сайт В), и связываются с CD137, и VL3/VH3 (сайт С) связываются с PD-L1). TRIDENT-A6 содержит связывающие домены **МАВ-6 против CD137 (1.3)** и **МАВ-2 против hPD-L1 (3.2)**.

[00384] Первая полипептидная цепь TRIDENT-A6 содержит в направлении от N-конца к С-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VL_{CD137}) (**VL3 МАВ-6 против CD137 (SEQ ID NO:56)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:16**)), VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VH_{CD137}) (**VH1 МАВ-6 против CD137 (SEQ ID NO:46)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 2**; GGCGGG (**SEQ ID NO:18**)), обеспечивающий гетеродимеризацию доменов (E-coil) (**EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:37)**), промежуточный линкерный пептид (GGGDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:21**)), содержащие «выступ» CH2- и CH3-домен, содержащие замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO:146**), и С-конец.

[00385] Таким образом, первая полипептидная цепь TRIDENT-A6 состоит из: SEQ ID NO:56 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:37 — SEQ ID NO:21 — SEQ ID NO:146.

[00386] Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи TRIDENT-A6 представляет собой (**SEQ ID NO:135**):

25 EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQOK PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTVKVEIKGG GSGGGGQVQL QESGPGLVKP SETLSLTCTV SSGSISYYW
SWIRQPPGKG LEWIGRIYTS GSTNYNPSLK SRVTMSVDTS KNQFSLKLSS
VTAADTAVYY CARDGWYDED YNYYGMDVWG QGTTVTVSSG GCGGGEVAAL
30 EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL
35 PGK

[00387] Вторая полипептидная цепь **TRIDENT-A6** содержит в направлении от N-конца к С-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VL_{CD137}) (**VL3 MAB-6 против CD137 (SEQ ID NO:56)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**; GGGSGGGG (**SEQ ID NO:16**)), VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VH_{CD137}) (**VH1 MAB-6 против CD137 (SEQ ID NO:46)**), промежуточный линкерный пептид (**линкер 2**; GGCGGG (**SEQ ID NO:18**)), обеспечивающий гетеродимеризацию домен (K-coil) (**KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE (SEQ ID NO:38)**) и С-конец.

[00388] Таким образом, вторая полипептидная цепь TRIDENT-A6 состоит из: SEQ ID NO:56 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:38.

[00389] Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи **TRIDENT-A6** представляет собой (**SEQ ID NO:136**):

EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQOK PGQAPRLLIY
 GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
 QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL QESGPGLVKP SETLSLTCTV SGGSISSYYW
 5 SWIRQPPGKG LEWIGRIYTS GSTNYNPSLK SRVTMSVDTS KNQFSLKLSS
 VTAADTAVYY CARDGWYDED YNYYGMDVWG QGTTVTVSSG GCGGGKVAAL
 KEKVAALKEK VAALKEKVAAL LKE

[00390] Специально предполагается, что могут использоваться альтернативные первая и вторая полипептидные цепи **TRIDENT-A6**, которые содержат обеспечивающие гетеродимеризацию домены (E-coil и K-coil), содержащие цистеиновый остаток (например, EVAACSEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:39) и KVAACKE-KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE (SEQ ID NO:40)). В таких альтернативных молекулах **TRIDENT-A6** первая полипептидная цепь иногда состоит из: SEQ ID NO:56—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146, и вторая полипептидная цепь иногда состоит из

15 SEQ ID NO:56—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40.

[00391] Третья полипептидная цепь **TRIDENT-A6** является такой же, как третья полипептидная цепь **TRIDENT-A4** (SEQ ID NO:131).

[00392] Четвертая полипептидная цепь **TRIDENT-A6** является такой же, как четвертая полипептидная цепь **TRIDENT-A4** (SEQ ID NO:132).

20 5. TRIDENT-B1

[00393] **TRIDENT-B1** представляет собой трехвалентную **CD137 x CD137 x OA-связывающую молекулу**, содержащую два сайта связывания CD137 и один сайт связывания репрезентативного **OA**, HER2. **TRIDENT-B1** состоит из четырех полипептидных цепей (см. **Фигуру 3А**, где VL1/VH1 (сайт А) являются такими же, как

25 VL2/VH2 (сайт В), и связываются с CD137, и VL3/VH3 (сайт С) связывается с HER2). **TRIDENT-B1** содержит связывающие домены **MAВ-6 против CD137 (1.1)** и **MAВ-1 против hHER2 (1.3)**.

[00394] Первая полипептидная цепь **TRIDENT-B1** является такой же, как первая полипептидная цепь **TRIDENT-A** (SEQ ID NO:127).

30 [00395] Вторая полипептидная цепь **TRIDENT-B1** является такой же, как вторая полипептидная цепь **TRIDENT-A** (SEQ ID NO:128).

[00396] Специально предполагается, что могут использоваться альтернативные первая и вторая полипептидные цепи **TRIDENT-B1**, которые содержат обеспечивающие гетеродимеризацию домены (E-coil и K-coil), содержащие цистеиновый остаток

(например, EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:39) и KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:40)). В таких альтернативных молекулах **TRIDENT-B1** первая полипептидная цепь иногда состоит из: SEQ ID NO:85 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:39 — SEQ ID NO:21 — SEQ ID NO:146, и вторая полипептидная цепь иногда состоит из SEQ ID NO:85 — SEQ ID NO:16 — SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:40.

[00397] Третья полипептидная цепь **TRIDENT-B1** содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец, VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с HER2 (VH_{HER2} (**VH1 MAB-1 против hHER2, SEQ ID NO:80**)), CH1-домен IgG1 человека (SEQ ID NO:3), шарнирный участок IgG1 человека (SEQ ID NO:7) и содержащие «впадину» CH2- и CH3-домен, содержащие замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/H435R (SEQ ID NO:149).

[00398] Таким образом, третья полипептидная цепь **TRIDENT-B1** состоит из: SEQ ID NO:80 — SEQ ID NO:3 — SEQ ID NO:7 — SEQ ID NO:149.

[00399] Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи **TRIDENT-B1** представляет собой (SEQ ID NO:153):

```
QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTNIGEPTY TEEFKGRVTM TRDTSISTAY MELSRLRSDD TAVYYCARD
GYGNRVSYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
20 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY
ICNVNHKPSN TKVDKRVKPK SCDKTHTCP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
DTLYITREPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
YTLPPSREEM TKNQVSLSCA VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPV
25 DSDGSFFLVS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNRYTQ KSLSLSPGK
```

[00400] Четвертая полипептидная цепь **TRIDENT-B1** содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с HER2 (VL_{HER2} (**VL3 MAB-1 против hHER2, SEQ ID NO:85**)), CL-домен каппа-цепи IgG человека (SEQ ID NO:1) и C-конец.

[00401] Таким образом, четвертая полипептидная цепь **TRIDENT-B1** состоит из: SEQ ID NO:85 — SEQ ID NO:1.

[00402] Аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи **TRIDENT-B1** представляет собой (SEQ ID NO:154):

DIQMTQSPSS LSASVGDVRT ITCKASQDIS NYLSWFQQKP GKAPKTLIYR
ANRLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCLQ HDEFPWTFGQ
GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC

5

6. TRIDENT-B2

[00403] **TRIDENT-B2** представляет собой трехвалентную **CD137 x CD137 x OA-связывающую молекулу**, содержащую два сайта связывания CD137 и один сайт связывания репрезентативного **OA**, HER2. **TRIDENT-B1** состоит из четырех полипептидных цепей (см. **Фигуру 3А**, где VL1/VH1 (сайт А) являются такими же, как VL3/VH3 (сайт С), и связываются с CD137, и VL2/VH2 (сайт В) связываются с HER2). **TRIDENT-B1** содержит связывающие домены **MAВ-6 против CD137 (1.1)** и **MAВ-1 против hHER2 (1.3)**.

10

15

[00404] Первая полипептидная цепь **TRIDENT-B2** является такой же, как первая полипептидная цепь **DART-B1 (SEQ ID NO:143)**.

[00405] Вторая полипептидная цепь **TRIDENT-B2** является такой же, как вторая полипептидная цепь **DART-B1 (SEQ ID NO:144)**.

20

25

[00406] Специально предполагается, что могут использоваться альтернативные первая и вторая полипептидные цепи **TRIDENT-B2**, которые содержат обеспечивающие гетеродимеризацию домены (E-coil и K-coil), содержащие цистеиновый остаток (например, EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:39**) и KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:40**)). В таких альтернативных молекулах **TRIDENT-B2** первая полипептидная цепь иногда состоит из: **SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:39 – SEQ ID NO:21 – SEQ ID NO:146**, и вторая полипептидная цепь иногда состоит из **SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40**.

30

[00407] Третья полипептидная цепь **TRIDENT-B2** содержит в направлении от N-конца к С-концу: N-конец, VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VH_{CD137}) (**VH1 MAВ-6 против CD137 (SEQ ID NO:46)**), CH1-домен IgG1 человека (**SEQ ID NO:3**), шарнирный участок IgG1 человека (**SEQ ID NO:7**) и содержащие «впадину» CH2- и CH3-домен, содержащие замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/H435R (**SEQ ID NO:149**).

[00408] Таким образом, третья полипептидная цепь TRIDENT-B2 состоит из: SEQ ID NO:46 — SEQ ID NO:3 — SEQ ID NO:7 — SEQ ID NO:149.

[00409] Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи TRIDENT-B2 представляет собой (SEQ ID NO:155):

5 QVQLQESGPG LVKPSSETLSL TCTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGR
IYTSGSTNYN PSLKSRVTMS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDGW
YDEDYNYGGM DVWGQGTMTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
10 PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LSCAVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLVSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN RYTQKSLSL
PGK

15 [00410] Четвертая полипептидная цепь TRIDENT-B2 содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CD137 (VL_{CD137}) (VL1 МАВ-6 против CD137 (SEQ ID NO:50)), CL-домен каппа-цепи IgG человека (SEQ ID NO:1) и C-конец.

[00411] Таким образом, четвертая полипептидная цепь TRIDENT-B2 состоит из:
20 SEQ ID NO:50 — SEQ ID NO:1.

[00412] Аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи TRIDENTB2 представляет собой (SEQ ID NO:156):

25 EDFAVYYCQQ DYDLPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA
SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

C. Альтернативные CD137 x OA-связывающие молекулы

[00413] Как очевидно исходя из настоящего изобретения, могут быть сконструированы дополнительные CD137 x OA-связывающие молекулы, имеющие общую структуру согласно любой из указанных выше репрезентативных молекул и
30 содержащие сайт связывания альтернативного OA, с использованием VL- и VH-доменов альтернативных антител против опухолевого антигена вместо VL- и VH-доменов антитела против PD-L1 или антитела против HER2. Подобным образом, как предложено в настоящей заявке, могут быть также сконструированы альтернативные CD137 x OA-
35 связывающие молекулы, содержащие альтернативные линкеры и/или обеспечивающие гетеродимеризацию домены и/или константные участки антитела (например, CL, CH2-CH3-домен).

D. Контрольные молекулы

[00414] Для того, чтобы более наглядно продемонстрировать свойства **CD137 x OA-связывающих молекул** согласно настоящему изобретению, в настоящей заявке описаны антитела сравнения и контрольные антитела, VL- и VH-домены которых могут применяться для получения контрольных Fc-содержащих диател и других молекул сравнения и контрольных связывающих молекул.

[00415] Паливизумаб (см., например, базу данных белковых структур Protein Data Bank (PDB), ID № 2HWZ) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело (IgG), направленное против эпитопа в А-антигенном сайте F-белка RSV и представляющее собой подходящее контрольное антитело, VL- и VH-домены которого могут применяться для получения контрольных диател и других контрольных связывающих молекул. Альтернативные антитела против F-гликопротеина RSV включают мотавизумаб (см., например, PDB ID № 3IXT) и вариант паливизумаба, сконструированный таким образом, чтобы цистеиновые остатки были удалены из CDR 1 легкой цепи. Вариант паливизумаба использовали для создания молекулы отрицательного контроля, описанной ниже.

[00416] Аминокислотная последовательность VH-домена варианта паливизумаба представляет собой (**SEQ ID NO:137**) (остатки CDR_H подчеркнуты):

QVTLRSEGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSL TSGMSVGWIR QPPGKALEWL
ADIWWDDKKD YNPSLKSRLT ISKDTSKNQV VLKVTNMDPA DTATYYCARS
MITNWYFDVW GAGTTVTVSS

[00417] Аминокислотная последовательность VL-домена варианта паливизумаба представляет собой (**SEQ ID NO:138**) (остатки CDR_L подчеркнуты):

DIQMTQSPST LSASVGDVVT ITCRASQSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT
SKLASGVPSR FSGSGGTEF TLTISLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG
TKLEIK

[00418] Несколько молекул, содержащих сайт связывания эпитопа ранее описанных антител против CD137, включая урелумаб (также известный как BMS-663513, см., патент США № 8 137 667) и утомилумаб (также известный как PF-05082566, см., патент США № 8 337 850), а также мышинное и гуманизированное MAB-3 против hCD137 (см. публикацию международной заявки WO 2018/156740), используются в настоящей заявке для сравнения. Аминокислотная последовательность полноразмерных тяжелой и легкой цепей урелумаба (WHO Drug Information, 2011, Recommended INN: List 66, 25(3):334) и утомилумаба (WHO Drug Information, 2017, Recommended INN: List 77,

31(1):140-141) известны в данной области техники. Аминокислотные последовательности VH- и VL-доменов гуманизированного **MAВ-3 против hCD137 (1В.3)**, используемого в качестве молекулы сравнения в настоящей заявке, предложены в публикации международной заявки WO 2018/156740, см. параграфы [00254] и [00261].

5 **Е. Краткое описание CD137 х ОА-связывающих и контрольных молекул**

[00419] В **Таблице 5** суммированы характеристики доменов **DART-A – DART-A9, TRIDENT-A и TRIDENT-A4-A6:**

Таблица 5					
Название (количество цепей)	Исходные mAb	Fc-домен	№ цепи	SEQ ID NO.	Другие компоненты
DART-A (4 цепи)	MAВ-2 против hPD-L1 (1.1) MAВ-6 против CD137 (1.1)	IgG1 (AA/YTE)	1	116	Домены E/K-coil
			2	117	
			3	116	
			4	117	
DART-A1 (4 цепи)	MAВ-2 против hPD-L1 (2.1) MAВ-6 против CD137 (1.1)	IgG1 (AA/YTE)	1	118	Домены E/K-coil
			2	119	
			3	118	
			4	119	
DART-A2 (4 цепи)	MAВ-2 против hPD-L1 (2.2) MAВ-6 против CD137 (1.1)	IgG1 (AA/YTE)	1	120	Домены E/K-coil
			2	119	
			3	120	
			4	119	
DART-A3 (4 цепи)	MAВ-2 против hPD-L1 (3.1) MAВ-6 против CD137 (1.1)	IgG1 (AA/YTE)	1	118	Домены E/K-coil
			2	121	
			3	118	
			4	121	
DART-A4 (4 цепи)	MAВ-2 против hPD-L1 (3.2) MAВ-6 против CD137 (1.1)	IgG1 (AA/YTE)	1	120	Домены E/K-coil
			2	121	
			3	120	
			4	121	
DART-A5 (4 цепи)	MAВ-2 против hPD-L1 (3.2) MAВ-6 против CD137 (1.2)	IgG1 (AA/YTE)	1	120	Домены E/K-coil
			2	122	
			3	120	
			4	122	
DART-A6 (4 цепи)	MAВ-2 против hPD-L1 (3.2) MAВ-6 против CD137 (1.3)	IgG1 (AA/YTE)	1	120	Домены E/K-coil
			2	123	
			3	120	
			4	123	
DART-A7 (4 цепи)	MAВ-2 против hPD-L1 (4.2) MAВ-6 против CD137 (1.1)	IgG1 (AA/YTE)	1	120	Домены E/K-coil
			2	124	
			3	120	
			4	124	
DART-A8 (4 цепи)	MAВ-2 против hPD-L1 (5.2) MAВ-6 против CD137 (1.1)	IgG1 (AA/YTE)	1	120	Домены E/K-coil
			2	125	
			3	120	
			4	125	
DART-A9 (4 цепи)	MAВ-2 против hPD-L1 (6.2) MAВ-6 против CD137 (1.1)	IgG1 (AA/YTE)	1	120	Домены E/K-coil
			2	126	
			3	120	
			4	126	
DART-A10 (4 цепи)	MAВ-2 против hPD-L1 (4.2) MAВ-6 против CD137 (1.3)	IgG1 (AA/YTE)	1	120	Домены E/K-coil
			2	139	
			3	120	
			4	139	
DART-B1	MAВ-1 против hHER2 (1.3) MAВ-6 против CD137 (1.1)	IgG1 (AA/YTE) (выступ/впадина)	1	143	Домены E/K-coil
			2	144	
			3	145	
DART-B2	MAВ-1 против hHER2 (1.3) MAВ-6 против CD137 (1.1)	IgG1 (AA/YTE)	1	151	Домены E/K-coil
			2	152	
			3	151	
			4	152	
TRIDENT-A			1	127	

Таблица 5					
Название (количество цепей)	Исходные mAb	Fc-домен	№ цепи	SEQ ID NO.	Другие компоненты
(4 цепи)	MAV-2 против hPD-L1 (1.1) MAV-6 против CD137 (1.1)	IgG1 (AA/YTE) (выступ/впадина)	2	128	CL/CH1 и домены E/K-coil
			3	129	
			4	130	
TRIDENT-A4 (4 цепи)	MAV-2 против hPD-L1 (3.2) MAV-6 против CD137 (1.1)	IgG1 (AA) (выступ/впадина)	1	127	CL/CH1 и домены E/K-coil
			2	128	
			3	131	
			4	132	
TRIDENT A5 (4 цепи)	MAV-2 против hPD-L1 (3.2) MAV-6 против CD137 (1.2)	IgG1 (AA) (выступ/впадина)	1	133	CL/CH1 и домены E/K-coil
			2	134	
			3	131	
			4	132	
TRIDENT-A6	MAV-2 против hPD-L1 (3.2) MAV-6 против CD137 (1.3)	IgG1 (AA) (выступ/впадина)	1	135	CL/CH1 и домены E/K-coil
			2	136	
			3	131	
			4	132	
TRIDENT-B1	MAV-1 против hHER2 (1.3) MAV-6 против CD137 (1.1)	IgG1 (AA) (выступ/впадина)	1	127	CL/CH1 и домены E/K-coil
			2	128	
			3	153	
			4	154	
TRIDENT-B2	MAV-1 против hHER2 (1.3) MAV-6 против CD137 (1.1)	IgG1 (AA) (выступ/впадина)	1	143	CL/CH1 и домены E/K-coil
			2	144	
			3	155	
			4	156	

[00420] В **Таблице 6** показаны характеристики дополнительных молекул DART и TRIDENT, которые были получены в качестве молекул сравнения и отрицательных контролей:

Таблица 6			
Название (количество цепей)	Исходные mAb	Fc-домен	Другие компоненты
DART-1 (4 цепи)	MAV-2 против hPD-L1 (1.1) вариант паливизумаба	IgG1 (AA/YTE)	Такой же как DART-A за исключением того, что содержит VH/VL варианта паливизумаба вместо VH/VL MAV-6 против CD137 (1.1)
DART-2 (4 цепи)	MAV-2 против hPD-L1 (1.1) CD137 MAV-2	IgG1 (AA)	Такой же как DART-A за исключением того, что содержит VH/VL MAV-2 против CD137 вместо VH/VL MAV-3 против hCD137 (1B.3)

Таблица 6			
Название (количество цепей)	Исходные mAb	Fc-домен	Другие компоненты
DART-3 (4 цепи)	MAВ-2 против hPD-L1 (1.1) VL/VL утомилумаба	IgG1 (AA)	Такой же как DART-A, за исключением того, что содержит VH/VL утомилумаба вместо VH/VL hMAВ-6 против CD137 (1.1)
DART-4 (3 цепи)	вариант паливизумаба MAВ-6 против CD137 (1.1)	IgG1 (AA) (выступ/впадина)	Такой же как DART-B1, за исключением того, что содержит VH/VL варианта паливизумаба вместо VH/VL MAВ-1 против hHER2 (1.3)
DART-5 (4 цепи)	вариант паливизумаба MAВ-6 против CD137 (1.1)	IgG1 (AA)	Такой же как DART-B2, за исключением того, что содержит VH/VL варианта паливизумаба вместо VH/VL MAВ-1 против hHER2 (1.3)
TRIDENT-2 (4 цепи)	MAВ-2 против hPD-L1 (1.1) MAВ-3 против hCD137 (1B.3)	IgG1 (AA) (выступ/впадина)	Такой же как TRIDENT-A, за исключением того, что содержит VH/VL MAВ-3 против hCD137 (1B.3) вместо VH/VL MAВ6 против CD137 (1.1) , SEQ ID NO:19 для линкера 2 и цистеин-содержащие домены гетеродимеризации (полноразмерные последовательности см. в параграфах [00306]-[00311] публикации международной заявки WO 2020/041404)
TRIDENT-3	вариант паливизумаба MAВ-6 против CD137 (1.1)	IgG1 (AA) (выступ/впадина)	Такой же как TRIDENT-B1, за исключением того, что содержит VH/VL варианта паливизумаба вместо VH/VL MAВ-1 против hHER2 (1.3)
TRIDENT-4	вариант паливизумаба MAВ-6 против CD137 (1.1)	IgG1 (AA) (выступ/впадина)	Такой же как TRIDENT-B2, за исключением того, что содержит VH/VL VH/VL варианта паливизумаба вместо VH/VL MAВ-1 против hHER2 (1.3)

III. Способы получения

[00421] Связывающие молекулы согласно изобретению могут быть получены рекомбинантным путем и экспрессированы с использованием способа, известного в данной области техники. Такие молекулы могут быть созданы рекомбинантным путем посредством получения нуклеиновых кислот, кодирующих связывающие молекулы, и использования указанных нуклеиновых кислот для создания векторов, применимых для рекомбинантной экспрессии молекул в клетках-хозяевах (например, клетках CHO). Другой способ, который можно использовать, представляет собой экспрессию молекул в растениях (например, табаке) или трансгенном молоке.

10 [00422] Векторы, содержащие интересующие полинуклеотиды (например, полинуклеотиды, кодирующие полипептидные цепи связывающих молекул согласно настоящему изобретению) можно вводить в клетку-хозяина с помощью любого из ряда подходящих способов, включая электропорацию, бомбардировку микрочастицами,

липофекцию и инфекцию (например, когда вектор представляет собой инфекционный агент, такой как вирус коровьей оспы). Методы введения нуклеиновой кислоты или векторов в клетки-хозяева являются общепризнанными в данной области техники, и может применяться любой подходящий метод.

5 [00423] Можно применять любую клетку-хозяина, способную к гиперэкспрессии гетерологичной ДНК, в целях экспрессии интересующей связывающей молекулы (например, антитела, диатела, трехвалентной связывающей молекулы). Неограничивающие примеры подходящих клеток-хозяев млекопитающих включают, но не ограничиваются указанными, клетки COS, NSO, HEK-293, HeLa и CHO. Способы
10 культивирования клеток-хозяев хорошо известны в данной области техники.

[00424] Связывающие молекулы, как правило, выделяют и/или очищают из клетки-хозяина, культуральных сред и т.д. Методы очистки рекомбинантных связывающих молекул, содержащих домены антитела (например, Fc-домены), хорошо известны в
данной области техники и включают, например, применение высокоэффективной
15 жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), жидкостной хроматографии быстрого разрешения (ЖХБР) или аффинной хроматографии (например, с использованием белка А или белка G). После очистки связывающие молекулы согласно изобретению могут быть представлены в виде фармацевтической композиции, необязательно с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом или другим веществами, как описано ниже.

20 IV. Фармацевтические композиции

[00425] Композиции согласно изобретению включают нерасфасованные композиции лекарственного средства, применимые в изготовлении фармацевтических композиций (например, неочищенные или нестерильные композиции), и фармацевтические композиции (т.е. композиции, которые подходят для введения субъекту или пациенту),
25 которые могут применяться в приготовлении единичной формы дозирования. Такие композиции содержат **CD137 x OA-связывающую молекулу** согласно настоящему изобретению или комбинацию таких агентов и фармацевтически приемлемый носитель. Как предложено в настоящей заявке, композиции согласно изобретению содержат профилактически или терапевтически эффективное количество **CD137 x OA-**
30 **биспецифичного Fc-содержащего диатела** согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

- [00426] Изобретение также включает фармацевтические композиции, содержащие **CD137 x OA-связывающие молекулы** согласно изобретению и одну или более дополнительных молекул, которые являются эффективными для стимуляции иммунного ответа (например, ингибитор контрольной точки иммунитета), и/или в комбинации с одной или более дополнительными молекулами, которые специфично связываются с опухолевым антигеном (например, опухоль-специфичным моноклональным антителом или диателом), специфичными в отношении по меньшей мере одного конкретного **OA**, как описано выше, и фармацевтически приемлемый носитель.
- 5
- 10 [00427] Согласно конкретному варианту реализации изобретения, термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или перечисленный в фармакопее США или другой в целом признанной фармакопее для применения у животных и, более конкретно, у людей. Термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту
- 15 (например, адъювант Фрейнда (полному или неполному), вспомогательному веществу или наполнителю, с которым вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости. Водные носители, такие как солевые растворы, водные растворы декстрозы и глицерина, являются предпочтительными при внутривенном введении фармацевтической композиции.
- 20 [00428] В целом, ингредиенты композиции согласно изобретению обеспечиваются либо по отдельности, либо в смешанном виде в единичной форме дозирования, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата или в жидкой форме в герметично запечатанном контейнере, таком как ампула или пакет-саше, с указанием количества активного агента. Когда композицию предполагается
- 25 вводить путем инфузии, ее можно диспергировать с использованием инфузионной бутылки, содержащей стерильную воду или солевой раствор фармацевтической степени чистоты. При введении композиции путем инъекции могут быть предложены ампулы со стерильной водой для инъекций или солевым раствором таким образом, чтобы ингредиенты можно было смешивать перед введением.
- 30 [00429] Изобретение также обеспечивает фармацевтическую упаковку или набор, содержащий один или более контейнеров, содержащих **CD137 x OA-связывающую молекулу** согласно настоящему изобретению отдельно или с другими агентами, например, с фармацевтически приемлемым носителем. Дополнительно, один или более

других профилактических или терапевтических агентов, применимых для лечения заболевания, также могут быть включены в указанную фармацевтическую упаковку или набор. Изобретение также обеспечивает фармацевтическую упаковку или набор, содержащий один или более контейнеров, заполненных одним или более из ингредиентов фармацевтической композиции согласно изобретению. Не обязательно с таким контейнером (контейнерами) может быть связано примечание в форме, предписанной государственным органом, контролирующим изготовление, применение и продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, где указанное примечание отражает одобрение указанным органом изготовления, применения или реализации указанной композиции для введения человеку.

[00430] Набор может содержать **CD137 x OA-связывающую молекулу** согласно изобретению. Набор может дополнительно содержать один или более других профилактических и/или терапевтических агентов, применимых для лечения рака, в одном или более контейнерах и/или набор может дополнительно содержать одно или более цитотоксических антител, которые связываются с одним или более опухолевыми антигенами (**OA**). Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, другой профилактический или терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент. Согласно другим вариантам реализации изобретения, профилактический или терапевтический агент представляет собой биологическое или гормональное терапевтическое средство.

V. Способы введения

[00431] Композиции согласно настоящему изобретению могут быть предложены для лечения, профилактики и облегчения одного или более симптомов, связанных с раком или другим заболеванием или расстройством, путем введения субъекту эффективного количества молекулы согласно изобретению или фармацевтической композиции, содержащей молекулу согласно изобретению. Согласно одному аспекту, такие композиции являются по существу очищенными (т.е. по существу свободны от веществ, которые ограничивают их эффект или производят нежелательные побочные эффекты). Согласно конкретному варианту реализации изобретения, субъект представляет собой животное. Согласно другому конкретному варианту реализации изобретения, субъект представляет собой млекопитающее, такое как не представляющее собой примата млекопитающее (например, корову, лошадь, кошку, собаку, грызунов и т.д.) или представляющее собой примата (например, обезьяну, такую как макак-крабоед,

человека и т.д.). Согласно другому варианту реализации изобретения, субъект представляет собой человека.

[00432] Способы введения молекулы согласно изобретению включают, но не ограничиваются указанными, парентеральное введение (например, внутрискожное, внутримышечное, внутривбрюшинное, внутривенное и подкожное), эпидуральное и слизистое (например, интраназальное и пероральное введение). Согласно конкретному варианту реализации изобретения, **CD137 х ОА-связывающие молекулы** согласно изобретению вводят внутримышечно, внутривенно или подкожно. Композиции можно вводить с помощью любого удобного способа, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем адсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, через слизистую ротовой полости, слизистую прямой кишки или кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным.

[00433] Изобретение также обеспечивает **CD137 х ОА-связывающие молекулы** согласно изобретению, упакованные в герметично запечатанный контейнер, такой как ампула или пакет-саше, с указанием количества данной молекулы. Согласно одному варианту реализации изобретения, **CD137 х ОА-связывающие молекулы** согласно изобретению обеспечиваются в виде сухого стерилизованного лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично запечатанном контейнере и могут быть восстановлены, например, с помощью воды или солевого раствора до подходящей концентрации для введения субъекту. Лиофилизированные **CD137 х ОА-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению следует хранить при температуре между 2 и 8°C в исходном контейнере и молекулы следует вводить в пределах 12 часов, в пределах 6 часов, в пределах 5 часов, в пределах 3 часов или в пределах 1 часа после их восстановления.

[00434] Согласно альтернативному варианту реализации изобретения, **CD137 х ОА-связывающие молекулы** согласно изобретению обеспечиваются в жидкой форме в герметично запечатанном контейнере с указанием количества и концентрации указанной молекулы, белка слияния или конъюгированной молекулы. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, жидкие формы **CD137 х ОА-связывающих молекул** согласно изобретению обеспечиваются в герметично запечатанном контейнере и не требуют восстановления.

[00435] Количество композиции согласно изобретению, которое будет эффективным для лечения, предотвращения или облегчения одного или более симптомов, связанных с расстройством, можно определять с помощью стандартных клинических методов. Точная доза для применения в лекарственной форме также будет зависеть от способа введения и тяжести состояния и будет определяться в соответствии с решением практикующего врача и обстоятельствами каждого пациента. Эффективные дозы могут быть выведены на основе кривых зависимости ответа от дозы, полученных с использованием тест-систем *in vitro* или на животных моделях.

5 [00436] При использовании в настоящей заявке «**эффективное количество**» фармацевтической композиции, согласно одному варианту реализации изобретения, представляет собой количество, достаточное для обеспечения благоприятных или желаемых результатов, включая, но не ограничиваясь указанными, клинические результаты, такие как снижение симптомов, которые являются результатом заболевания, ослабление симптома заболевания (например, пролиферации раковых клеток, наличия опухоли, опухолевых метастазов и т.д.), приводящих, таким образом, к повышению качества жизни указанных страдающих заболеванием субъектов, снижению дозы других лекарственных препаратов, требуемых для лечения указанного заболевания, усилению эффекта другого лекарственного препарата, например, путем нацеливания и/или интернализации, задержке прогрессирования заболевания и/или продления выживаемости индивидов.

15 [00437] Такое эффективное количество можно вводить посредством одного или более введений. В контексте настоящего изобретения эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для прямого или непрямого снижения пролиферации вируса (или эффекта его присутствия) и для снижения и/или задержки развития заболевания (например, рака). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции может достигаться или не достигаться вместе с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической композицией. Таким образом, «эффективное количество» можно рассматривать в контексте введения одного или более дополнительных агентов (например, химиотерапевтических агентов или других агентов, которые считаются стандартом лечения для конкретного состояния), и может считаться, что один агент вводится в эффективном количестве, если совместно с

одним или более другими агентами может быть достигнут желаемый результат. Поскольку требования субъектов различаются, определение оптимальных диапазонов эффективного количества каждого компонента может быть определено специалистом в данной области техники.

5 [00438] Для **CD137 х ОА-связывающих молекул**, включенных согласно изобретению, доза, вводимая пациенту, может быть определена на основе массы тела (кг) субъекта, являющегося реципиентом, или альтернативно, может быть определена на основе фиксированной дозы.

10 [00439] Дозу и частоту введения **CD137 х ОА-связывающих молекул** согласно настоящему изобретению можно снижать или изменять посредством усиления захвата и проникновения в ткани **CD137 х ОА-связывающих молекул** с помощью модификации, такой как, например, липидизация.

15 [00440] Доза **CD137 х ОА-связывающих молекул** согласно изобретению, вводимая пациенту, может быть рассчитана для применения указанной молекулы в качестве монотерапии. Альтернативно, **CD137 х ОА-связывающие молекулы** согласно изобретению применяются в комбинации с другими терапевтическими композициями таким образом, что доза, вводимая пациенту, снижена по сравнению с применением указанных молекул в качестве монотерапии.

20 [00441] Лечение субъекта терапевтически или профилактически эффективным количеством **CD137 х ОА-связывающих молекул** согласно изобретению может включать один курс лечения или может включать серию курсов лечения. В одном примере субъекту проводят лечение с помощью молекулы согласно настоящему изобретению один раз в неделю, один раз в две недели (т.е. один раз каждую вторую неделю) или один раз в три недели в течение между примерно 1 и 52 неделями.

25 Фармацевтические композиции согласно изобретению можно вводить один раз в день, два раза в день или три раза в день. Альтернативно, фармацевтические композиции можно вводить один раз в неделю, два раза в неделю, один раз каждые две недели, один раз в месяц, один раз в шесть недель, один раз каждые два месяца, два раза в год или один раз в год. Также следует понимать, что эффективную дозу молекул, применяемых
30 для лечения, можно повышать или снижать на протяжении курса конкретного лечения.

VI. Способы применения композиций согласно изобретению

[00442] **CD137 x OA-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению обладают способностью связываются с Т-клетками (АПК) (например, путем связывания с CD137, экспрессируемым на поверхности таких Т-клеток) и способностью связываться с **OA**-экспрессирующими опухолевыми клетками (например, путем связывания с **OA**, экспрессируемым на поверхности таких опухолевых клеток). Таким образом, **CD137 x OA-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению обладают способностью обеспечивать солокализацию Т-клеток с **OA**-экспрессирующими опухолевыми клетками и, таким образом, могут применяться для лечения любого заболевания или состояния, связанного с экспрессией **OA** или характеризующегося экспрессией **OA**. Таким образом, фармацевтические композиции, содержащие такие молекулы, могут применяться, без ограничения, в диагностике или лечении раковых заболеваний, при которых экспрессируется **OA**, включая, но не ограничиваясь указанными: рак мочевого пузыря, рак кости, рак головного и спинного мозга, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой и прямой кишки, рак желчного пузыря или рак желчного протока, рак желудка, глиобластома, рак головы и шеи, гепатоклеточную карциному, рак почки, лейкоз, рак печени, рак легкого, меланому, нейробластома, немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ), рак яичников, рак поджелудочной железы, рак глотки, рак предстательной железы, почечно-клеточную карциному, рабдомиосаркому, рак кожи, плоскоклеточный рак головы и шеи (ПКРГШ), рак желудка, рак яичек, карциному вилочковой железы и рак матки, в частности, таких типов рака, при которых наблюдается экспрессия **OA** на высоком уровне.

[00443] **CD137 x OA-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению могут дополнительно применяться в изготовлении лекарственных средств для лечения описанных выше состояний.

[00444] Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, **CD137 x OA-связывающая молекула** согласно изобретению применяется в комбинации с одним или более другими профилактическими и/или терапевтическими агентами, применимыми для лечения рака. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, указанный другой профилактический или терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент. Согласно другим вариантам реализации, профилактический или терапевтический агент представляет собой биологический или гормональный терапевтический агент. Согласно другим вариантам

реализации, биологический терапевтический агент представляет собой цитотоксические молекулы на основе антитела, включая, но не ограничиваясь указанными, антитело, антиген-связывающий фрагмент антитела (например, scFv, Fab, F(ab)2 и т.д., TandAb и т.д.), мультиспецифичную связывающую молекулу (например, диатело, биспецифичное антитело, трехвалентную связывающую молекулу и т.д.), которая связывается с одним или более опухолевыми антигенами (ОА).

[00445] **CD137 x ОА-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению могут усиливать активность нацеленных на опухоль агентов. Соответственно, **CD137 x ОА-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению могут дополнительно применяться в комбинации с другими нацеленными на опухоль агентами, включая, но не ограничиваясь указанными, антитело, антиген-связывающий фрагмент антитела (например, scFv, Fab, F(ab)2 и т.д., TandAb и т.д.), мультиспецифичную связывающую молекулу (например, диатело, биспецифичное антитело, трехвалентную связывающую молекулу и т.д.), способную связываться с желаемым **ОА**. Специально предполагается, что нацеленный на опухоль агент может связываться с тем же или с другим **ОА** по сравнению с **CD137 x ОА-связывающей молекулой**, используемой в таких комбинациях. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, нацеленный на опухоль агент представляет собой мультиспецифичную молекулу, которая связывается с **ОА** и с эпитопом, экспрессируемым на Т-клетках, включая, например, **CD3** и/или **CD8**, и опосредует Т-клеточное перенаправленное уничтожение. Репрезентативные нацеленные на опухоль агенты включают, но не ограничиваются указанными, молекулы, которые связываются с **ОА** и **CD3** («**ОА x CD3**»). Репрезентативные **ОА x CD3-связывающие молекулы** (например, биспецифичные антитела, молекулы DART®, молекулы ViTe®, TandAb и т.д. и трехвалентные молекулы) и способы их создания, которые могут применяться в таких комбинациях, хорошо известны в данной области техники (см., например, публикации международных заявок WO 2013/026835, WO 2013/158856, WO 2014/047231; WO 2014/110601; WO 2014/131711; WO 2015/026894; WO 2015/026892; WO 2015/184203; WO 2015/184207; WO 2016/036937; WO 2016/182751; WO 2017091656; WO 2017/142928; WO 2017/118675).

[00446] Применение **CD137 x ОА-связывающих молекул** согласно настоящему изобретению в комбинации с нацеленным на опухоль агентом (например, **ОА x CD3-связывающей молекулой**) может приводить к стимуляции ингибиторного иммунного модулятора, представляющего собой белок программируемой клеточной гибели 1 («**PD-**

1», также известный как «CD279»). Ингибирование иммунной системы белком PD-1 опосредуется его связыванием с **PD-L1** и **PD-L2** (также известными как B7-H1 и B7-DC) (Flies, D.B. *et al.* (2007) “*The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity*,” J. Immunother. 30(3):251-260; патенты США № 6 803 192; 7 794 710). Таким образом, добавление дополнительного агента, подавляющего ингибиторную активность PD-1 («**ингибитора контрольной точки PD-1/PD-L1**»), приводит к подавлению экспрессии PD-1 и может также усиливать активность нацеленных на **CD137 x OA** и нацеленных на опухоль агентов, таких как **OA x CD3-связывающие молекулы**. Изобретение, в частности, включает ингибиторы контрольной точки PD-1/PD-L1, содержащие сайт связывания эпитопа антитела, которое связывается с PD-1.

[00447] Соответственно, **CD137 x OA-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению могут также применяться в комбинации с другими нацеленными на опухоль агентами, дополнительно в комбинации с ингибитором контрольной точки PD-1/PD-L1. **Ингибиторы контрольной точки PD-1/PD-L1** включают, но не ограничиваются указанными, антитело, антиген-связывающий фрагмент антитела (например, scFv, Fab, F(ab)2 и т.д., TandAb и т.д.), мультиспецифичную связывающую молекулу (например, диатело, биспецифичное антитело, трехвалентную связывающую молекулу и т.д.), способную связываться с PD-1 и/или PD-L1. Репрезентативные **ингибиторы контрольной точки PD-1/PD-L1** и способы их создания, которые могут применяться в таких комбинациях, хорошо известны в данной области техники. **PD-1-связывающие молекулы**, применимые согласно способам настоящего изобретения, включают: ниволумаб (CAS Reg. № 946414-94-4, также известный как 5C4, BMS-936558, ONO-4538, MDX-1106 и продаваемый под названием OPDIVO® компанией Bristol-Myers Squibb); пембролизумаб (ранее известный как ламбролизумаб, CAS Reg. № 1374853-91-4, также известный как MK-3475, SCH-900475 и продаваемый под названием KEYTRUDA® компанией Merck); цемиплимаб (CAS Reg. № 1801342-60-8, также известный как REGN-2810, SAR-439684 и продаваемый под названием LIBTAYO®). Аминокислотные последовательности полноразмерных тяжелой и легкой цепей ниволумаба (WHO Drug Information, 2013, Recommended INN: List 69, 27(1):68-69), пембролизумаба (WHO Drug Information, 2014, Recommended INN: List 75, 28(3):407) и цемиплимаба (WHO Drug Information 2018, Proposed INN: List 119) известны в данной области техники. Дополнительные антитела против PD-1 (например, **mAb 7 против hPD-1 (1,2)**,

обладающие уникальными характеристиками связывания, применимые в соответствии со способами и композициями согласно настоящему изобретению, были недавно идентифицированы (см. публикацию международной заявки на патент согласно РСТ № WO 2017/019846).

- 5 [00448] Когда применяются такие комбинации, специально предполагается, что одну или более из указанных молекул можно вводить субъекту «одновременно» (например, **CD137 x OA-связывающую молекулу** можно вводить в то же время, в которое вводят **OA x CD3-связывающую молекулу** и/или **ингибитор контрольной точки PD-1/PD-L1**) и/или что одну или более из указанных молекул можно вводить «последовательно»
10 (например, вводят **CD137 x OA-связывающую молекулу**, и затем вводят **OA x CD3-связывающую молекулу** и/или **ингибитор контрольной точки PD-1/PD-L1**, или наоборот).

VII. Варианты реализации изобретения

- [00449] Описанное в целом изобретение будет легче понять со ссылкой на следующие
15 далее пронумерованные варианты реализации («Е»), которые предложены в качестве иллюстрации и не ограничивают настоящее изобретение, если иное не указано:

E1. **CD137-связывающая молекула**, содержащая первый сайт связывания, который иммуноспецифично связывается с эпитопом CD137, где указанный первый сайт связывания содержит первый переменный домен легкой цепи, который
20 содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3}, и первый переменный домен тяжелой цепи, который содержит CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3}; где:

- (A) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} первого переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL1 MAB-6 против CD137 (SEQ ID NO:50)** и
25 (B) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} первого переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH1 MAB-6 против CD137 (SEQ ID NO:46)**.

E2. **CD137-связывающая молекула** по E1, характеризующаяся тем, что указанный первый переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную
30 последовательность: **VH1 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:46)**.

- Е3. **CD137-связывающая молекула** по любому из E1-E2, характеризующаяся тем, что указанный первый переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность:
- 5 (A) **VLx MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:54);**
(B) **VL1 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:50);**
(C) **VL2 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:55)** или
(D) **VL3 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:56).**
- Е4. **CD137-связывающая молекула** по любому из E1-E3, характеризующаяся тем, что:
- 10 (A) указанный первый переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VH1 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:46)** и
(B) указанный первый переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VL1 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:50).**
- 15
- Е5. **CD137-связывающая молекула** по любому из E1-E3, характеризующаяся тем, что:
- (A) указанный первый переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VH1 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:46)** и
- 20 (B) указанный первый переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VL3 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:56).**
- Е6. **CD137-связывающая молекула** по любому из E1-E5, характеризующаяся тем, что указанная молекула представляет собой биспецифичную молекулу, содержащую второй сайт связывания, который иммуноспецифично связывается с опухолевым антигеном (**ОА**), где указанный второй сайт связывания содержит второй переменный домен легкой цепи, который содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3}, и второй переменный домен тяжелой цепи, который содержит CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3}.
- 25
30
- Е7. **CD137-связывающая молекула** по Е6, характеризующаяся тем, что указанный **ОА** выбран из антигенов, представленных в **Таблицах 1-2**.

Е8. **CD137-связывающая молекула** по Е6, характеризующаяся тем, что указанный **ОА** представляет собой PD-L1, где:

- (A) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VLx MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:63)** и
- (B) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VHx MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:59)**.

Е9. **CD137-связывающая молекула** по Е8, характеризующаяся тем, что:

- (A) (1) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL1 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:63)** или
- (2) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VLx MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:58)** или
- (3) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:72)**

и

- (B) (1) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH1 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:59)**;
- (2) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VHx MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:57)**;
- (3) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:67)**;
- (4) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH3 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:68)**;

- (5) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:69)**;
- 5 (6) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:70)** или
- (7) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:71)**.
- 10 E10. **CD137-связывающая молекула** по E9, характеризующаяся тем, что указанный второй переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность:
- (A) **VHx MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:59)**;
- (B) **VH1 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:57)**;
- 15 (C) **VH2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:67)**;
- (D) **VH3 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:68)**;
- (E) **VH4 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:69)**;
- (F) **VH5 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:70)** или
- (G) **VH6 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:71)**.
- 20 E11. **CD137-связывающая молекула** по любому из E9 или E10, характеризующаяся тем, что указанный второй переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность:
- (A) **VLx MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:63)**;
- (B) **VL1 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:58)** или
- 25 (B) **VL2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:72)**.
- E12. **CD137-связывающая молекула** по любому из E10-E11, характеризующаяся тем, что:
- (A) указанный второй переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VHx MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:59)** и
- 30 (B) указанный второй переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VLx MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:63)**.

- 5 E13. **CD137-связывающая молекула** по любому из E10-E11, характеризующаяся тем, что:
- (A) указанный второй переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VH1 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:57)** и
 - (B) указанный второй переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VLx MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:63)**.
- 10 E14. **CD137-связывающая молекула** по любому из E10-E11, характеризующаяся тем, что:
- (A) указанный второй переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VH2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:67)** и
 - (B) указанный второй переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VLx MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:63)**.
- 15 E15. **CD137-связывающая молекула** по любому из E10-E11, характеризующаяся тем, что:
- (A) указанный второй переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VH3 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:68)** и
 - (B) указанный второй переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VLx MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:63)**.
- 20 E16. **CD137-связывающая молекула** по любому из E10-E11, характеризующаяся тем, что:
- (A) указанный второй переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VH4 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:69)** и
 - (B) указанный второй переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VLx MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:63)**.
- 25 30

- 5 E17. **CD137-связывающая молекула** по любому из E10-E11, характеризующаяся тем, что:
- (A) указанный второй переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VH5 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:70)** и
 - (B) указанный второй переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VLx MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:63)**.
- 10 E18. **CD137-связывающая молекула** по любому из E10-E11, характеризующаяся тем, что:
- (A) указанный второй переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VH6 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:71)**; и
 - (B) указанный второй переменный домен легкой цепи содержит
- 15 аминокислотную последовательность: **VLx MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:63)**.
- E19. **CD137-связывающая молекула** по любому из E10-E11, характеризующаяся тем, что:
- (A) указанный второй переменный домен тяжелой цепи содержит
- 20 аминокислотную последовательность: **VH1 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:57)** и
- (B) указанный второй переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VL1 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:58)**.
- 25 E20. **CD137-связывающая молекула** по любому из E10-E11, характеризующаяся тем, что:
- (A) указанный второй переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VH3 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:68)** и
- 30 (B) указанный второй переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VL2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:72)**.

- 5 E21. **CD137-связывающая молекула** по Е6, характеризующаяся тем, что **ОА** представляет собой 5Т4, где:
- (A) (1) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL MAB-1 против 5Т4 (SEQ ID NO:93)** и
- (2) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH MAB-1 против 5Т4 (SEQ ID NO:92)** или
- 10 (B) (1) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL MAB-2 против 5Т4 (SEQ ID NO:95)** и
- (2) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH MAB-2 против 5Т4 (SEQ ID NO:96)**.
- 15 E22. **CD137 x ОА-связывающая молекула** по E21, характеризующаяся тем, что второй переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VH MAB-1 против 5Т4 (SEQ ID NO:92)**.
- E23. **CD137 x ОА-связывающая молекула** по E21 или E22, характеризующаяся тем, что второй переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VL MAB-1 против 5Т4 (SEQ ID NO:93)**.
- 20 E24. **CD137-связывающая молекула** по Е6, характеризующаяся тем, что **ОА** представляет собой HER2, где:
- (A) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VLx MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:79)** и
- 25 (B) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VHx MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:78)**;
- E25. **CD137-связывающая молекула** E24, характеризующаяся тем, что:
- 30 (A) (1) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL1 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:83)**;

(2) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL2 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:84)** или

5

(3) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL3 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:85)**

и

10

(B) (1) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH1 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:80);**

(2) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH2 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:81)** или

15

(3) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH3 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:82).**

E26. **CD137-связывающая молекула** по E25, характеризующаяся тем, что указанный второй переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность:

20

(A) **VHx MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:78);**

(B) **VH1 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:80);**

(C) **VH2 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:81)** или

(D) **VH3 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:82).**

25

E27. **CD137-связывающая молекула** по любому из E25 или 26, где указанный второй переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность:

(A) **VLx MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:79);**

(B) **VL1 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:83);**

(C) **VL2 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:84)** или

30

(D) **VL3 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:85).**

- E28. **CD137-связывающая молекула** по любому из E24-E26, характеризующаяся тем, что:
- (A) (1) указанный второй переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VHx MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:78)** и
- 5 (2) указанный второй переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VLx MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:79)**
- или
- 10 (B) (1) указанный второй переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VH1 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:80)** и
- (2) указанный второй переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VL3 MAB-1 против**
- 15 **hHER2 (SEQ ID NO:85).**
- E29. **CD137-связывающая молекула** по любому из E1-E29, которая представляет собой антитело, биспецифичное антитело, биспецифичное бивалентное Fc-содержащее диатело или биспецифичное тетравалентное Fc-содержащее диатело или биспецифичную трехвалентную молекулу.
- 20 E30 **CD137-связывающая молекула** по любому из E1-E29, характеризующаяся тем, что указанная молекула является биспецифичной и бивалентной и содержит первую, вторую и третью полипептидную цепь, где указанные полипептидные цепи образуют ковалентно связанный комплекс.
- E31. **CD137-связывающая молекула** по любому из E1-E29, характеризующаяся тем,
- 25 что указанная молекула является биспецифичной и тетравалентной и содержит первую, вторую, третью и четвертую полипептидную цепь, где указанные полипептидные цепи образуют ковалентно связанный комплекс.
- E32. **CD137-связывающая молекула** по любому из E1-E29, характеризующаяся тем,
- 30 что указанная молекула является биспецифичной и трехвалентной и содержит первую, вторую, третью и четвертую полипептидную цепь, где указанные полипептидные цепи образуют ковалентно связанный комплекс.

Е33. **CD137-связывающая молекула** по Е31, характеризующаяся тем, что указанный **ОА** представляет собой PD-L1, где:

(A) указанные первая и третья полипептидные цепи содержат в направлении от N-конца к C-концу:

- 5 (i) **SEQ ID NO:63 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:39 – SEQ ID NO:30 – SEQ ID NO:43;**
- (ii) **SEQ ID NO:63 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:37 – SEQ ID NO:30 – SEQ ID NO:43;**
- 10 (iii) **SEQ ID NO:58 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:39 – SEQ ID NO:30 – SEQ ID NO:43;**
- (iv) **SEQ ID NO:58 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:37 – SEQ ID NO:30 – SEQ ID NO:43;**
- (v) **SEQ ID NO:72 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:39 – SEQ ID NO:30 – SEQ ID NO:43** или
- 15 (vi) **SEQ ID NO:72 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:37 – SEQ ID NO:30 – SEQ ID NO:43**

и

(B) указанные вторая и четвертая полипептидные цепи содержат в направлении от N-конца к C-концу:

- 20 (i) **SEQ ID NO:54 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:59 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40;**
- (ii) **SEQ ID NO:54 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:59 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:38;**
- (iii) **SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:57 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40;**
- 25 (iv) **SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:57 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:38;**
- (v) **SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:67 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40;**
- 30 (vi) **SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:67 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:38;**
- (vii) **SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:68 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40;**

- (viii) **SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:68 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:38;**
- (ix) **SEQ ID NO:55 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:68 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40;**
- 5 (x) **SEQ ID NO:55 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:68 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:38;**
- (xi) **SEQ ID NO:56 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:68 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40;**
- (xii) **SEQ ID NO:56 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:68 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:38;**
- 10 (xiii) **SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:69 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40;**
- (xiv) **SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:69 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:38;**
- 15 (xv) **SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:70 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40;**
- (xvi) **SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:70 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:38;**
- (xvii) **SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:71 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40;**
- 20 (xviii) **SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:71 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:38;**
- (xix) **SEQ ID NO:56 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:69 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40** или
- 25 (xx) **SEQ ID NO:56 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:69 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:38.**

Е34. **CD137-связывающая молекула** по Е31 или Е33, характеризующаяся тем, что указанный **ОА** представляет собой PD-L1, где:

- (А) указанные первая и третья полипептидные цепи содержат аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118** или **SEQ ID NO:120** и
- 30 (В) указанные вторая и четвертая полипептидные цепи содержат аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:119,**

SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:126 или SEQ ID NO:139.

Е35. CD137-связывающая молекула по Е34, характеризующаяся тем, что указанная молекула содержит:

- 5 (A) **SEQ ID NO:116 и SEQ ID NO:117;**
(B) **SEQ ID NO:118 и SEQ ID NO:119;**
(C) **SEQ ID NO:120 и SEQ ID NO:119;**
(D) **SEQ ID NO:118 и SEQ ID NO:121;**
(E) **SEQ ID NO:120 и SEQ ID NO:121;**
10 (F) **SEQ ID NO:120 и SEQ ID NO:122;**
(G) **SEQ ID NO:120 и SEQ ID NO:123;**
(H) **SEQ ID NO:120 и SEQ ID NO:124;**
(I) **SEQ ID NO:120 и SEQ ID NO:125;**
(J) **SEQ ID NO:120 и SEQ ID NO:126 или**
15 (K) **SEQ ID NO:120 и SEQ ID NO:139.**

Е36. CD137-связывающая молекула по Е32, характеризующаяся тем, что указанный ОА представляет собой PD-L1, где:

- (A) **указанная первая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к С-концу:**
- 20 (i) **SEQ ID NO:54 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:37 – SEQ ID NO:21 – SEQ ID NO:146;**
(ii) **SEQ ID NO:54 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:39 – SEQ ID NO:21 – SEQ ID NO:146;**
(iii) **SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:37 – SEQ ID NO:21 – SEQ ID NO:146;**
25 (iv) **SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:39 – SEQ ID NO:21 – SEQ ID NO:146;**
(v) **SEQ ID NO:55 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:37 – SEQ ID NO:21 – SEQ ID NO:146;**
30 (vi) **SEQ ID NO:55 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:39 – SEQ ID NO:21 – SEQ ID NO:146;**
(vi) **SEQ ID NO:56 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:37 – SEQ ID NO:21 – SEQ ID NO:146 или**

(vii) SEQ ID NO:56 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18
– SEQ ID NO:39 – SEQ ID NO:21 – SEQ ID NO:146;

(B) указанная вторая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:

5 (i) SEQ ID NO:54 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18
– SEQ ID NO:38;

(ii) SEQ ID NO:54 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18
– SEQ ID NO:40;

10 (iii) SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18
– SEQ ID NO:38;

(iv) SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18
– SEQ ID NO:40;

(v) SEQ ID NO:55 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18
– SEQ ID NO:38;

15 (vi) SEQ ID NO:55 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18
– SEQ ID NO:40;

(vi) SEQ ID NO:56 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18
– SEQ ID NO:38 или

20 (vii) SEQ ID NO:56 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18
– SEQ ID NO:40;

(C) указанная третья полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:

(i) SEQ ID NO:59 – SEQ ID NO:3 – SEQ ID NO:7 – SEQ ID NO:149;

(ii) SEQ ID NO:57 – SEQ ID NO:3 – SEQ ID NO:7 – SEQ ID NO:149;

25 (iii) SEQ ID NO:67 – SEQ ID NO:3 – SEQ ID NO:7 – SEQ ID NO:149;

(iv) SEQ ID NO:68 – SEQ ID NO:3 – SEQ ID NO:7 – SEQ ID NO:149;

(v) SEQ ID NO:69 – SEQ ID NO:3 – SEQ ID NO:7 – SEQ ID NO:149;

(vi) SEQ ID NO:70 – SEQ ID NO:3 – SEQ ID NO:7 – SEQ ID NO:149
или

30 (vii) SEQ ID NO:71 – SEQ ID NO:3 – SEQ ID NO:7 – SEQ ID NO:149

и

(D) указанная четвертая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:

(i) SEQ ID NO:63 – SEQ ID NO:1 или

(ii) **SEQ ID NO:72 – SEQ ID NO:1.**

Е37. **CD137-связывающая молекула** по Е32, характеризующаяся тем, что указанный **ОА** представляет собой PD-L1, где:

5 (A) указанная первая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к С-концу:

(i) **SEQ ID NO:54 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:59 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:37 – SEQ ID NO:21 – SEQ ID NO:146** или

(ii) **SEQ ID NO:54 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:59 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:39 – SEQ ID NO:21 – SEQ ID NO:146;**

10 (B) указанная вторая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к С-концу:

(i) **SEQ ID NO:63 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:38** или

(ii) **SEQ ID NO:63 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40;**

15 (C) указанная третья полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к С-концу:

(i) **SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:3 – SEQ ID NO:7 – SEQ ID NO:149**

и

20 (D) указанная четвертая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к С-концу:

(i) **SEQ ID NO:54 – SEQ ID NO:1** или

(ii) **SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:1.**

Е38. **CD137-связывающая молекула** по Е32 или Е36, характеризующаяся тем, что указанный **ОА** представляет собой PD-L1, где:

25 (A) указанная первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:133** или **SEQ ID NO:135;**

30 (B) указанная вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:134** или **SEQ ID NO:136;**

(C) указанная третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:129** или **SEQ ID NO:131** и

(D) указанная четвертая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:132**.

Е39. **CD137-связывающая молекула** по Е38, характеризующаяся тем, что указанная молекула содержит:

- 5 (A) **SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:129 и SEQ ID NO:130;**
(B) **SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:131 и SEQ ID NO:132;**
(C) **SEQ ID NO:133, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:131 и SEQ ID NO:132** или
(D) **SEQ ID NO:135, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:131 и SEQ ID NO:132.**

10 Е40. **CD137-связывающая молекула** по Е31, характеризующаяся тем, что указанный **ОА** представляет собой HER2, где:

- (A) указанные первая и третья полипептидные цепи содержат в направлении от N-конца к C-концу:
- 15 (i) **SEQ ID NO:79 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:39 – SEQ ID NO:30 – SEQ ID NO:43** или
(ii) **SEQ ID NO:79 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:37 – SEQ ID NO:30 – SEQ ID NO:43;**
(iii) **SEQ ID NO:85 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:39 – SEQ ID NO:30 – SEQ ID NO:43** или
(iv) **SEQ ID NO:85 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:37 – SEQ ID NO:30 – SEQ ID NO:43**
- 20

и

- (B) указанные вторая и четвертая полипептидные цепи содержат в направлении от N-конца к C-концу:
- 25 (i) **SEQ ID NO:54 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:78 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40;**
(ii) **SEQ ID NO:54 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:78 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:38.**
(iii) **SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:80 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40** или
(iv) **SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:80 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:38.**
- 30

Е41. **CD137-связывающая молекула** по Е32, характеризующаяся тем, что указанный **ОА** представляет собой HER2, где:

- (A) указанная первая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:
- (i) SEQ ID NO:54 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:37 – SEQ ID NO:21 – SEQ ID NO:146;
 - 5 (ii) SEQ ID NO:54 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:39 – SEQ ID NO:21 – SEQ ID NO:146;
 - (iii) SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:37 – SEQ ID NO:21 – SEQ ID NO:146 или
 - 10 (iv) SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:39 – SEQ ID NO:21 – SEQ ID NO:146;
- (B) указанная вторая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:
- (i) SEQ ID NO:54 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:38;
 - 15 (ii) SEQ ID NO:54 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40;
 - (iii) SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:38 или
 - 20 (iv) SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40;
- (C) указанная третья полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:
- (i) SEQ ID NO:78 – SEQ ID NO:3 – SEQ ID NO:7 – SEQ ID NO:149
или
 - 25 (ii) SEQ ID NO:80 – SEQ ID NO:3 – SEQ ID NO:7 – SEQ ID NO:149
- и
- (D) указанная четвертая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:
- (i) SEQ ID NO:79 – SEQ ID NO:1 или
 - 30 (ii) SEQ ID NO:85 – SEQ ID NO:1.

E42. CD137-связывающая молекула по E32, характеризующаяся тем, что указанный ОА представляет собой HER2, где:

- (A) указанная первая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:
- (i) SEQ ID NO:54 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:78 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:37 – SEQ ID NO:21 – SEQ ID NO:146;
 - 5 (ii) SEQ ID NO:54 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:78 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:39 – SEQ ID NO:21 – SEQ ID NO:146;
 - (iii) SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:80 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:37 – SEQ ID NO:21 – SEQ ID NO:146 или
 - (iv) SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:39 – SEQ ID NO:21 – SEQ ID NO:146;
 - 10
- (B) указанная вторая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:
- (i) SEQ ID NO:79 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:38;
 - 15 (ii) SEQ ID NO:79 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40;
 - (iii) SEQ ID NO:85 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:38 или
 - (iv) SEQ ID NO:85 – SEQ ID NO:16 – SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:40;
 - 20
- (C) указанная третья полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:
- (i) SEQ ID NO:46 – SEQ ID NO:3 – SEQ ID NO:7 – SEQ ID NO:149
- и
- 25 (D) указанная четвертая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:
- (i) SEQ ID NO:54 – SEQ ID NO:1 или
 - (ii) SEQ ID NO:50 – SEQ ID NO:1.

- Е43. CD137-связывающая молекула по любому из Е40-Е42, характеризующаяся тем, что указанная молекула содержит:
- (A) SEQ ID NO:151 и SEQ ID NO:152;
 - (B) SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:153 и SEQ ID NO:154 или
 - (C) SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:155 и SEQ ID NO:165.
- 30

- Е44. Фармацевтическая композиция, содержащая **CD137-связывающую молекулу** по любому из Е1-43 и физиологически приемлемый носитель.
- Е45. Применение **CD137-связывающей молекулы** по любому из Е6-Е43 или фармацевтической композиции по Е44 для лечения заболевания или состояния, связанного с экспрессией **ОА** или характеризующегося экспрессией **ОА**.
- Е46. **PD-L1-связывающая молекула**, содержащая переменный домен легкой цепи, который содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3}, и переменный домен тяжелой цепи, который содержит CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3}; где:
- (А) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL2 МАВ-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:72)**
- и
- (В) (1) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH2 МАВ-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:67);**
- (2) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH3 МАВ-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:68);**
- (3) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH4 МАВ-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:69);**
- (4) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH5 МАВ-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:70)** или
- (5) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH6 МАВ-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:71).**
- Е47. **PD-L1-связывающая молекула** по Е46, характеризующаяся тем, что указанный переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность:
- (А) **VH2 МАВ-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:67);**
- (В) **VH3 МАВ-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:68);**
- (С) **VH4 МАВ-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:69);**

- (D) **VH5 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:70)** или
- (E) **VH6 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:71).**
- 5 E48. **PD-L1-связывающая молекула** по любому из E46-E47, характеризующаяся тем, что указанный переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность **VL2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:72).**
- E49. **PD-L1-связывающая молекула** по любому из E46-E48, характеризующаяся тем, что указанная молекула представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент.
- 10 E50. **PD-L1-связывающая молекула** по любому из E46-E48, характеризующаяся тем, что указанная молекула представляет собой мультиспецифичную связывающую молекулу.
- E51. **PD-L1-связывающая молекула** по E50, характеризующаяся тем, что указанная молекула представляет собой биспецифичное диатело, биспецифичное антитело или трехвалентную связывающую молекулу.
- 15 E52. Фармацевтическая композиция, содержащая **PD-L1-связывающую молекулу** по любому из E46-E51 и физиологически приемлемый носитель.
- E53. Применение **PD-L1-связывающей молекулы** по любому из E46-E51 или фармацевтической композиции по E52 для лечения заболевания или состояния, связанного с супрессией иммунной системы или характеризующегося экспрессией PD-L1.
- 20 E54. Применение по E53, характеризующееся тем, что указанное заболевание или состояние, связанное с супрессией иммунной системы или характеризующееся экспрессией PD-L1, представляет собой рак.

- 5 E55. Применение по любому из E45 или E54, характеризующееся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из: рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного и спинного мозга, рака молочной железы, рака шейки матки, рака толстой и прямой кишки, рака желчного пузыря или рака желчного протока, рака желудка, глиобластомы, рака головы и шеи, гепатоклеточной карциномы, рака почки, лейкоза, рака печени, рака легкого, меланомы, нейробластомы, немелкоклеточного рака легкого (НМКРЛ), рака яичников, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, рабдомиосаркомы, рака кожи, плоскоклеточного рака головы и шеи
- 10 (ПКРГШ), рака желудка, рака яичек, карциномы вилочковой железы и рака матки.
- E56. Способ усиления активности нацеленного на опухоль агента, включающий введение указанного нацеленного на опухоль агента в комбинации с **CD137-связывающей молекулой** по любому из E1-E43, **PD-L1-связывающей молекулой** по любому из E46-E51 или фармацевтической композицией по любому из E44 или E52.
- 15 E57. Способ лечения заболевания или состояния, связанного с супрессией иммунной системы или характеризующегося экспрессией **ОА**, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту **CD137-связывающей молекулы** по любому из E1-E43, **PD-L1-связывающей молекулы** по любому из E46-E53 или фармацевтической композиции по E44 или E53.
- 20 E58. Способ по E57, характеризующийся тем, что состояние, связанное с супрессией иммунной системы или характеризующееся экспрессией **ОА**, представляет собой рак.
- 25 E59. Способ по E57 или E58, дополнительно включающий введение нацеленного на опухоль агента.
- E60. Способ по E56 или E59, характеризующийся тем, что указанный нацеленный на опухоль агент представляет собой антитело, эпитоп-связывающий фрагмент антитела или агент, который опосредует перенаправленное Т-клеточное
- 30 уничтожение клетки-мишени.
- E61. Способ по любому из E57-E60, характеризующийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из: рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного и

- спинного мозга, рака молочной железы, рака шейки матки, рака толстой и прямой кишки, рака желчного пузыря или рака желчного протока, рака желудка, глиобластомы, рака головы и шеи, гепатоклеточной карциномы, рака почки, лейкоза, рака печени, рака легкого, меланомы, нейробластомы,
- 5 немелкоклеточного рака легкого (НМКРЛ), рака яичников, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, рабдомиосаркомы, рака кожи, плоскоклеточного рака головы и шеи (ПКРГШ), рака желудка, рака яичек, карциномы вилочковой железы и рака матки.
- 10 E62. Нуклеиновая кислота, кодирующая **CD137-связывающую молекулу** по любому из E1-E43 или **PD-L1-связывающую молекулу** по любому из E46-E51.
- E63. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по E62.
- E64. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по E62 или вектор экспрессии по E63.
- E65. Клетка по E64, характеризующаяся тем, что указанная клетка представляет собой
- 15 клетку млекопитающего.

ПРИМЕРЫ

- [00450] Описанное в целом изобретение будет легче понять со ссылкой на следующие далее примеры. Следующие примеры иллюстрируют различные способы применения композиций в способах диагностики или лечения согласно настоящему изобретению.
- 20 Предполагается, что примеры являются иллюстративными и никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

ПРИМЕР 1

Методы

- [00451] Способность исследуемого продукта (например, антитела, диатела или
- 25 трехвалентной молекулы) опосредовать мишень-зависимую передачу сигнала пути NF/ κ B оценивали с использованием экспрессирующей CD137 репортерной клеточной линии (Jurkat-NF- κ B-Luc) в CD137-репортерном анализе, который проводили по существу следующим образом: в случае биспецифичных молекул клетки-мишени (тип и номер указан на Фигурах и ниже) в 100 мкл аналитических сред (RPMI-1640, 10% ЭБС)
- 30 высевали в стерильные аналитические микропланшеты и инкубировали при 37°C в течение ночи. На 3 день репортерные клетки Jurkat-NF- κ B-Luc с гиперэкспрессией CD137 (4×10^4 - $7,5 \times 10^4$ клеток в 50 мкл аналитических сред) и 50 мкл исследуемых

изделий в серийных разведениях последовательно добавляли в каждую лунку, содержащую клетки-мишени, и в контрольные лунки без клеток-мишеней. Планшеты инкубировали в течение 4-5 часов при 37°C. Затем в каждую лунку добавляли 50 мкл субстрата BioGlo (Promega) и планшеты инкубировали в течение дополнительных 5-10 минут при комнатной температуре («RT»), передачу сигнала измеряли путем выявления люминесценции (например, с использованием прибора Perkin Elmer Envision) с использованием относительных световых единиц люминесценции (RLU) в качестве выводных данных. В случае моноспецифичных антител против CD137 не использовали клетки-мишени, вместо этого добавляли козы антигена против иммуноглобулина мыши или козы антигена против иммуноглобулина человека в четырехкратном избытке для перекрестного связывания с антителами.

[00452] ИФА-анализы для оценки исследуемых изделий на предмет связывания с CD137 проводили по существу следующим образом: 96-луночные планшеты с плоским дном Maxisorb покрывали растворимым CD137 человека или макака-крабоеда (внеклеточный домен CD137 человека или макака-крабоеда, слитый с His-меткой (shCD137-His или scyCD137-His) или с человеческим Fc-участком (shCD137-hFc или scyCD137-hFc)) с концентрацией каждого из CD137, составляющей 0,5 или 1 мкг/мл. Планшеты промывали, блокировали ФСБ-буфером, содержащим 0,5% бычий сывороточный альбумин и 0,1% Tween20, и инкубировали с исследуемым изделием (например, клеточными супернатантами или очищенным mAb). Для супернатантов гибридомы использовали антитело против CD137 в концентрации 1,0 мкг/мл и в шести трехкратных серийных разведениях. Количество исследуемого изделия, связанного с иммобилизованным CD137 (человека или макака-крабоеда), оценивали с использованием вторичных козьих антител против IgG мыши, конъюгированных с HRP. Все образцы анализировали на считывателе для планшетов (Victor 2 Wallac, Perkin Elmer) и значения EC50 рассчитывали из кривых зависимости ответа от дозы с помощью нелинейного регрессионного анализа.

[00453] Анализы Т-клеточного высвобождения цитокинов (с использованием субоптимальных стимулированных первичных Т-клеток в отсутствие клеток-мишеней) проводили по существу следующим образом: в каждую лунку аналитического планшета добавляли 50 мкл исследуемого изделия (антител, перекрестно связывающихся или не связывающихся с (Fab)₂ против Fc человека) в серийных разведениях, 50 мкл предварительно промытых парамагнитных наночастиц Dynabeads, покрытых αCD3

(REF 11151D; Invitrogen от Thermo Fisher Scientific, или сходных частиц) в концентрации 2×10^6 частиц/мл и 100 мкл/лунка человеческих пан-Т-клеток (очищенных из донорских МКПК с использованием набора для человеческих Т-клеток Dynabeads Untouched Human T-cell Kit, Invitrogen Cat# 11344D, или сходного набора в соответствии с протоколом производителя) в концентрации 10^6 клеток/мл. Конечный объем в каждой лунке планшета составлял 200 мкл. Для контрольных лунок, которые не содержали исследуемое изделие или α CD3-частицы, добавляли аналитические среды с доведением общего объема до 200 мкл и планшеты инкубировали в течение 72 часов в инкубаторе для тканевых культур. Затем супернатанты собирали из каждой лунки и высвобожденные цитокины IL-2, IL-10, TNF- α и IFN- γ измеряли с использованием набора для ИФА для цитокинов (например, набора для ИФА DuoSet для человеческого IL-2 (Cat: DY202), набора для ИФА DuoSet для человеческого IFN-гамма (Cat: DY285) и набора для ИФА DuoSet для человеческого TNF-альфа (Cat: DY210) от компании R&D System, или сходных коммерческих реагентов) в соответствии с инструкциями производителя. Программы Microsoft Excel и SoftMax Pro использовали для анализа данных для выведения значений уровня цитокинов, которые были представлены в виде графика с помощью программы Prism.

[00454] Анализ с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) для оценки исследуемых изделий на предмет связывания с CD137 клеточной поверхности проводили по существу следующим образом: 100 мкл клеток CHO, экспрессирующих CD137 (CHO/CD137) ($1,0 \times 10^5$ - 1×10^6 клеток/лунка) и 100 мкл исследуемого изделия в серийных разведениях или контрольных молекул добавляли в каждую лунку аналитического микропланшета (микропланшетов), смешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение примерно 30 мин. Клетки промывали FACS-буфером и в каждую лунку затем добавляли вторичные антитела в разведении 1:1000 (козьи антитела против иммуноглобулина человека, конъюгированные с APC, PE или FITC), после этого компоненты смешивали и лунки инкубировали при комнатной температуре в течение примерно 30 мин. Клетки промывали и ресуспендировали в 250 мкл FACS-буфера и анализировали с помощью проточной цитометрии (BD LSR Fortessa или FACSCanto II) для сбора данных о клеточных событиях. Анализ данных проводили с помощью программы FloJo v10.

[00455] Оценку конкуренции между антителами против CD137 и лигандом CD137 за связывание с CD137 проводили с использованием безмаркерного биослойного

интерферометрического анализа в реальном времени на биосенсоре Octet (Pall ForteBio) по существу следующим образом: антитела против CD137 иммобилизовали на биосенсоре с антителами против человеческого Fc и затем проводили связывание с внеклеточным доменом человеческого CD137, слитым с мышинным Fc-доменом (shCD137 mFc; 10 мкг/мл), в течение 30 секунд. Сенсоры затем погружали в раствор рекомбинантного человеческого лиганда CD137 (R&D Systems; 5 мкг/мл) на 30 секунд для отслеживания того, сможет ли лиганд связываться с заранее образованным комплексом CD137/антитело или его связывание заблокировано.

5 [00456] Кинетику связывания антител против CD137 (содержащих человеческие Fc-участки) исследовали с использованием системы для анализа с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР) BIACORE™. Антитела против CD137 захватывали на поверхности, покрытой козьими Fab'2-фрагментами против Fc-фрагмента иммуноглобулина человека. Отслеживали ассоциацию и диссоциацию shCD137-His или scyCD137-His (12,5 нМ, 50 нМ, 200 нМ) и сенсограммы приводили к модели связывания 1:1 для расчета констант скорости ассоциации и диссоциации и определяли значение KD.

10 [00457] FACS-анализ для оценки связывания исследуемых изделий с PD-L1 клеточной поверхности проводили по существу следующим образом: 100 мкл клеток CHO, экспрессирующих PD-L1 (CHO/PD-L1) ($1,0 \times 10^5$ - $1,0 \times 10^6$ клеток на лунку) и 100 мкл исследуемого изделия в серийных разведениях добавляли в каждую лунку аналитического микропланшета (микропланшетов), перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение примерно 30 мин. Клетки промывали FACS-буфером и затем в каждую лунку добавляли вторичные антитела (козьи антитела против иммуноглобулина человека, конъюгированные с FITC, PE или APC), после чего компоненты смешивали и лунки инкубировали при комнатной температуре в течение примерно 30 мин. Клетки промывали и ресуспендировали в 250 мкл FACS-буфера и анализировали с помощью проточной цитометрии (на системе BD LSR Fortessa или FACSCanto II) для сбора данных о клеточных событиях. Анализ данных проводили с помощью программы FloJo v10.

25 [00458] Способность исследуемого изделия служить антагонистом пути PD-1/PD-L1 (т.е. блокировать взаимодействие PD-1/PD-L1 и предотвращать подавление T-клеточных ответов) оценивали в люциферазном репортерном анализе PD-L1 на клетках Jurkat-luc-NFAT/CHO/PD-L1, который проводили по существу следующим образом:

клетки CHO/PD-L1 высевали в концентрации 40 000 клеток/лунка в 100 мкл культуральной среды (DMEM/F12 + 10% ЭБС + 200 мкг/мл гигромицина В + 250 мкг/мл G418) и инкубировали в течение ночи. На следующий день среды удаляли и добавляли в каждую лунку клетки NFAT-luc2/PD-1-Jurkat (Promega) в концентрации 125 000
5 клеток/лунка в 50 мкл аналитического буфера (RPMI + 2% ЭБС) и по 50 мкл исследуемых изделий в серийных разведениях и инкубировали в течение 6 часов при 37°C. 80 мкл субстрата BioGlo Substrate (Promega) затем добавляли в каждую лунку и планшет инкубировали в течение дополнительных 5-10 минут при комнатной температуре, блокирование PD-1/PD-L1 измеряли путем выявления люминесценции
10 (например, с использованием прибора Perkin Elmer Envision) с использованием относительных световых единиц люминесценции (relative light unit, RLU) в качестве выводных данных.

[00459] Анализ Т-клеточного высвобождения цитокинов (с использованием субоптимально стимулированных первичных Т-клеток в присутствии клеток-мишеней)
15 проводили по существу следующим образом: человеческие пан-Т-клетки (очищенные из донорских МКПК, см. выше) ресуспендировали в аналитических средах и помещали в инкубатор для тканевых культур на ночь. ОА-положительные клетки-мишени (например, клетки CHO/PD-L1, клетки JMT-1, клетки N87) и контрольные ОА-отрицательные клетки (например, клетки CHO) получали из культуры. После отмывки
20 клетки-мишени (номер указан на Фигурах и ниже) предварительно высевали на прозрачные 96-луночные планшеты с плоским дном и помещали в инкубатор для тканевых культур на ночь. На следующий день измеряли плотность и жизнеспособность покоящихся человеческих пан-Т-клеток по методу вытеснения трипанового синего с использованием счетчика Beckman Coulter Vi-Cell и плотность доводили до 2×10^6
25 клеток/мл. На следующий день супернатанты удаляли и в каждую лунку аналитического планшета добавляли 50 мкл исследуемого изделия в серийных разведениях (антител, диател, трехвалентных молекул и т.д.), 50 мкл предварительно промытых парамагнитных микрочастиц Dynabeads, покрытых α CD3 (REF 11151D; Invitrogen от Thermo Fisher Scientific) в концентрации $2,0 \times 10^6$ частиц/мл, 50 мкл/лунка человеческих
30 пан-Т-клеток в концентрации $2,0 \times 10^6$ клеток/мл и 50 мкл аналитических сред. Конечный объем в каждой лунке планшета составлял 200 мкл. Для контрольных лунок, которые не содержали исследуемого изделия или не были покрыты α CD3-частицами, добавляли аналитические среды с доведением общего объема до 200 мкл и планшеты

инкубировали в течение 72 часов в инкубаторе для тканевых культур. Супернатанты затем собирали из каждой лунки и количество высвобожденных цитокинов IFN- γ и IL-2 измеряли с использованием ИФА-набора для цитокинов (например, набора для ИФА DuoSet для человеческого IL-2 (Cat: DY202), набора для ИФА DuoSet для человеческого IFN-гамма (Cat: DY285) от компании R&D System или сходных коммерческих реагентов) в соответствии с инструкциями производителя. Программы Microsoft Excel и SoftMax Pro использовали для анализа данных для выведения значений уровня цитокинов, которые представляли в виде графика с помощью программы Prism.

[00460] Количественную оценку **CD137 x OA-связывающих молекул** в сыворотке крови макаков-крабоедов проводили по существу следующим образом: аналитические планшеты покрывали His-меченным растворимым белком слияния человеческого CD137 (huCD137, содержащим внеклеточную часть человеческого CD137, слитую с гистидин-содержащим пептидом) в концентрации 2,0 мкг/мл на ночь. После блокирования сайтов неспецифического связывания с помощью 0,5% бычьего сывороточного альбумина (БСА) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), содержавшем 0,1% Tween-20 (ФСБ-Т), планшет инкубировали со стандартными калибровочными растворами **CD137 x OA-связывающих молекул**, контролями качества и исследуемыми образцами. Имобилизированный huCD137-His захватывал **CD137 x OA-связывающие молекулы**, присутствующие в стандартных калибровочных растворах, контролях качества и исследуемых образцах. Захваченные **CD137 x OA-связывающие молекулы** выявляли путем добавления HRP-конъюгированных козьих антител против IgG(Fc) человека в концентрации 0,05 мкг/мл. Активность связанного HRP оценивали количественно путем возбуждения люминесценции с использованием хемилюминесцентного субстрата для ИФА SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate от компании Thermo Scientific. Интенсивность люминесцентного света, выраженную как относительные световые единицы (RLU), измеряли с помощью считывателя для планшетов Victor X4. Стандартную кривую получали путем приведения сигнала RLU от стандартов AEX3370 к пятипараметрической логистической модели. Концентрацию **CD137 x OA-связывающих молекул** в образцах сыворотки затем выводили из сигнала RLU образцов и уравнения, описывающего стандартную кривую. Нижний предел количественной оценки (LLOQ) для анализа составлял 6,1 нг/мл.

[00461] Анализы клеточной пролиферации на Т-клетках и НК-клетках проводили по существу следующим образом: панель маркерных антител Т-клеток и НК-клеток, включая CD3, CD4, CD8, CD56 и CD159a, добавляли в лунки планшета для образца, содержащие хорошо перемешанные антикоагулированные образцы цельной крови, полученные из исследования на макаках-крабоедах, тщательно перемешивали с помощью пипетки и инкубировали в темноте в течение 25-35 минут при температуре окружающей среды. Затем в каждую лунку добавляли однократный лизирующий раствор BD FACS и перемешивали с помощью пипетки; каждый планшет затем инкубировали в темноте в течение дополнительных 10-20 минут при температуре окружающей среды. Каждый планшет центрифугировали при $400 \times g$ в течение 5 минут и супернатант удаляли. FACS-буфер добавляли в каждую лунку и перемешивали в качестве этапа отмывки. Каждый планшет затем центрифугировали при $400 \times g$ в течение 5 минут и супернатант удаляли. Клеточный осадок ресуспендировали в растворе BD Cytotfix/Сytoperm и инкубировали в течение 20-40 минут при 2-8°C. По окончании инкубации каждый планшет промывали, как в предыдущих этапах отмывки, и клеточный осадок ресуспендировали с антителами против Ki67 или контролем изотипа и инкубировали в течение 30-60 минут при 2-8°C. Каждый планшет снова промывали, как в предыдущих этапах отмывки, и клеточный осадок в конечном итоге ресуспендировали в FACS-буфере и образцы анализировали с помощью клеточного анализатора BD FACSCanto II. Пролиферацию Т-клеток и НК-клеток количественно оценивали путем мониторинга $CD3^+CD8^+Ki67^+$ и $CD56^+CD159a^+Ki67^+$ популяций соответственно.

ПРИМЕР 2

Выделение и характеристика человеческого неблокирующего антитела mAb против CD137

[00462] Для того, чтобы идентифицировать CD137-связывающий домен, обладающий улучшенными характеристиками, в частности, при включении в различные **CD137 х ОА-связывающие молекулы**, создавали панель моноклональных антител, содержащих полностью человеческие переменные домены, специфичные в отношении человеческого CD137, с использованием платформы TRIANNI MOUSE® путем иммунизирования мышей His-меченным растворимым белком слияния человеческого CD137 (huCD137, содержащим внеклеточную часть человеческого CD137, слитую с гистидин-содержащим пептидом). Супернатанты из полученных гибридом оценивали на предмет связывания с CD137, способности опосредовать дозозависимую Т-

клеточную передачу сигнала в CD137-репортерном анализе и способности вызывать высвобождение цитокинов (например, IFN- γ , TNF- α) из Т-клеток. VH- и VL-домены нескольких гибридом клонировали и экспрессировали в клетках CHO в виде человеческих антител IgG1 (L234A/L235A) и оценивали их аффинность связывания, блокирующую лиганд активность и связывание с CD137 на клеточной поверхности снова с помощью CD137-репортерного анализа и анализа высвобождения цитокинов. Нерелевантное антитело, представляющее собой отрицательный контроль, и/или ранее описанное гибридное антитело против CD137 MAB-3 против chCD137 (см. публикацию международной заявки WO 2018/156740 и выше) включали в указанные анализы.

Способы, используемые для такой оценки, предложены выше. Одно антитело, обозначенное как MAB-6 против CD137 (1.1), было выбрано для дополнительного исследования. Аминокислотные последовательности VH- и VL-доменов MAB-6 против CD137 (1.1) представлены выше, и репрезентативные результаты указанной оценки суммированы в **Таблицах 7A-D**.

15

Таблица 7А – Супернатанты гибридомы				
	Репортерный анализ (RLU)		ИФА (EC50, нг/мл)	
	Концентрация IgG			
Антитело (концентрация)	0,02 мкг/мл	0,1 мкг/мл	huCD137	cyCD137
МАВ-6 против CD137 (1.1)	3280	11670	38	49
МАВ-3 против chCD137	5540	18650	34	44
неспецифичное mAb	1020	1240	-	-

Таблица 7В – Супернатанты гибридомы								
Т-клеточный анализ – высвобождение цитокинов								
	IL-2				IL-10			
	Донор 1		Донор 2		Донор 1		Донор 2	
(концентрация)	0,1 мкг/мл	1 мкг/мл						
Антитело	л	мл	л	мл	л	мл	л	мл
МАВ-6 против CD137 (1.1)	25	307	172	402	35	393	204	973
МАВ-3 против chCD137	124	223	313	628	52	63	225	391
неспецифичное mAb	16	29	27	29	33	35	45	54

	TNF-α				IFN-γ			
	Донор 1		Донор 2		Донор 1		Донор 2	
(концентрация)	0,1 мкг/мл	1 мкг/мл						
Антитело	л	мл	л	мл	л	мл	л	мл
МАВ-6 против CD137 (1.1)	76	908	355	702	116	2901	546	2573
МАВ-3 против chCD137	275	368	370	508	194	303	287	455
неспецифичное mAb	35	113	68	102	33	92	56	99

Таблица 7С – супернатанты клеток СНО						
	Блокирование лиганда	ППР			Поверхностное связывание	
Антитело		K _{on} , 1/(M·с)	K _{off} , 1/с	KD, нМ	MFI, max	EC50, нг/мл
МАВ-6 против CD137 (1.1)	no	4,2E+5	6,7E-3	16	5745	21
МАВ-3 против chCD137	yes	6,6E+5	2,5E-2	38	6046	10
неспецифичное mAb	-	-	-	-	149	-

Таблица 7D – супернатанты клеток СНО			
	Репортерный анализ (RLU)	Анализ на первичных Т-клетках	
		Донор 1	
		INF γ	TNF- α
(концентрация)	0,08	0,1	0,1
Антитело	мкг/мл	мкг/мл	мкг/мл
МAB-6 против CD137 (1.1)	8530	174	101
МAB-3 против chCD137	9170	63	45
неспецифичное mAb	1250	0	6

[00463] Оценку связывания с эпитопом проводили с помощью перекрестно-конкурентных анализов. Результаты указанных анализов, а также конкурентных анализов связывания лиганда указывают на то, что **МAB-6 против CD137** связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается антитело сравнения, содержащее вариабельные домены утомилумаба, антитело сравнения, содержащее вариабельные домены урелумаба, и все антитела против CD137, описанные в публикации международной заявки WO 2018/156740, включая МAB-3 против chCD137. В целом, указанные исследования демонстрируют, что **МAB-6 против CD137** связывается с уникальным неблокирующим эпитопом и проявляет улучшенную аффинность связывания по сравнению с ранее описанным МAB-3 против chCD137, как определено по результатам анализов с помощью ИФА, FACS и BIACORE™. **МAB-6 против CD137** также проявляло более высокую активность в Т-клеточном анализе высвобождения цитокинов.

ПРИМЕР 3

Характеристика CD137 x OA-связывающих молекул

[00464] Были созданы **CD137 x OA-связывающие молекулы**, способные связываться с CD137 и с репрезентативным OA, PD-L1, содержащие VH- и VL-домены **МAB-6 против CD137 (1.1)** и **МAB-2 против hPD-1(1.1)**. В частности, было создано тетравалентное биспецифичное диатело, обозначенное как «**DART-A**», содержащее два идентичных связывающих домена биспецифичного диатела и имеющее антитело-подобную Y-структуру, показанную на **Фигуре 1B**, и трехвалентная связывающая молекула, обозначенная как «**TRIDENT-A**», содержащая один моноспецифичный связывающий домен по типу диатела и связывающий домен не по типу диатела, имеющая структуру, показанную на **Фигуре 3A**. Характеристики доменов указанных молекул и конкретного биспецифичного контрольных молекул и молекул сравнения, имеющих такие же структуры, обсуждаются выше (см., например, **Таблицы 5-6**).

[00465] Оценивали способность **DART-A**, **TRIDENT-A**, молекулы сравнения **TRIDENT-2** (содержащей связывающий домен **MAВ-3** против **hCD137 (1В.3)**) и отрицательного контроля (**hIgG1** – нерелевантное антитело в качестве контроля изотипа) связываться с CD137 клеточной поверхности с помощью FACS-анализа, который проводили по существу, как описано выше. Исследуемые изделия использовали в концентрации 10 мкг/мл в пятикратных серийных разведениях. Результаты репрезентативного анализа, показанные на **Фигуре 4**, демонстрируют, что все **CD137 x PD-L1**-биспецифичные молекул были способны эффективно связываться с CD137, экспрессируемым на клеточной поверхности. В этом анализе молекулы сравнения проявляли лучшее связывание.

[00466] Оценивали способность **DART-A**, **TRIDENT-A**, **MAВ-2** против **hPD-1 (1.1)** и отрицательного контроля, **hIgG1**, связываться с поверхностью клеток CHO, экспрессирующих PD-L1 (CHO/PD-L1), с помощью анализа методом сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS), а также их способность выступать в качестве антагонистов PD-1/PD-L1-пути (т.е. блокировать взаимодействие PD-1/PD-L1 и предотвращать подавление Т-клеточных ответов) в люциферазном репортерном анализе на клетках Jurkat-luc-NFAT/CHO/PD-L1. Оба анализа проводили по существу, как описано выше. Исследуемые изделия использовали в концентрации 10 мкг/мл в пятикратных серийных разведениях для FACS-анализа и в концентрации 50 мкг/мл в пятикратных серийных разведениях для PD-L1-репортерного анализа. Результаты репрезентативного анализа, показанные на **Фигурах 5А-5В**, демонстрируют, что **DART-A** и **TRIDENT-A** были способны эффективно связываться с PD-L1, экспрессируемым на клеточной поверхности (**Фигура 5А**), и блокировать взаимодействия PD-1/PD-L1 (**Фигура 5В**). Следует отметить, что кривые связывания молекул, содержащих два сайта связывания PD-L1 (**DART-A** и **MAВ-2** против **hPD-1(1.1)**), показали более быстрое достижение насыщения, указывая на то, что некоторые из молекул проявляют бивалентное связывание (т.е. связывание двух молекул PD-L1 на поверхности). Бивалентное связывание более вероятно в присутствии высокой концентрации лиганда-мишени, экспрессируемого на клетках CHO/PD-L1. Также наблюдалось, что молекулы, обладающие двумя сайтами связывания PD-L1, проявляли большую блокирующую PD-L1 активность по сравнению с трехвалентными молекулами.

[00467] Функциональную активность **DART-A**, **TRIDENT-A**, молекул сравнения **DART-2** и **TRIDENT-2** (каждая из которых содержит связывающий домен **MAВ-3**

против hCD137 (1B.3)), DART-3 (содержащего связывающий домен утомилумаба), аналога антитела-агониста mAb против CD137 урелумаба (**r-урелумаб**) и отрицательных контролей **DART- 1** (RSV x PD-L1-связывающей молекулы) и **hIgG1** оценивали в CD137-репортерном анализе, который проводили по существу, как описано выше, в присутствии и в отсутствие PD-L1-экспрессирующих клеток JMT-1 (10 000 клеток/лунка), исследуемые изделия использовали в концентрации 1 мкг/мл и в пятикратных серийных разведениях. Результаты репрезентативного анализа, показанные на **Фигуре 6**, демонстрируют, что как тетравалентные, так и трехвалентные **CD137 x PD-L1**-биспецифичные молекулы, содержащие связывающий домен **MAВ-6 против CD137 (1.1) (DART-A и TRIDENT-A** соответственно), опосредовали мишень-зависимую передачу сигнала. Напротив, только трехвалентная молекула, содержащая связывающий домен **MAВ-3 против hCD137 (1B.3) (TRIDENT-2)**, проявляла активность, тогда как соответствующая тетравалентная молекула **DART-2** не проявляла какую-либо активность в присутствии клеток-мишеней. Дополнительно, **DART-A** проявляла максимальную активность из всех исследуемых тетравалентных молекул. Ни одна из **CD137 x OA**-биспецифичных молекул не проявляла активность в отсутствие клеток-мишеней. Как ожидалось, агонист **r-урелумаб** проявлял активность в присутствии и в отсутствие PD-L1-экспрессирующих клеток-мишеней, а отрицательные контроли совсем не проявляли активность.

[00468] Функциональную активность **DART-A, TRIDENT-A**, молекул сравнения **DART-2, TRIDENT-2, DART-3, r-урелумаба** и отрицательных контролей **DART-1** и **hIgG1** также оценивали в анализе высвобождения цитокинов из первичных Т-клеток в присутствии PD-L1-экспрессирующих клеток JMT-1 (10 000 клеток на лунку), который проводили по существу, как описано выше. Исследуемые изделия использовали в концентрации 1 мкг/мл и в пятикратных серийных разведениях. Результаты репрезентативного анализа для репрезентативных цитокинов INF- γ и IL-2 показаны на **Фигурах 7A и 7B** соответственно. Как было видно из CD137-репортерного анализа, и тетравалентные, и трехвалентные **CD137 x PD-L1**-биспецифичные молекулы, содержащие связывающий домен **MAВ-6 против CD137 (1.1) (DART-A и TRIDENT-A** соответственно) опосредовали высвобождение цитокинов. Напротив, только трехвалентная молекула, содержащая связывающий домен **MAВ-3 против hCD137 (1B.3) (TRIDENT-2)** проявляла активность, тогда как тетравалентная молекула **DART-2**, не проявляла какой-либо активности. Снова, **DART-A** проявляло максимальную

активность из всех исследуемых тетравалентных молекул, и отрицательные контроли не проявляли указанную активность.

[00469] Указанные исследования демонстрируют, что полностью человеческий связывающий домен **MAВ-6 против CD137 (1.1)** является активным как в 5 тетравалентных, так и в трехвалентных **CD137 x OA**-биспецифичных молекулах и не проявляет активности агониста в отсутствие PD-L1-экспрессирующих клеток-мишеней. Несмотря на то, что молекула **TRIDENT-2** проявляла более высокое связывание с клетками CHO/CD137, активность **TRIDENT-A** и **TRIDENT-2** была сравнимой, тогда как **DART-2** не проявляло активность в каком-либо из функциональных анализов. В 10 самом деле, **MAВ-6 против CD137 (1.1)** является более активным в тетравалентной антитело-подобной структуре, показанной на **Фигуре 1B**, по сравнению с молекулами, содержащими связывающие домены **MAВ-3 против hCD137 (1B.3)** или утомилумаба.

ПРИМЕР 4

Фармакокинетические свойства CD137 x OA-молекул

[00470] Фармакокинетические свойства трехвалентных **CD137 x OA**-биспецифичных молекул **TRIDENT-A** (содержащей связывающий домен **MAВ-6 против CD137 (1.1)**) и **TRIDENT-2** (содержащей связывающий домен **MAВ-3 против hCD137 (1B.3)**) оценивали на макаках-крабоедах. Вкратце, двум макакам-крабоедам (самкам) вводили 15 путем инфузии одну дозу каждого исследуемого изделия в концентрации 1 мг/кг или 10 мг/кг (четыре группы) и за животными наблюдали в течение 22 дней, вскрытия 20 животных не проводили. Следили за потреблением пищи и массой тела животных и осуществляли полный гематологический и клинический химический анализ во время исследования. Наблюдалось временное повышение печеночных ферментов (АЛТ, АСТ и билирубина). Исследуемые изделия хорошо переносились, и не наблюдалось 25 нежелательных явлений.

[00471] За концентрацией молекул в сыворотке следили с течением времени по существу, как описано выше. Значения C_{max} , ППК, $t_{1/2\beta}$ и CL представлены в **Таблице 8** и показывают, что время полужизни в сыворотке крови трехвалентной **CD137 x OA**-биспецифичной молекулы, содержащей связывающий домен **MAВ-6 30 против CD137 (1.1)**, примерно в два раза превышает время полужизни молекулы, содержащей **MAВ-3 против hCD137 (1B.3)**. Концентрация **TRIDENT-A** в сыворотке крови в течение первых 10 дней (240 часов) показана на графике на **Фигуре 8A**. Кроме

того, пролиферацию CD8⁺ Т-клеток (**Фигура 8В**) и NK-клеток (**Фигура 8С**) оценивали по существу, как описано выше. Данное исследование показало, что для репрезентативной **CD137 x OA**-биспецифичной молекулы **TRIDENT-A**, содержащей CD137-связывающие домены нового антитела против CD137 **MAВ-6 против CD137**, наблюдалось медленное выведение, и введение указанной молекулы коррелировало с временной индукцией пролиферации как CD8⁺ Т-клеток, так и NK-клеток, указывая на стимуляцию указанных клеток иммунной системы. Кроме того, как отмечается выше, **MAВ-6 против CD137** обладала большей активностью в тетравалентных антитело-подобных структурах. Таким образом, связывающий домен **MAВ-6 против CD137** обеспечивает несколько преимуществ по сравнению с ранее описанными CD137-связывающими доменами.

Таблица 8: Фармакокинетические свойства						
Молекула	Доза	Животное	Стах	ППК	t1/2бета	CL
	(мг/кг)	ID	(мкг/мл)	(ч*мкг/мл)	(ч)	(мл/ч/кг)
TRIDENT-A	1	1F001	28	1598	98	0,48
		1F002	32	1968	148	0,32
TRIDENT-A	10	2F003	242	18752	217	0,30
		2F004	293	21333	167	0,27
TRIDENT-2	1	5F009	31	1227	29	0,81
		5F010	26	945	42	0,97
TRIDENT-2	10	6F011	282	10313	100	0,78
		6F012	293	11486	99	0,69

ПРИМЕР 5

Деиммунизация и оптимизация переменных доменов МАВ-2 против hPD-1 (1.1)
 [00472] Интактное антитело **МАВ-2 против hPD-1 (1.1)** анализировали с помощью анализа MAPPs (проведенного компанией Abzena) для идентификации пептидных кластеров, которые могут презентироваться антиген-презентирующими клетками. После этого проводили *in silico* анализ iTope™ аминокислотной последовательности VH- и VL-доменов **МАВ-2 против hPD-1 (1.1)**, в ходе которого пептидные кластеры делили на перекрывающиеся 9-мерные пептиды (перекрывание на 8 aa между соседними пептидами) и предсказывали аффинность связывания 9-мерных пептидов с белками HLA-DR и проводили перекрестный анализ указанных 9-мерных пептидов против базы

данных пептидов, которые, как было экспериментально показано, стимулируют Т-клеточные ответы. Был идентифицирован потенциальный Т-клеточный эпитоп в пределах остатков 72-88 по Кэбату каркасного участка 2 **МАВ-2 против hPD-1 VH1** (соответствуют остаткам 73-92 последовательности **SEQ ID NO:57**). С помощью

5 дополнительного анализа были идентифицированы три аминокислоты не зародышевого типа в данном участке: T77, K83 и T84, пронумерованные в соответствии с системой нумерации по Kabat (соответствуют остаткам T78, K87 и T88 последовательности **SEQ ID NO:57**), и были введены следующие замены: T77S; K83R и T84A или T77S, K83R и T84A, пронумерованные в соответствии с системой нумерации по Kabat. Связывание

10 антител, содержащих указанные замены, оценивали на примере связывания с растворимым PD-L1, слитым с His-меткой (shPD-L1), с использованием ИФА-анализа по существу, как описано выше для связывания с CD137, за исключением того, что планшеты покрывали shPD-L1 в концентрации 0,5 мкг/мл и использовали вторичные козы антигела против IgG человека, конъюгированные с HRP. Результаты суммированы

15 в **Таблице 9**.

Таблица 9: Краткое описание ИФА для shPD-L1	
Антитело	Связывание
МАВ-2 против hPD-1 VH1	++++
МАВ-2 против hPD-1 VH1 + T77S	++
МАВ-2 против hPD-1 VH1 + K83R и T84A	+++
МАВ-2 против hPD-1 VH1 + T77S, K83R и T84A	++++

[00473] Все деиммунизированные варианты связывались с shPD-L1, при этом вариант, содержащий замены T77S, K83R и T84A, обладал связыванием, неотличимым от исходного антитела. VH, содержащий указанные мутации, был обозначен как **VH2 МАВ-2 против hPD-L1**.

20 [00474] Кроме того, проводили анализ мутаций для идентификации аминокислотных замен в CDR VH- и/или VL-доменов **МАВ-2 против hPD-L1 (1.1)**, которые усиливали связывание с shPD-L1. Ряд замен, которые приводили к улучшенному связыванию, был идентифицирован и представлен в **Таблице 10**, где замена обозначена с использованием системы нумерации по Kabat и где указан соответствующий аминокислотный остаток в

25 последовательностях, представленных выше. Связывание Fab-фрагментов, содержащих различные комбинации указанных замен, с shPD-L1-His оценивали с помощью ИФА по существу, как описано выше, за исключением того, что использовали вторичные козы антигела против каппа-цепи иммуноглобулина человека, конъюгированные с HRP.

Проверенные репрезентативные варианты суммированы в **Таблице 11**, и кривые связывания представлены на **Фигурах 9А-9В**. Указанные исследования показали, что Fab-фрагменты, содержащие каждый из вариантов (**МAB-2 против hPD-L1B**, **МAB-2 против hPD-L1D** и **МAB-2 против hPD-L1F** показаны на графике на **Фигуре 9А**; **МAB-2 против hPD-L1А**, **МAB-2 против hPD-L1С** и **МAB-2 против hPD-L1Е** показаны на графике на **Фигуре 9В**), проявляли более высокую аффинность по сравнению с Fab, содержащим исходное **МAB-2 против hPD-L1 (1.1)**.

Таблица 10: замены CDR			
VH-домен		VL-домен	
по Кэбату*	SEQ ID NO:57[^]	по Кэбату*	SEQ ID NO:58[^]
S31G	31	T31E	31
G53K	54	D28H или D28V или D28L	28
Q95A или Q95G	99	S52E	52
F100aG	105		

* номер замены в соответствии с системой нумерации по Kabat

[^] соответствующий номер аминокислотного остатка в последовательности с указанным идентификационным номером

10

Вариант	Замена*
МАВ-2 против hPD-L1A	VH(S31G/G53K/Q95A) & VL(D28H)
МАВ-2 против hPD-L1B	VH(S31G/G53K/Q95G) & VL(D28V)
МАВ-2 против hPD-L1C	VH(S31G/G53K/F100aG) & VL(D28L)
МАВ-2 против hPD-L1D	VH(F100aG) & VL(D28L/S52E)
МАВ-2 против hPD-L1E	VH(G53K/Q95A) & VL(D28L)
МАВ-2 против hPD-L1F	VH(G53K/F100aG) & VL(T31E)

* номер замены в соответствии с системой нумерации по Kabat

[00475] Ряд вариантов VH- и/или VL-доменов **МАВ-2 против hPD-L1** использовали для создания **CD137 x OA**-биспецифичных молекул (все из которых содержат два сайта связывания **МАВ-6 против CD137 (1.1)**). Конкретные используемые варианты VL и VH **МАВ-2 против hPD-L1** суммированы в **Таблице 12**, аминокислотные последовательности указанных вариантов и содержащие их биспецифичные молекулы представлены выше. Как отмечено выше, молекулы, содержащие VH/VL-домены **МАВ-2 против PD-L1**, называются со ссылкой на конкретные VH/VL-домены, например, молекула, содержащая связывающие домены **VH3 МАВ-2 против PD-L1** и **VL2 МАВ-2 против hPD-L1**, конкретно называется «**МАВ-2 против PD-L1 (3.2)**».

Вариант	Замена*
VH2 МАВ-2 против hPD-L1	T77S/K83R/T84A
VH3 МАВ-2 против hPD-L1	T77S/K83R/T84A + G53K/F100aG
VH4 МАВ-2 против hPD-L1	T77S/K83R/T84A + Q95A
VH5 МАВ-2 против hPD-L1	T77S/K83R/T84A + G53K/Q95A
VH6 МАВ-2 против hPD-L1	T77S/K83R/T84A + Q95A/ F100aG
VL2 МАВ-2 против hPD-L1	VL(T31E)

* номер замены в соответствии с системой нумерации по Kabat

[00476] Следующие молекулы, содержащие два сайта связывания PD-L1: **DART-A1** (содержащая **МАВ-2 против hPD-L1 (2.1)**); **DART-A4** (содержащая **МАВ-2 против hPD-L1 (3.2)**) и **МАВ-2 против hPD-L1 (1.1)**, и следующие молекулы, содержащие один сайт связывания PD-L1: **TRIDENT-A** (подробно описана выше) и **TRIDENT-A4** (содержащая **МАВ-2 против hPD-L1 (3.2)**), оценивали на предмет связывания с PD-L1 на поверхности клеток JIMT-1 с помощью FACS-анализа по существу, как описано выше. Исследуемые изделия использовали в концентрации 1 мкг/мл и в четырехкратных серийных разведениях. Результаты репрезентативных анализов показаны на **Фигурах 10А-10В**. Указанные молекулы также проверяли на предмет их способности блокировать взаимодействие PD-1/PD-L1 в PD-L1-репортерном анализе по существу,

как описано выше. Исследуемые изделия использовали в концентрации 25 мкг/мл и в четырехкратных серийных разведениях. Результаты репрезентативных анализов показаны на **Фигурах 11А-11В**. Указанные данные показали, что **CD137 x OA**-биспецифичные молекулы, содержащие связывающие домены деиммунизированного/оптимизированного **МAB-2 против hPD-L1 (3.2)**, проявляли улучшенное связывание (**Фигуры 10А-10В**) и более эффективное блокирование взаимодействия PD-1/PD-L1 (**Фигуры 11А-11В**). Умеренное повышение активности наблюдалось для тетравалентных молекул, содержащих два PD-L1-связывающих домена (**DART-A4 на Фигурах 10А и 11А**), более выраженное повышение активности наблюдалось для трехвалентных молекул, содержащих только один PD-L1-связывающий домен (**TRIDENT-A4 на Фигурах 10В и 11В**). Дополнительные молекулы, содержащие два сайта связывания PD-L1: **DART-A4 (содержащую МAB-2 против hPD-L1 (3.2))**, **DART-A7 (содержащую МAB-2 против hPD-L1 (4.2))**, **DART-A8 (содержащую МAB-2 против hPD-L1 (5.2))** и **DART-A9 (содержащую МAB-2 против hPD-L1 (6.2))** оценивали на их способность блокировать взаимодействие PD-1/PD-L1 в PD-L1-репортерном анализе по существу, как описано выше. Исследуемые изделия использовали в концентрации 1,5 мкг/мл и в двукратных серийных разведениях. Результаты репрезентативного анализа показаны на **Фигуре 11С**. Данное исследование показывает, что **CD137 x OA**-биспецифичные молекулы, содержащие альтернативные деиммунизированные/оптимизированные **МAB-2 против hPD-L1 (4.2)**, **МAB-2 против hPD-L1 (5.2)** и **МAB-2 против hPD-L1 (6.2)**, проявляют блокирующую активность, сходную или улучшенную по сравнению с активностью **DART-A4**, содержащим **МAB-2 против hPD-L1 (3.2)**.

ПРИМЕР 6

25 Деиммунизация МAB-6 против CD137

[00477] Для минимизации вероятной иммуногенности вводили замены в каркасные участки VL-домена **МAB-6 против CD137** для замещения остатков не зародышевого типа на остатки, присутствующие в зародышевой линии человека. В частности, вводили комбинации следующих замен: T14S, F36Y и I39K, пронумерованных в соответствии с системой нумерации по Kabat (соответствующие остаткам 14, 37 и 40 последовательности **SEQ ID NO:50**), полученные VL-домены **МAB-6 против CD137** суммированные в **Таблице 13**, ниже, использовались для создания **CD137 x OA**-биспецифичных молекул, способных связываться с CD137 и с репрезентативным **OA**,

PD-L1, аминокислотные последовательности указанных вариантов и содержащие их биспецифичные молекулы представлены выше.

Таблица 13: MAB-6 против CD137 Вариант VL-домена	
Вариант	Замена*
VL2 MAB-6 против CD137	T14S/F36Y/I39K
VL3 MAB-6 против CD137	T14S/I39K

* номер замены в соответствии с системой нумерации по Kabat

[00478] Следующие молекулы, содержащие два сайта связывания **MAB-2 против hPD-L1 (3.2): DART-A4** (содержащая **MAB-6 против CD137 (1.1)**); **DART-A5** (содержащая **MAB-6 против CD137 (1.2)**); **DART-A6** (содержащая **MAB-6 против CD137 (1.3)**), и следующие молекулы, содержащие один сайт связывания **MAB-2 против hPD-L1 (3.2): TRIDENT-A4** (содержащая **MAB-6 против CD137 (1.1)**); **TRIDENT-A5** (содержащая **MAB-6 против CD137 (1.2)**) и **TRIDENT-A6** (содержащая **MAB-6 против CD137 (1.3)**), аналог урелумаба (**r-урелумаб**) и отрицательный контроль **hIgG1** оценивали на их способность связываться с CD137 клеточной поверхности с помощью FACS-анализа, который проводил по существу, как описано выше. Исследуемые изделия использовали в концентрации 3 мкг/мл и в четырехкратных серийных разведениях. Результаты репрезентативного анализа, показанные на **Фигурах 12А-12В**, демонстрируют, что тетравалентные (**Фигура 12А**) и трехвалентные (**Фигура 12В**) **CD137 x PD-L1**-биспецифичные молекул, содержащие связывающие домены **MAB-6 против CD137 (1.3)**, обладают профилями связывания, почти идентичными профилям связывания таких же молекул, содержащих связывающие домены **MAB-6 против CD137 (1.1)**, тогда как молекулы, содержащие **MAB-6 против CD137 (1.2)**, проявляли пониженное связывание.

[00479] Функциональную активность **DART-A4, DART-A5, DART-A6, r-урелумаба, TRIDENT-A4, TRIDENT-A5** и **TRIDENT-A6** и отрицательного контроля **hIgG1** оценивали в CD137-репортерном анализе, который проводили по существу, как описано выше, в присутствии и в отсутствие PD-L1-экспрессирующих клеток-мишеней N87 (10 000 клеток/лунка) или клеток JИМТ-1 (20 000 клеток/лунка). Исследуемые изделия использовали в концентрации 1 мкг/мл и в пятикратных серийных разведениях. Результаты репрезентативного анализа, показанные на **Фигурах 13А-13В**, демонстрируют, что для всех молекул, проявляющих мишень-зависимую активность, более высокая активность наблюдалась в присутствии клеток JИМТ-1 (PD-L1⁺⁺, **Фигура 13В**) по сравнению с клетками N87 (PD-L1⁺, **Фигура 13А**). **CD137 x PD-L1-**

биспецифичные молекулы, содержащие связывающие домены **МAB-6 против CD137 (1.3)**, проявляли профили активности, почти идентичные таким же молекулам, содержащим связывающие домены **МAB-6 против CD137 (1.1)**, тогда как молекулы, содержащие **МAB-6 против CD137 (1.2)**, проявляли сниженную активность. Ни одна из

5 **CD137 x PD-L1**-биспецифичных молекул не проявляла активность в отсутствие клеток-мишеней. Как ожидалось, агонист **r-урелумаб** проявлял активность в присутствии и в отсутствие PD-L1-экспрессирующих клеток-мишеней, а отрицательные контроли совсем не проявляли активность.

[00480] Функциональную активность **DART-A4, DART-A5, DART-A6, r-урелумаба, TRIDENT-A4, TRIDENT-A5** и **TRIDENT-A6** и отрицательного контроля **hIgG1** оценивали в анализе высвобождения цитокинов из первичных Т-клеток в присутствии PD-L1-экспрессирующих клеток ЛИМТ-1 (10 000 клеток/лунка), который проводили по существу, как описано выше. Исследуемые изделия использовали в концентрации 1 мкг/мл и в пятикратных серийных разведениях. Результаты

15 репрезентативного анализа для репрезентативных цитокинов INF- γ и IL-2 показаны на **Фигурах 14А и 14В** соответственно. Как было видно в CD137-репортерном анализе, **CD137 x PD-L1**-биспецифичные молекулы, содержащие связывающие домены **МAB-6 против CD137 (1.3)**, проявляли профили активности, почти идентичные или немного улучшенный по сравнению с такими же молекулами, содержащими связывающие

20 домены **МAB-6 против CD137 (1.1)**, тогда как молекулы, содержащие **МAB-6 против CD137 (1.2)**, проявляли сниженную активность.

ПРИМЕР 7

Дополнительная характеристика CD137 x OA-молекул

[00481] Дополнительные *in vitro* исследования были проведены для оценки

25 активности следующих далее репрезентативных **CD137 x PD-L1**-биспецифичных молекул, содержащих PD-L1- и CD137-связывающие домены **МAB-2 против PD-L1**, новых **МAB-6 против CD137** или его деиммунизированных/оптимизированных вариантов **DART-A; DART-A4; DART-A6; DART-A7; TRIDENT-A; TRIDENT-A4; TRIDENT-A6** и дополнительной тетравалентной молекулы: **DART-A10** (содержащей

30 два сайта связывания **МAB-2 против hPD-L1 (4.2)** и два сайта связывания **МAB-6 против CD137 (1.3)**). CD137- и PD-L1-связывающие домены указанных молекул суммированы в **Таблице 5**, выше.

[00482] **DART-A, DART-A4, DART-A6, DART-A7, DART-A10**, отрицательный контроль **hIgG1** и аналог антитела против PD-L1 атезолизумаба (**r-атезолизумаб**), **MAВ-2 против hPD-L1F** или **r-урелумаб**, оценивали на их способность связываться с поверхностью клеток CHO, экспрессирующих PD-L1 (CHO/PD-L1) или CD137 (CHO/CD137), с помощью FACS-анализа по существу, как описано выше, где 5 исследуемые изделия использовали в начальной концентрации, составляющей 3 мкг/мл, и в 3-4-кратных разведениях. Результаты репрезентативных анализов показаны на **Фигурах 15А-15В**. Указанные исследования связывания демонстрируют, что **CD137 x OA-связывающие** молекулы, содержащие оптимизированные PD-L1-связывающие домены (**DART-A4, DART-A6, DART-A7, DART-A10**), проявляют улучшенное связывание с PD-L1 по сравнению с **DART-A** (**Фигура 15А**). Сходные профили связывания с PD-L1 наблюдались при связывании с клетками JIMT-1 (PD-L1⁺). Указанные исследования также демонстрируют, что **CD137 x OA-связывающие молекулы**, содержащие связывающие домены **MAВ-6 против CD137 (1.3)** и **MAВ-6 против CD137 (1.1)**, проявляют сходное связывание, улучшенное по сравнению с **r-урелумабом** (**Фигура 15В**). 10 15

[00483] **DART-A, DART-A4, DART-A6, DART-A7, DART-A10, TRIDENT-A, TRIDENT-A4, TRIDENT-A6, MAВ-2 против hPD-L1F, r-атезолизумаб** и отрицательный контроль **hIgG1** оценивали на предмет их способности блокировать взаимодействие PD-1/PD-L1 в PD-L1-репортерном анализе по существу, как описано выше. Исследуемые изделия использовали в концентрации 3 мкг/мл и в двукратных серийных разведениях. Результаты репрезентативных анализов показаны на **Фигурах 16А-16В**. Указанные исследования снова показали, что тетравалентные (**Фигура 16А**) и трехвалентные (**Фигура 16В**) **CD137 x OA-биспецифичные** молекулы, содержащие связывающие домены деиммунизированного/оптимизированного **MAВ-2 против hPD-L1 (3.2)** или **MAВ-2 против hPD-L1 (4.2)**, проявляли более эффективное блокирование взаимодействий PD-1/PD-L1 по сравнению с молекулами, содержащими исходный связывающий домен, **MAВ-2 против hPD-L1 (1.1)**, при этом повышение активности не зависело от CD137-связывающего домена. Как отмечается выше, в данном анализе более 25 30 выраженное повышение активности наблюдалось для трехвалентных молекул, содержащих один PD-L1-связывающий домен, при этом активность приближалась к значению, наблюдаемому при использовании антител против PD-L1 **MAВ-2 против**

hPD-L1F и **r-атезолизумаба** (каждое из которых содержит два PD-L1-связывающих домена).

[00484] Функциональную активность **DART-A**, **DART-A4**, **DART-A5**, **DART-A6**, **TRIDENT-A4**, **TRIDENT-A5** и **TRIDENT-A6**, **r-урелумаба** и отрицательного контроля **hIgG1** оценивали в CD137-репортерном анализе, который проводили по существу, как описано выше, в присутствии и в отсутствие PD-L1-экспрессирующих клеток ЛМТ-1 (10 000 клеток/лунка). Исследуемые изделия использовали в концентрации 1 мкг/мл и в пятикратных серийных разведениях (концентрации указаны в нижней части **Фигуры 14А**, например). Результаты репрезентативного анализа показаны на **Фигурах 17А-17В** и демонстрируют, что все бивалентные молекулы проявляли мишень-зависимую активность с высоким уровнем активности в присутствии клеток ЛМТ-1 (**Фигура 17А**) и с отсутствием активности в отсутствие клеток-мишеней (**Фигура 17В**). Молекулы, содержащие деиммунизированные/оптимизированные PD-L1- и CD137-связывающие домены, проявляли более высокую активность (например, **TRIDENT-A6** и **DART-A10**) по сравнению с молекулами, содержащими исходные домены. В данном анализе трехвалентные молекулы проявляли более высокую активность, и более выраженной повышению активности наблюдалось для трехвалентных молекул.

[00485] Функциональную активность **DART-A**, **DART-A4**, **DART-A5**, **DART-A6**, **r-урелумаба**, **TRIDENT-A4**, **TRIDENT-A5** и **TRIDENT-A6**, комбинации **r-урелумаба** и **r-атезолизумаба** и отрицательного контроля **hIgG1** также оценивали в анализе высвобождения цитокинов из первичных Т-клеток в присутствии PD-L1-экспрессирующих клеток ЛМТ-1 (10 000 клеток/лунка), который проводили по существу, как описано выше. Исследуемые изделия использовали в концентрации 1 мкг/мл и в пятикратных серийных разведениях (концентрация указана в нижней части **Фигуры 14А**, например). Результаты репрезентативного анализа для репрезентативных цитокинов **INF-γ** и **IL-2** показаны на **Фигурах 18А** и **18В** соответственно. Как было видно в CD137-репортерном анализе, трехвалентные **CD137 x PD-L1**-биспецифичные молекулы, содержащие деиммунизированные/оптимизированные PD-L1- и CD137-связывающие домены, проявляли более высокую активность (например, **TRIDENT-A6**).

ПРИМЕР 8

Модели мышинных ксенотрансплантатов

[00486] Как предложено в настоящей заявке, **CD137 x OA-связывающие молекулы** согласно настоящему изобретению могут применяться в комбинации с другими нацеленными на опухоль агентами. Способность репрезентативных **PD-L1 x CD137-биспецифичных молекул DART-A4, TRIDENT-A и TRIDENT-A4** усиливать противоопухолевую активность репрезентативной **OA x CD3-биспецифичной молекулы** – диатела **5T4 x CD3** (последовательность предложена ниже) – исследовали *in vivo* на модели замещенного человеческими мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) мышинового ксенотрансплантата. Вкратце, свежевыделенные МКПК (8×10^6) инъецировали ретроорбитально на 0 день исследования (ДИ) мышам МНСI-/- . На ДИ 7 клетки карциномы толстой кишки RKO (5×10^6) инъецировали подкожно в смеси 1:1 с матригелем. На ДИ 7 мышей обрабатывали ОКТ4. На ДИ 14 начинали лечение (посредством внутривенного введения) с помощью **5T4 x CD3-диатела** (два раза в неделю в дозе 0,025 мг/кг) и лечение с помощью **PD-L1 x CD137-биспецифичной молекулы** (раз в неделю в дозе 1 или 2 мг/кг). Опухолевый рост измеряли два раза в неделю с помощью кронциркуля (N=7/группа). Как показано на **Фигурах 19A-19C, OA x CD3-биспецифичная молекула** вызывала только минимальное подавление опухолевого роста в исследуемых концентрациях. Однако комбинация **PD-L1 x CD137-биспецифичной молекулы и 5T4 x CD3-диатела** приводила к существенному подавлению опухолевого роста. Данное исследование демонстрирует, что **PD-L1 x CD137-биспецифичные молекулы, содержащие связывающий домен нового антитела МАВ-6 против CD137, может подавлять опухолевый рост в комбинации с OA x CD3-биспецифичной молекулой in vivo.**

[00487] В другом исследовании оценивали способность репрезентативных **PD-L1 x CD137-биспецифичных молекул DART-A10 и TRIDENT-A6**, каждая из которых содержит два сайта связывания **МАВ-6 против CD137 (1.3)**, усиливать противоопухолевую активность **5T4 x CD3-диатела**. Исследование осуществляли по существу, как описано выше, за исключением того, что **PD-L1 x CD137-биспецифичные молекулы** вводили каждые 5 дней (4 дня в случае выходных) в концентрациях 0,5, 1 или 2,5 мг/кг. Опухолевый рост измеряли два раза в неделю с помощью кронциркуля (N=8/группа). Как показано на **Фигурах 20A-20B, DART-A10 и**

TRIDENT-A6 также подавляли опухолевый рост в комбинации с **5T4 x CD3-диателом**. Данное исследование демонстрирует, что **PD-L1 x CD137-биспецифичные молекулы**, содержащие связывающий домен деиммунизированного антитела **MAВ-6 против CD137**, могут подавлять опухолевый рост в комбинации с **ОА x CD3-биспецифичной молекулой *in vivo***.

[00488] В дополнительных исследованиях комбинированного лечения активность **PD-L1 x CD137-биспецифичных молекул TRIDENT-A6, TRIDENT-A** (каждая из которых содержит VH/VL связывающего домена **MAВ-6 против CD137**) сравнивали с активностью **TRIDENT-2** и **PD-L1 x CD137-биспецифичной молекулы DUOBODY®**, которая обозначается как «PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR» и описана в публикации международной заявки WO 2019/025545 (в настоящей заявке используется сокращение **DUO-1**, аминокислотная последовательность указанной молекулы предложена ниже). Исследования проводили по существу, как описано выше, за исключением того, что **PD-L1 x CD137-биспецифичные молекулы** вводили каждые 5 дней (4 дня в случае выходных) в концентрации, варьирующей между 0,1 мг/кг и 5 мг/кг в различных экспериментах. Опухолевый рост измеряли два раза в неделю с помощью кронциркуля (N=8/группа). Репрезентативные данные от двух исследований (замечание: **TRIDENT-2** использовали только в дозе 1 мг/кг в исследовании 1) показаны на графиках на **Фигурах 21A и 21B** и демонстрируют, что **TRIDENT-A** и **TRIDENT-A6** проявляли противоопухолевую активность, которая была сравнима или немного превышала активность **TRIDENT-2**, и обладали более высокой активностью по сравнению с **DUO-1**.

[00489] Репрезентативная **ОА x CD3-биспецифичная молекула – 5T4 x CD3-диатело**, используемое в описанных выше исследованиях на мышинных ксенотрансплантатах, – представляет собой бивалентной диатело, содержащее один сайт связывания опухолевого антигена 5T4 и один сайт связывания CD3. Молекула имеет общую структуру, показанную на **Фигуре 1D**, и содержит следующие три полипептидные цепи:

5T4 x CD3- диатело, 1 цепь	DIQMTQSPSS LSASVGDVRT ITCRASQGIS NYLAWFQQKP GKAPKSLIYR ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISLQP EDVATYYCLQ YDDFPWTFGQ GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISR DSKNSLYLQM NSLKTЭДТАV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS GGCGGGEVAA LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
----------------------------------	---

	REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO:140)
5T4 x CD3- диатело, 2 цепь	QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSF WMHWVRQAPG QGLEWMGRID PNRGGTEYNE KAKSRVTMTA DKSTSTAYME LSSLRSЭДТА VYYCAGGNPY YPMDYWGQGT TVTVSSGGCG GKKVAALKEK VAALKEKVAA LKEKVAALKE (SEQ ID NO:141)
5T4 x CD3- диатело, 3 цепь	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO:142)

[00490] Биспецифичная молекула PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR, используемая в описанных выше исследованиях на мышинных ксенотрансплантатах, описана в публикации международной заявки WO 2019/025545. Молекула обладает специфичностью связывания с PD-L1 и CD137, отличной от молекул, предложенных в

5 настоящей заявке, и содержит следующие четыре полипептидные цепи:

VH_CD137-009-H7 IgG1-FEAR-Fc	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCTASGFSLN DYWMSWVRQA PGKGLEWVGY IDVGGSLYYA ASVKGRFTIS RDDSLSIAYL QMNSLKTEDT AVYYCARGGL TYGFDLWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKHTTCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVAVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO:157)
VL_CD137-009-L2 каппа-С	DIVMTQSPSS LSASVGRVIT ITCQASEDIS SYLAWYQQKP GKAPKRLIYG ASDLASGVPS RFSASGSGTD YFTFTISLQP EDIATYYCHY YATISGLGVA FGGGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC (SEQ ID NO:158)
VH-PD-L1-547 IgG1- FEAL-Fc	EVQLLEPGGG LVQPGGSLRL SCEASGSTFS TYAMSWVRQA PGKGLEWVSG FSGSGGFTFY ADSVGRFTI SRDSSKNTLF LQMSSLRAED TAVYYCAIPA RGYNYGSFQH WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVK PKSCDKHTC PPCPAPEFEG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVAVVAV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSGDFLL YSKLTVDKSR WQQGNVFCSS VMHEALHNHY TQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO:159)
VL- PD-L1-547 лямбда-С	SYVLTQPPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVVYDD NDRPSGLPER FSGSNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHVVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTSPKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS (SEQ ID NO:160)

ПРИМЕР 9

Характеристика дополнительных CD137 x OA-связывающих молекул

[00491] Были созданы **CD137 x OA-связывающие молекулы**, способные связываться с CD137 и с репрезентативным **OA**, HER2, содержащие VH- и VL-домены

5 **MAВ-6 против CD137 (1.1)** и VH- и VL-домены **MAВ-1 против hHER2 (1.3)**. В данном исследовании проверяли ряд дополнительных конфигураций биспецифичных молекул. В частности, было создано бивалентное биспецифичное диатело, обозначенное как «**DART-B1**», содержащее домены биспецифичного диатела и имеющее асимметричную

10 структуру, показанную на **Фигуре 1D**, и трехвалентная связывающая молекула, обозначенная как «**TRIDENT-B2**», содержащая биспецифичный связывающий домен по типу диатела (где сайт А связывается с CD137, и сайт В связывается с **OA**) и связывающий домен не по типу диатела (сайт С связывается с CD137), имеющая структуру, показанную на **Фигуре 3А**. Кроме того, были созданы молекулы, имеющие такие же общие конфигурации, как ранее охарактеризованные молекулы. В частности,

было создано тетравалентное биспецифичное диатело, обозначенное как «**DART-B2**», содержащее идентичные связывающие домены биспецифичного диатела и имеющее антитело-подобную Y-структуру, показанную на **Фигуре 1B**, и трехвалентная связывающая молекула, обозначенная как «**TRIDENT-B1**», содержащая

5 моноспецифичный связывающий домен по типу диатела (где сайты А и В связываются с CD137) и связывающий домен не по типу диатела (сайт С связывается с **ОА**). Характеристики доменов указанных молекул и конкретных биспецифичных контрольных молекул и молекул сравнения, имеющих такие же структуры, обсуждаются выше (см., например, **Таблицы 5-6**).

10 [00492] Функциональную активность **DART-B1**, **DART-B2**, **TRIDENT-B1**, **TRIDENT-B2**, исходных антител **MAВ-6 против CD137 (1.1)** и **HER2 MAВ-1(1.3)** и отрицательных контролей **DART-4**, **DART-5**, **TRIDENT-3** и **TRIDENT-4** (CD137 x RSV-связывающих молекул, имеющих структуры, сравнимые с каждым исследуемым

15 изделием) оценивали в CD137-репортерном анализе, который проводили по существу, как описано выше, в присутствии и в отсутствие HER2-экспрессирующих клеток (JIMT-1 (HER2⁺⁺) или N87 (HER2⁺⁺⁺) в концентрации 20 000 клеток на лунку). Исследуемые изделия использовали в концентрации 1 мкг/мл и в пятикратных серийных разведениях. Результаты репрезентативного анализа с использованием клеток JIMT-1 и N87 показаны на **Фигурах 22А и 22В** соответственно и демонстрируют, что все из **CD137 x HER2-**

20 **биспецифичных молекул, содержащих связывающий домен MAВ-6 против CD137 (1.1)**, опосредовали мишень-зависимую передачу сигнала, тогда как исходные антитела и отрицательные контроли не проявляли активность.

[00493] Функциональную активность **DART-B1**, **DART-B2**, **TRIDENT-B1**, **TRIDENT-B2**, исходных антител **MAВ-6 против CD137 (1.1)** и **MAВ-1 против HER2**

25 **(1.3)** и отрицательных контролей **DART-4**, **DART-5**, **TRIDENT-3** и **TRIDENT-4**, также оценивали в анализе высвобождения цитокинов из первичных Т-клеток в присутствии HER2-экспрессирующих клеток (JIMT-1 и N87 в концентрации 10 000 клеток на лунку), который проводили по существу, как описано выше. Исследуемые изделия использовали в концентрации 1 мкг/мл и в пятикратных серийных разведениях.

30 Результаты репрезентативного анализа с использованием клеток JIMT-1 показаны на **Фигурах 23А (INF-γ)** и **23С (IL-2)** и результаты с использованием клеток N87 показаны на **Фигурах 23В (INF-γ)** и **23D (IL-2)**. Как было видно в CD137-репортерном анализе, все из **CD137 x HER2-**биспецифичных молекул, содержащих связывающий домен

MAВ-6 против CD137 (1.1), опосредовали мишень-зависимое высвобождение цитокинов, в частности, в клетках N87 с высокой экспрессией HER2, тогда как исходные антитела и отрицательные контроли не проявляли активность.

[00494] Указанные исследования демонстрируют, что бивалентные, тетравалентные и трехвалентные **CD137 x OA**-биспецифичные молекулы, содержащие связывающий домен **MAВ-6 против CD137 (1.1) (DART-B1, DART-B2, TRIDENT-B1/B2** соответственно), опосредовали мишень-зависимую передачу сигнала. Следует отметить, что положение CD137-связывающих доменов в TRIDENT-B2 изменено по сравнению с TRIDENT-B1. Данное исследование демонстрирует, что молекула **MAВ-6 против CD137** является функциональной при связывании с дополнительными опухолевыми антигенами в различных конфигурациях, даже когда она представлена в виде единственного сайта связывания.

[00495] Все публикации и патенты, упомянутые в настоящей заявке, включены в настоящую заявку посредством ссылки в той же степени, как если бы было конкретно и отдельно указано, что каждая отдельная публикация или патентная заявка полностью включена посредством ссылки. Необходимо понимать, что несмотря на то что настоящее изобретение было описано в связи с конкретными вариантами его реализации, возможны его дополнительные модификации. Предполагается, что настоящая заявка охватывает любые варианты, способы применения или адаптации настоящего изобретения, в целом, в соответствии с идеями настоящего изобретения и включает такие отклонения от настоящего изобретения, предполагая, что они находятся в пределах известной или общепринятой практики в области техники, к которой относится настоящее изобретение, и могут применяться в отношении основных признаков изобретения, изложенных ранее в настоящей заявке.

25

Предпочтительные аспекты настоящего изобретения:

1. **CD137-связывающая молекула**, содержащая первый сайт связывания, который иммуноспецифично связывается с эпитопом CD137, где указанный первый сайт связывания содержит первый переменный домен легкой цепи, который содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3}, и первый переменный домен тяжелой цепи, который содержит CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3}; где:

30

- (A) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} первого переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL1 MAB-6 против CD137 (SEQ ID NO:50)** и
- (B) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} первого переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH1 MAB-6 против CD137 (SEQ ID NO:46)**.
- 5
2. **CD137-связывающая молекула** по п. 1, характеризующаяся тем, что указанный первый переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность **VH1 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:46)**.
- 10
3. **CD137-связывающая молекула** по любому из пп. 1-2, характеризующаяся тем, что указанный первый переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность:
- (A) **VL1 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:54)**;
- (B) **VL1 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:50)**;
- (B) **VL2 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:55)** или
- (C) **VL3 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:56)**.
- 15
4. **CD137-связывающая молекула** по любому из пп. 1-3, характеризующаяся тем, что:
- (A) указанный первый переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность **VH1 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:46)** и
- (B) указанный первый переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность **VL3 MAB-6 против hCD137 (SEQ ID NO:56)**.
- 20
5. **CD137-связывающая молекула** по любому из пп. 1-4, характеризующаяся тем, что указанная молекула представляет собой биспецифичную молекулу, содержащую второй сайт связывания, который иммуноспецифично связывается с опухолевым антигеном (**ОА**), где указанный второй сайт связывания содержит второй переменный домен легкой цепи, который содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3}, и второй
- 25
- 30

вариабельный домен тяжелой цепи, который содержит CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3}.

6. **CD137-связывающая молекула** по п. 5, характеризующаяся тем, что указанный **ОА** выбран из антигенов, представленных в **Таблицах 1-2**.
- 5 7. **CD137-связывающая молекула** по п. 5, характеризующаяся тем, что указанный **ОА** представляет собой PD-L1, где:
- (A) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго вариабельного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VLx MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:63)** и
- 10 (B) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго вариабельного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VHx MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:59)**.
8. **CD137-связывающая молекула** по п. 7, характеризующаяся тем, что:
- (A) (1) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго вариабельного
- 15 домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL1 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:58)** или
- (2) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго вариабельного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:72)**
- 20 и
- (B) (1) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго вариабельного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH1 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:57)**;
- (2) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго вариабельного
- 25 домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:67)**;
- (3) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго вариабельного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH3 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:68)**;
- 30 (4) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго вариабельного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:69)**;

- (5) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:70)** или
- (6) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:71)**.
- 5
9. **CD137-связывающая молекула** по п. 8, характеризующаяся тем, что указанный второй переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность:
- 10 (A) **VH1 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:57)**;
(B) **VH2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:67)**;
(C) **VH3 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:68)**;
(D) **VH4 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:69)**;
(E) **VH5 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:70)** или
15 (F) **VH6 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:71)**.
10. **CD137-связывающая молекула** по любому из пп. 8 или 9, характеризующаяся тем, что указанный второй переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность:
- 20 (A) **VL1 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:58)** или
(B) **VL2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:72)**.
11. **CD137-связывающая молекула** по п. 5, характеризующаяся тем, что **OA** представляет собой 5T4, где:
- 25 (A) (1) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL MAB-1 против 5T4 (SEQ ID NO:93)** и
(2) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH MAB-1 против 5T4 (SEQ ID NO:92)** или
(B) (1) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL MAB-2 против 5T4 (SEQ ID NO:95)** и
30

- (2) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH MAB-2 против 5T4 (SEQ ID NO:96)**.
12. **CD137 x OA-связывающая молекула** по п. 11, характеризующаяся тем,
5 что второй переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VH MAB-1 против 5T4 (SEQ ID NO:92)**.
13. **CD137 x OA-связывающая молекула** по п. 11 или 12, характеризующаяся тем, что второй переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность: **VL MAB-1 против 5T4 (SEQ ID NO:93)**.
10
14. **CD137-связывающая молекула** по п. 5, характеризующаяся тем, что **OA** представляет собой HER2, где:
15
(A) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VLx MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:79)**; и
(B) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VHx MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:78)**;
15. **CD137-связывающая молекула** по п. 14, характеризующаяся тем, что:
20
(A) (1) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL1 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:83)**;
(2) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL2 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:84)** или
25
(3) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL3 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:85)**

и

- (B) (1) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH1 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:80)**;
- 5 (2) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH2 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:81)** или
- (3) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH3 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:82)**.
- 10 16. **CD137-связывающая молекула** по п. 15, характеризующаяся тем, что указанный второй переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность:
- (A) **VH1 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:80)**;
- (B) **VH2 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:81)** или
- 15 (C) **VH3 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:82)**.
17. **CD137-связывающая молекула** по любому из пп. 15 или 16, характеризующаяся тем, что указанный второй переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность:
- (A) **VL1 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:83)**;
- 20 (B) **VL2 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:84)** или
- (C) **VL3 MAB-1 против hHER2 (SEQ ID NO:85)**.
18. **CD137-связывающая молекула** по любому из пп. 1-17, которая представляет собой антитело или биспецифичное тетравалентное Fc-содержащее диатело или биспецифичную тривалентную молекулу.
- 25 19. **CD137-связывающая молекула** по любому из пп. 1-17, характеризующаяся тем, что указанная молекула является биспецифичной и тетравалентной и содержит первую, вторую, третью и четвертую полипептидную цепь, где указанные полипептидные цепи образуют ковалентно связанный комплекс.
- 30 20. **CD137-связывающая молекула** по любому из пп. 1-17, характеризующаяся тем, что указанная молекула является биспецифичной

и трехвалентной и содержит первую, вторую, третью и четвертую, полипептидную цепь, где указанные полипептидные цепи образуют ковалентно связанный комплекс.

21. **CD137-связывающая молекула** по п. 19, характеризующаяся тем, что
5 указанный **ОА** представляет собой PD-L1, где:
- (A) указанные первая и третья полипептидные цепи содержат
 аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:116, SEQ ID
 NO:118** или **SEQ ID NO:120** и
- (B) указанные вторая и четвертая полипептидные цепи содержат
10 аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:117, SEQ ID
 NO:119, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:123, SEQ
 ID NO:124, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:126** или **SEQ ID NO:139**.
22. **CD137-связывающая молекула** по п. 21, характеризующаяся тем, что
 указанная молекула содержит:
- 15 (A) **SEQ ID NO:116** и **SEQ ID NO:117**;
- (B) **SEQ ID NO:118** и **SEQ ID NO:119**;
- (C) **SEQ ID NO:120** и **SEQ ID NO:119**;
- (D) **SEQ ID NO:118** и **SEQ ID NO:121**;
- (E) **SEQ ID NO:120** и **SEQ ID NO:121**;
- 20 (F) **SEQ ID NO:120** и **SEQ ID NO:122**;
- (G) **SEQ ID NO:120** и **SEQ ID NO:123**;
- (H) **SEQ ID NO:120** и **SEQ ID NO:124**;
- (I) **SEQ ID NO:120** и **SEQ ID NO:125**;
- (J) **SEQ ID NO:120** и **SEQ ID NO:126** или
- 25 (K) **SEQ ID NO:120** и **SEQ ID NO:139**.
23. **CD137-связывающая молекула** по п. 20, характеризующаяся тем, что
 указанный **ОА** представляет собой PD-L1, где:
- (A) указанная первая полипептидная цепь содержит аминокислотную
 последовательность **SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:133** или **SEQ ID
30 NO:135**;

- (B) указанная вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:128**, **SEQ ID NO:134** или **SEQ ID NO:136**;
- (C) указанная третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:129** или **SEQ ID NO:131** и
- (D) указанная четвертая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:130**, **SEQ ID NO:132**.
24. **CD137-связывающая молекула** по п. 23, характеризующаяся тем, что указанная молекула содержит:
- (A) **SEQ ID NO:127**, **SEQ ID NO:128**, **SEQ ID NO:129** и **SEQ ID NO:130**;
- (B) **SEQ ID NO:127**, **SEQ ID NO:128**, **SEQ ID NO:131** и **SEQ ID NO:132**;
- (C) **SEQ ID NO:133**, **SEQ ID NO:134**, **SEQ ID NO:131** и **SEQ ID NO:132** или
- (D) **SEQ ID NO:135**, **SEQ ID NO:136**, **SEQ ID NO:131** и **SEQ ID NO:132**.
25. Фармацевтическая композиция, содержащая **CD137-связывающую молекулу** по любому из пп. 1-24 и физиологически приемлемый носитель.
26. Применение **CD137-связывающей молекулы** по любому из пп. 6-24 или фармацевтической композиции по п. 25 в лечении заболевания или состояния, связанного с экспрессией ОА или характеризующегося экспрессией ОА.
27. **PD-L1-связывающая молекула**, содержащая переменный домен легкой цепи, который содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3}, и переменный домен тяжелой цепи, который содержит CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3}; где:
- (A) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи **VL2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:72)**

и

- 5
- (B) (1) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:67)**;
- (2) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH3 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:68)**;
- 10 (3) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH4 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:69)**;
- (4) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH5 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:70)** или
- 15 (5) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи **VH6 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:71)**.

28. **PD-L1-связывающая молекула** по п. 27, характеризующаяся тем, что указанный переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность:

- 20 (A) **VH2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:67)**;
- (B) **VH3 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:68)**;
- (C) **VH4 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:69)**;
- (D) **VH5 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:70)** или
- (E) **VH6 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:71)**.

25 29. **PD-L1-связывающая молекула** по любому из пп. 27-28, характеризующаяся тем, что указанный переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность **VL2 MAB-2 против hPD-L1 (SEQ ID NO:72)**.

30 30. **PD-L1-связывающая молекула** по любому из пп. 27-29, характеризующаяся тем, что указанная молекула представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент.

31. Фармацевтическая композиция, содержащая **PD-L1-связывающую молекулу** по любому из пп. 27-30 и физиологически приемлемый носитель.
- 5 32. Применение **PD-L1-связывающей молекулы** по любому из пп. 27-30 или фармацевтической композиции по п. 31 для лечения заболевания или состояния, связанного с супрессией иммунной системы или характеризующегося экспрессией PD-L1.
- 10 33. Применение по п. 32, характеризующееся тем, что указанное заболевание или состояние, связанное с супрессией иммунной системы или характеризующееся экспрессией PD-L1, представляет собой рак.
- 15 34. Применение по любому из пп. 26 или 33, характеризующееся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из: рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного и спинного мозга, рака молочной железы, рака шейки матки, рака толстой и прямой кишки, рака желчного пузыря или рака желчного протока, рака желудка, глиобластомы, рака головы и шеи, гепатоклеточной карциномы, рака почки, лейкоза, рака печени, рака легкого, меланомы, нейробластомы, немелкоклеточного рака легкого (НМКРЛ), рака яичников, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, рабдомиосаркомы, рака кожи, плоскоклеточного рака головы и шеи (ПКРГШ), рака желудка, рака яичек, карциномы вилочковой железы и рака матки.
- 20 35. Способ усиления активности нацеленного на опухоль агента, включающий введение указанного нацеленного на опухоль агента в комбинации с **CD137-связывающей молекулой** по любому из пп. 1-24, **PD-L1-связывающей молекулы** по любому из пп. 27-30 или фармацевтической композиции по любому из пп. 25 или 31.
- 25 36. Способ лечения заболевания или состояния, связанного с супрессией иммунной системы или характеризующегося экспрессией **ОА**, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту **CD137-связывающей молекулы** по любому из пп. 1-24, **PD-L1-связывающей**
- 30

молекулы по любому из пп. 27-30 или фармацевтической композиции по п. 25 или 31.

37. Способ по п. 36, характеризующийся тем, что состояние, связанное с
5 супрессией иммунной системы или характеризующееся экспрессией **ОА**, представляет собой рак.
38. Способ по п. 36 или 37, дополнительно включающий введение нацеленного на опухоль агента.
39. Способ по п. 35 или 38, характеризующийся тем, что указанный
10 нацеленный на опухоль агент представляет собой антитело, эпитоп-связывающий фрагмент антитела или агент, который опосредует перенаправленное Т-клеточное уничтожение клетки-мишени.
40. Способ по любому из пп. 36-38, характеризующийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из: рака мочевого пузыря, рака кости, рака
15 головного и спинного мозга, рака молочной железы, рака шейки матки, рака толстой и прямой кишки, рака желчного пузыря или рака желчного протока, рака желудка, глиобластомы, рака головы и шеи, гепатоклеточной карциномы, рака почки, лейкоза, рака печени, рака легкого, меланомы, нейробластомы, немелкоклеточного рака легкого
20 (НМКРЛ), рака яичников, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, рабдомиосаркомы, рака кожи, плоскоклеточного рака головы и шеи (ПКРГШ), рака желудка, рака яичек, карциномы вилочковой железы и рака матки.
- 25 41. Нуклеиновая кислота, кодирующая **CD137-связывающую молекулу** по любому из пп. 1-24 или **PD-L1-связывающую молекулу** по любому из пп. 27-30.
42. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 41.
43. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 41 или вектор экспрессии
30 по п. 42.

44. Клетка по п. 43, характеризующаяся тем, что указанная клетка представляет собой клетку млекопитающего.

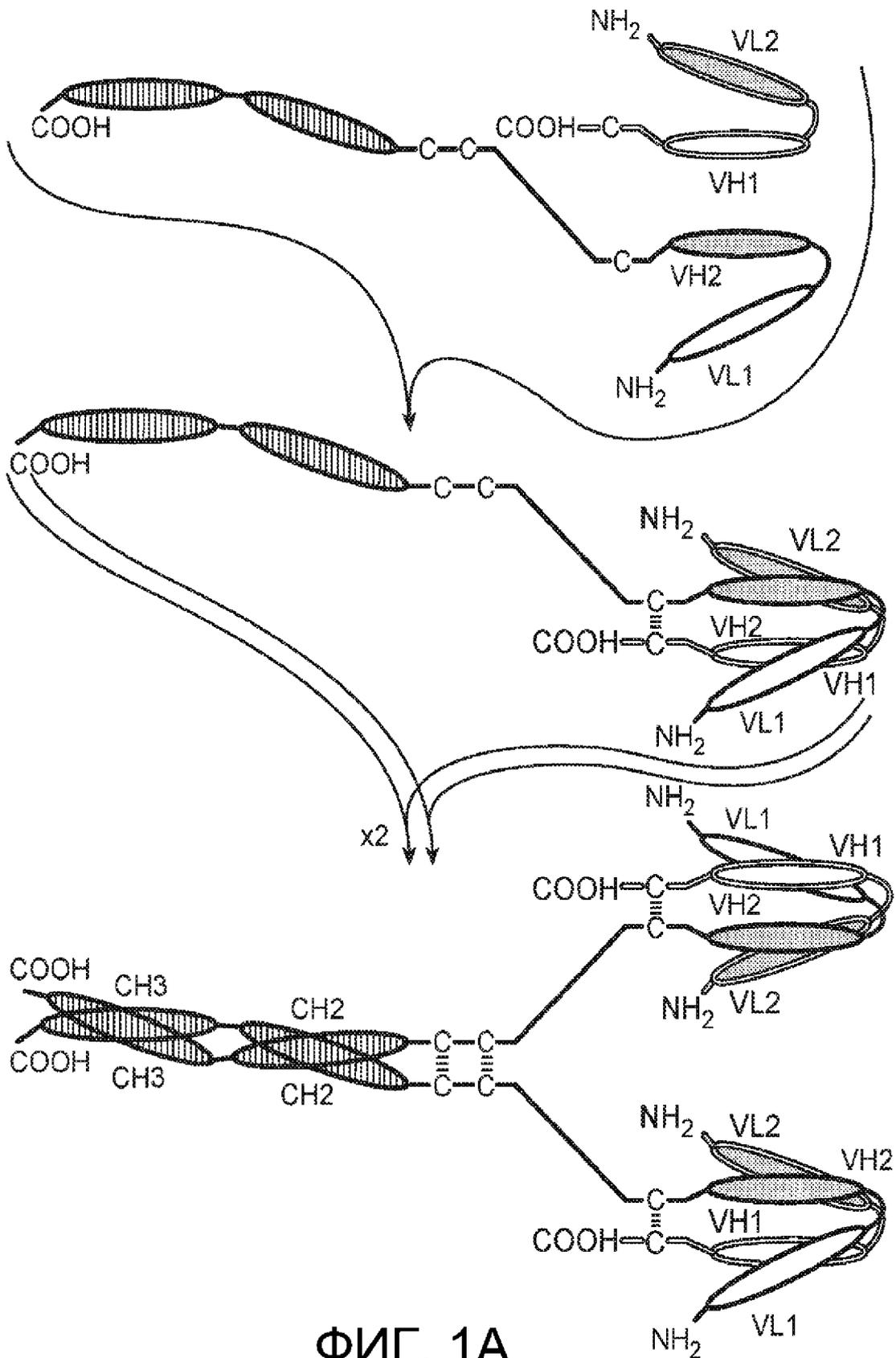
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. PD-L1-связывающая молекула, содержащая первый сайт связывания, который иммуноспецифично связывается с эпитопом PD-L1, где указанный первый сайт связывания содержит первый переменный домен легкой цепи, который содержит первый переменный домен легкой цепи, который содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3}, и переменный домен тяжелой цепи, который содержит CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3}; где:
 - (A) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} первого переменного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи аминокислотной последовательности **SEQ ID NO:63**; и
 - (B) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} первого переменного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи аминокислотной последовательности **SEQ ID NO:59**.
2. PD-L1-связывающая молекула по п. 1, характеризующаяся тем, что:
 - (A) указанный первый переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:72**; и
 - (B) указанный первый переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70** или **SEQ ID NO:71**
3. PD-L1-связывающая молекула по п. 1 или п. 2, характеризующаяся тем, что:
 - (A) указанный первый переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:72**; и
 - (B) указанный первый переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:69**.
4. PD-L1-связывающая молекула по любому из пп. 1-3, характеризующаяся тем, что указанная молекула представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
5. PD-L1-связывающая молекула по любому из пп. 1-4, содержащая второй сайт связывания, который иммуноспецифично связывается с эпитопом CD137, где указанный второй сайт связывания содержит второй

вариабельный домен легкой цепи, который содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3}, и второй вариабельный домен тяжелой цепи, который содержит CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3}; и где:

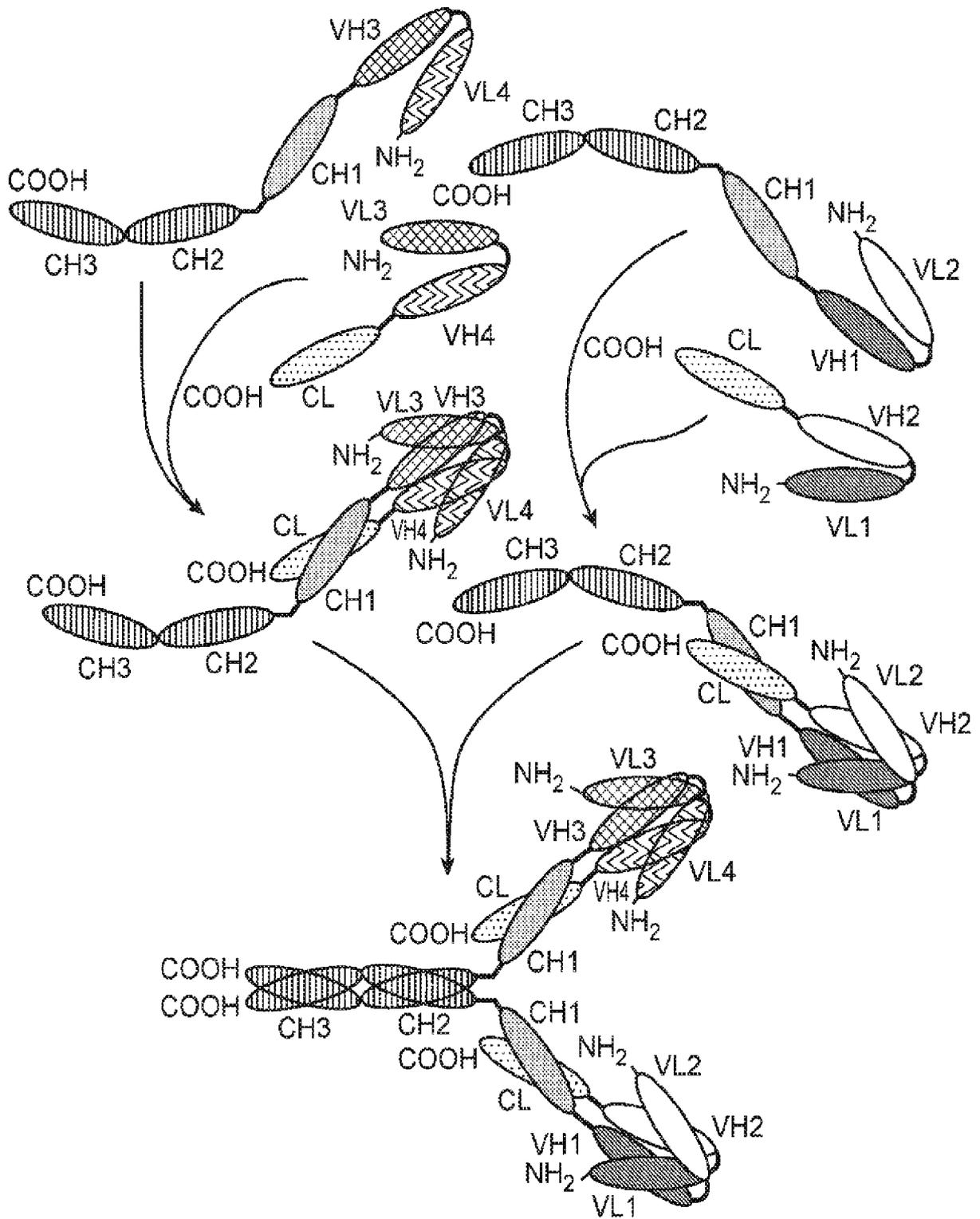
- 5 (A) указанные CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} второго вариабельного домена легкой цепи представляют собой CDR легкой цепи аминокислотной последовательности **SEQ ID NO:50**; и
- (B) указанные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} второго вариабельного домена тяжелой цепи представляют собой CDR тяжелой цепи аминокислотной последовательности **SEQ ID NO:46**.
- 10 6. PD-L1-связывающая молекула по п. 5, характеризующаяся тем, что:
- (A) указанный второй вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:46**; и
- (B) указанный второй вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:50**, **SEQ ID**
- 15 **NO:55** или **SEQ ID NO:56**.
7. PD-L1-связывающая молекула по п. 5 или п. 6, где:
- (A) указанный второй вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:46**; и
- (B) указанный второй вариабельный домен легкой цепи содержит
- 20 аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:56**.
8. Фармацевтическая композиция, содержащая PD-L1-связывающую молекулу по любому из пп. 1-7, и физиологически приемлемый носитель.
9. PD-L1-связывающая молекула по любому из пп. 1-7 или фармацевтическая композиция по п. 8, для получения лекарственного
- 25 средства.
10. PD-L1-связывающая молекула по любому из пп. 1-7 или фармацевтическая композиция по п. 8 для лечения рака.
11. PD-L1-связывающая молекула или фармацевтическая композиция по п. 10, характеризующаяся тем, что указанный рак выбран из группы,
- 30 состоящей из: рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного и

- 5 спинного мозга, рака молочной железы, рака шейки матки, рака толстой и прямой кишки, рака желчного пузыря или рака желчного протока, рака желудка, глиобластомы, рака головы и шеи, гепатоклеточной карциномы, рака почки, лейкоза, рака печени, рака легкого, меланомы, нейробластомы, немелкоклеточного рака легкого (НМКРЛ), рака яичников, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, рабдомиосаркомы, рака кожи, плоскоклеточного рака головы и шеи (ПКРГШ), рака желудка, рака яичек, карциномы вилочковой железы и рака матки.
- 10 12. Нуклеиновая кислота, кодирующая PD-L1-связывающую молекулу по любому из пп. 1-7.



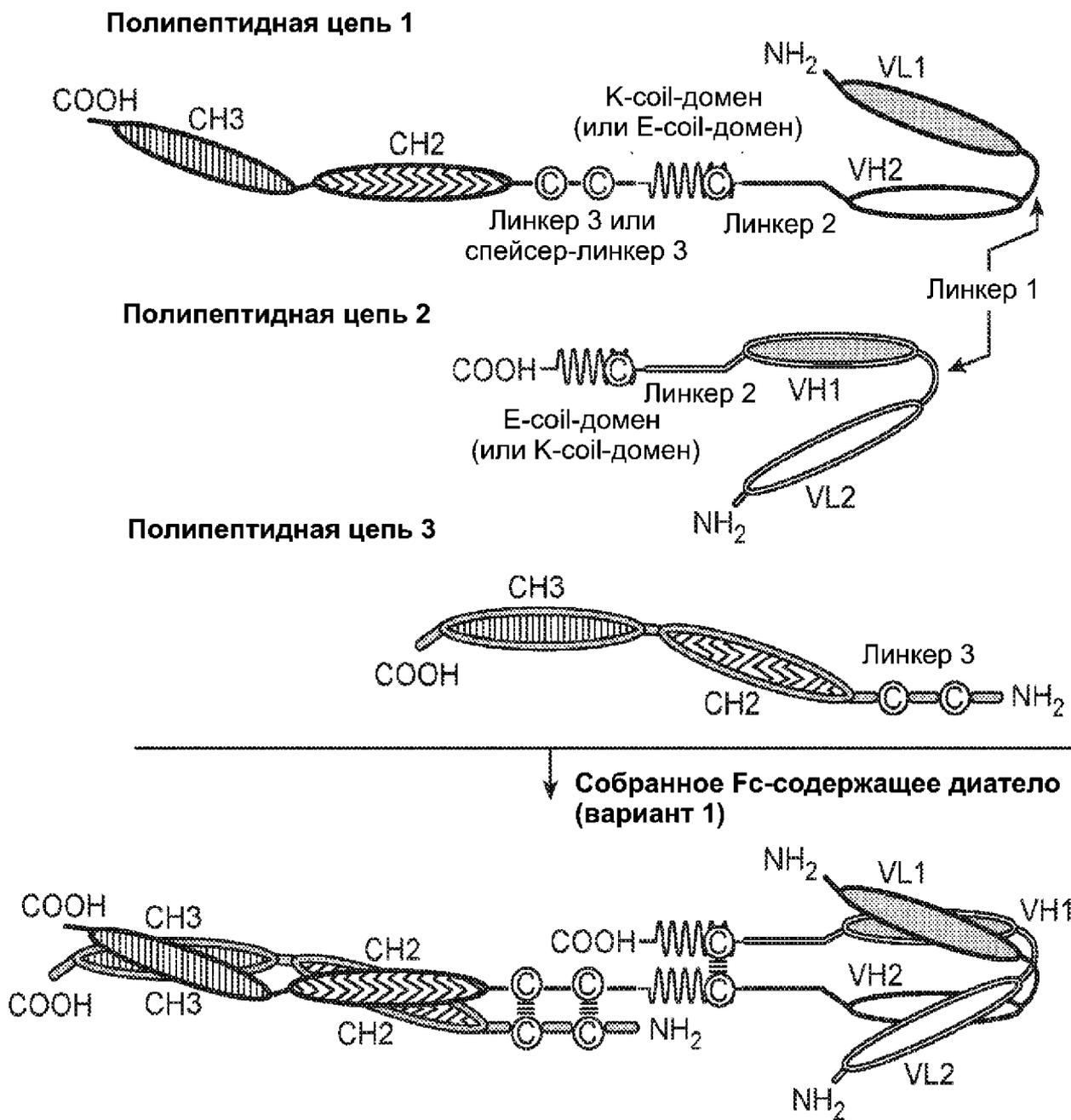
ФИГ. 1А

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

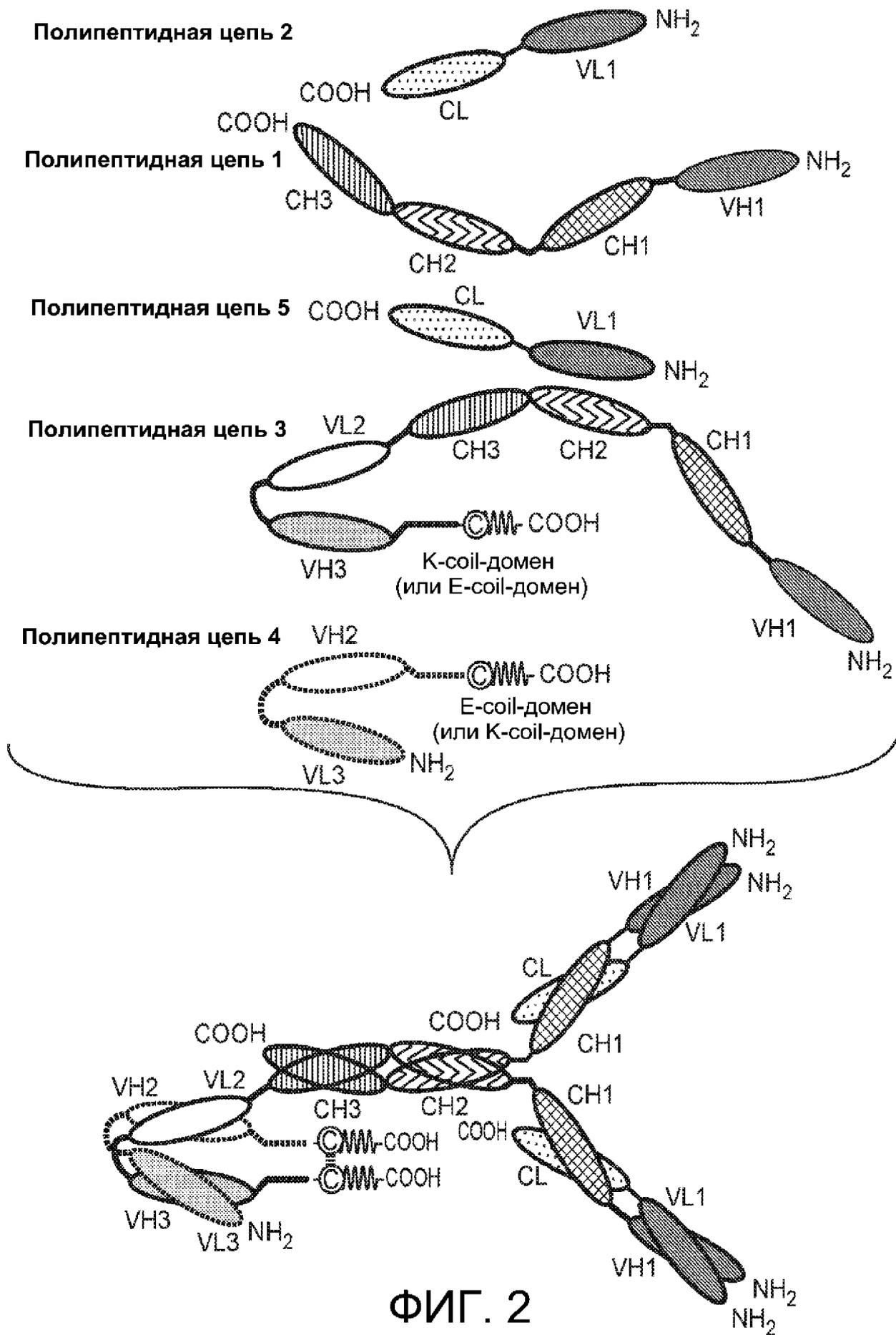


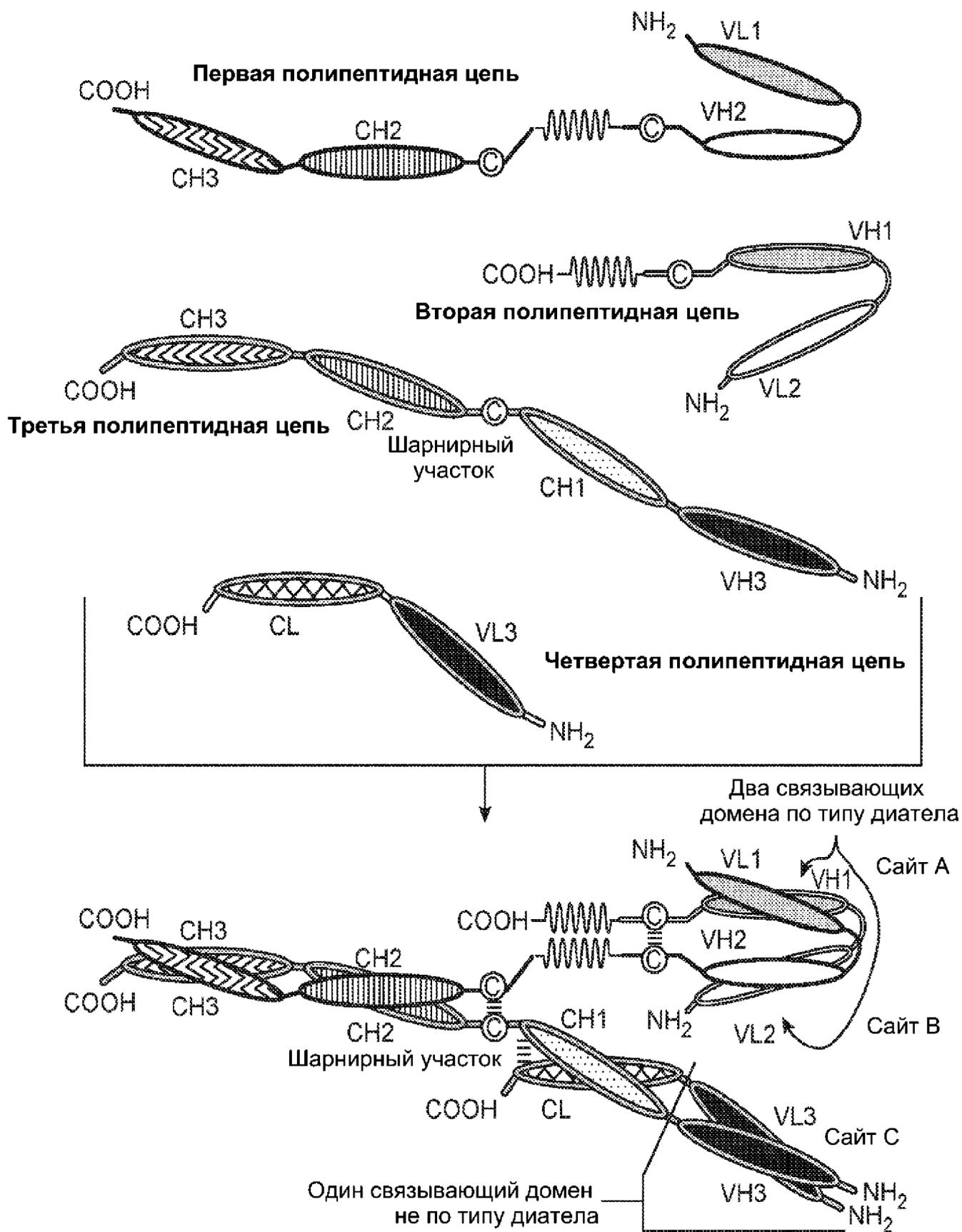
ФИГ. 1С

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)



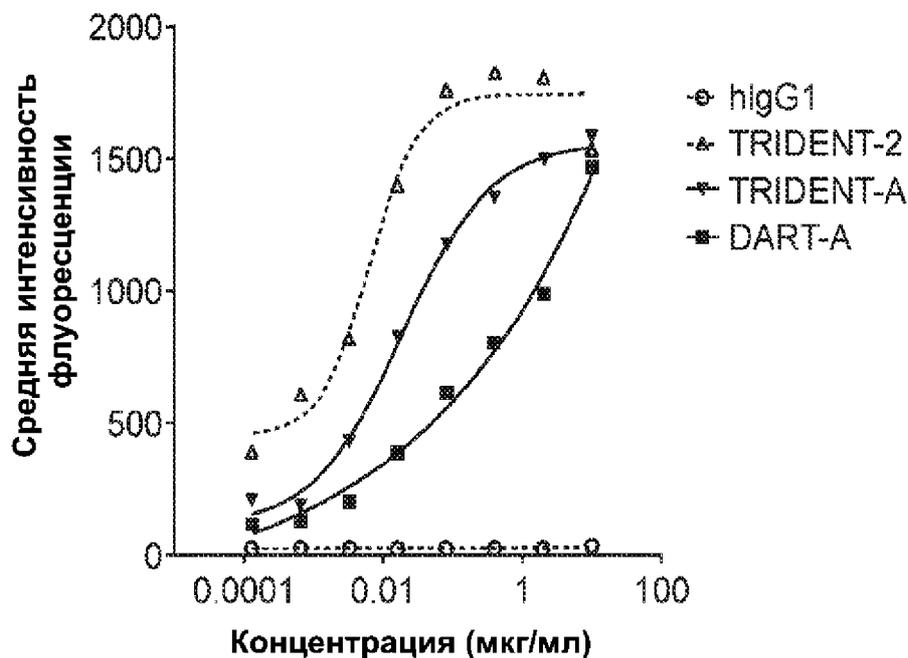
ФИГ. 1D





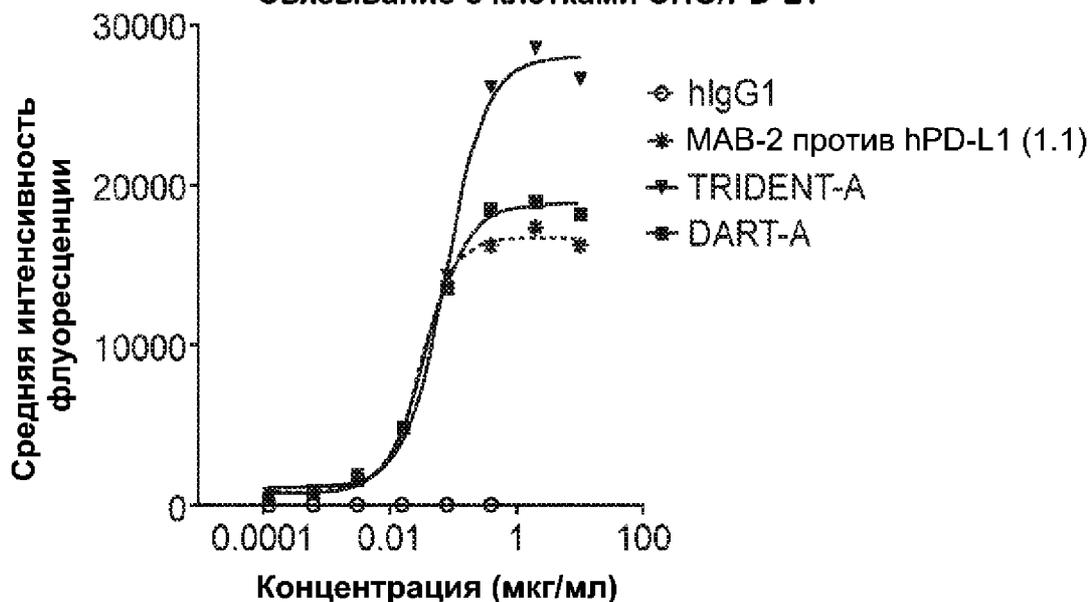
ФИГ. 3А

Связывание с клетками CHO/CD137



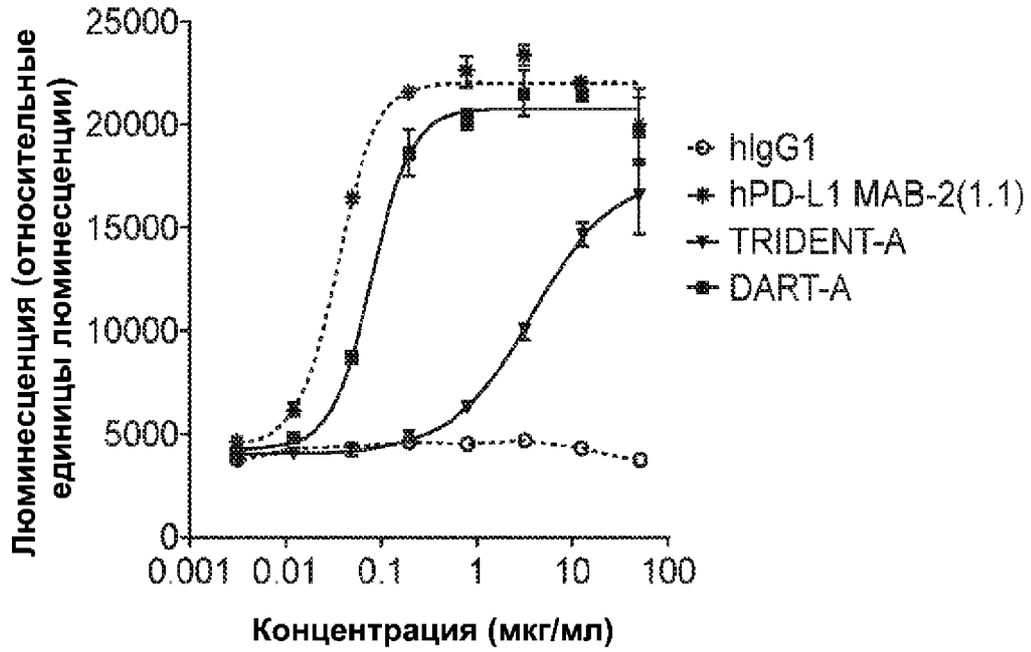
ФИГ. 4

Связывание с клетками CHO/PD-L1



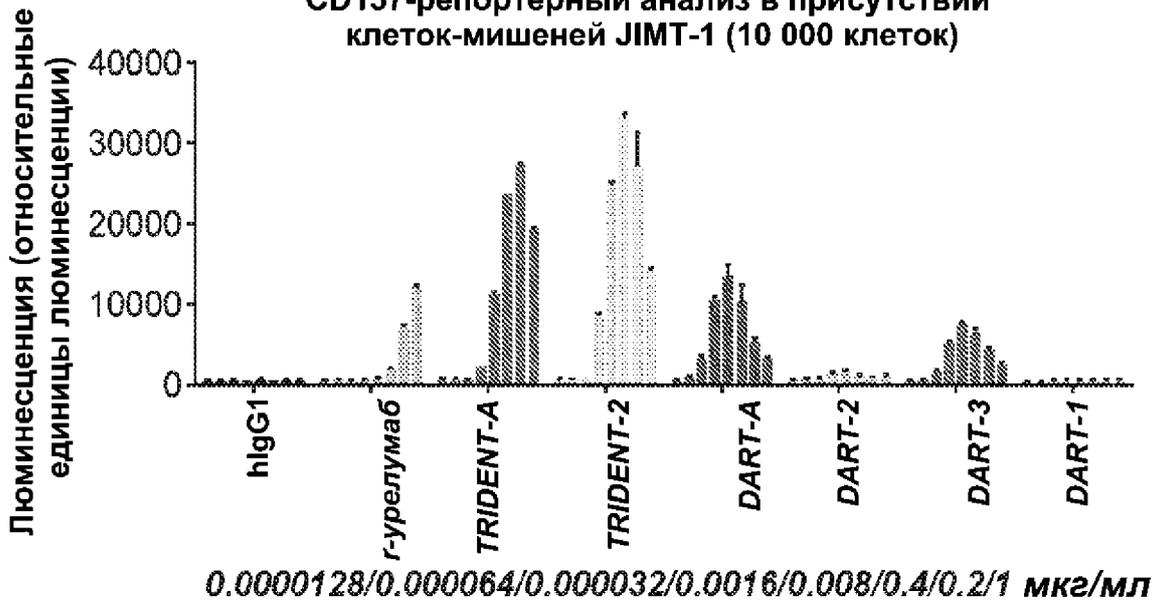
ФИГ. 5A

Блокирование PD-L1 (репортерный анализ)

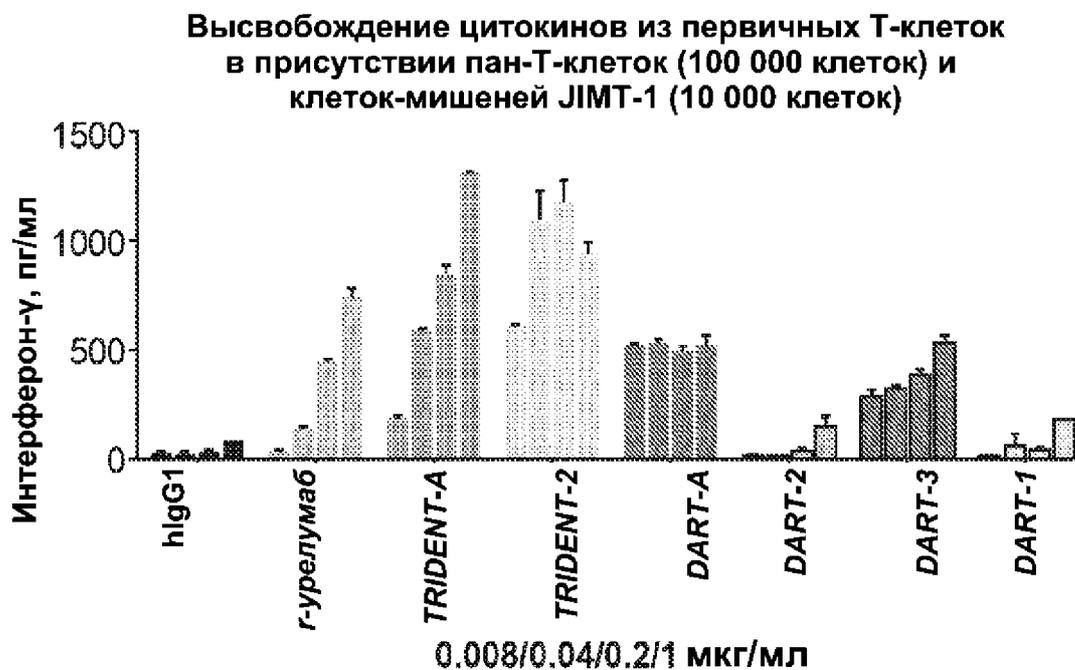


ФИГ. 5В

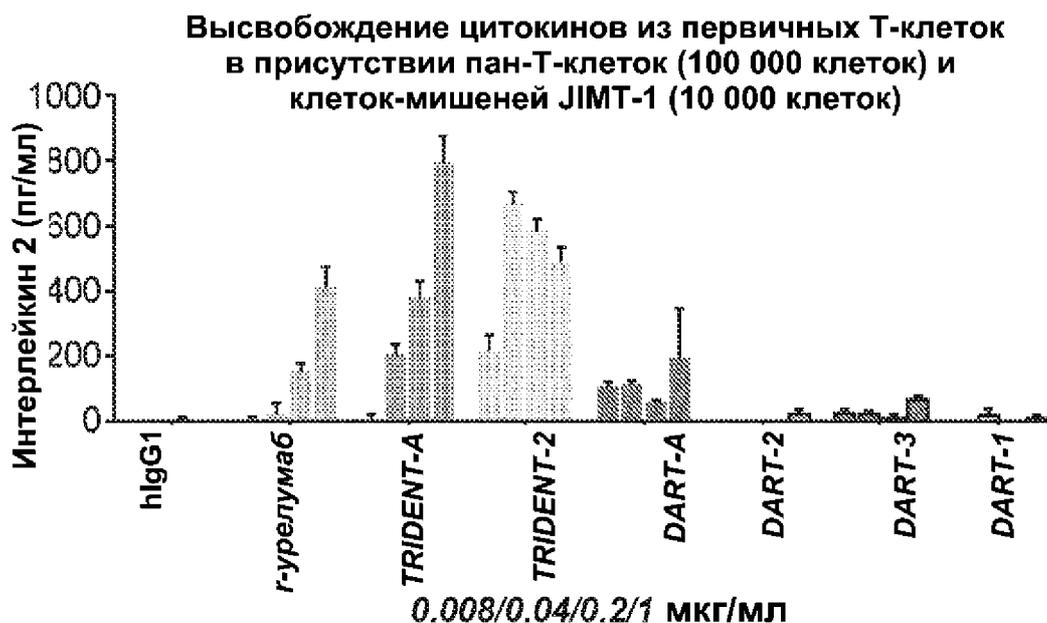
CD137-репортерный анализ в присутствии клеток-мишеней JIMT-1 (10 000 клеток)



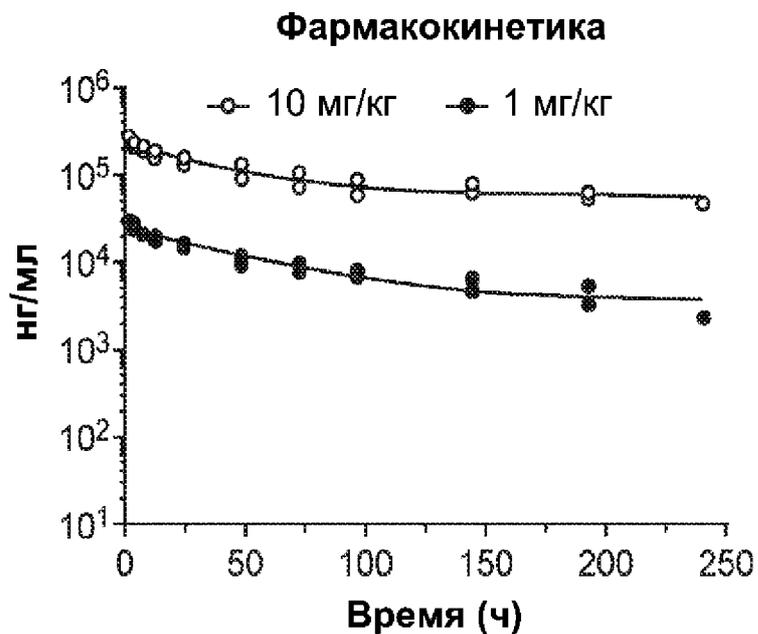
ФИГ. 6



ФИГ. 7А

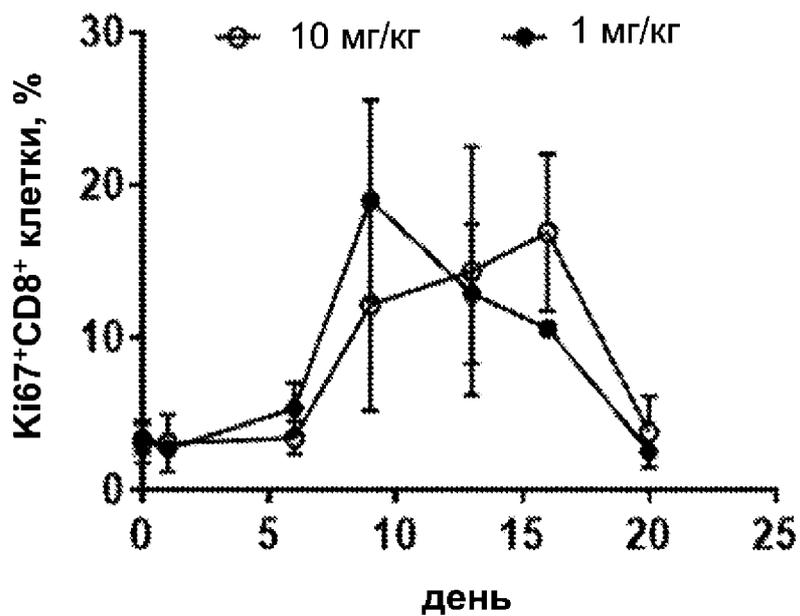


ФИГ. 7В



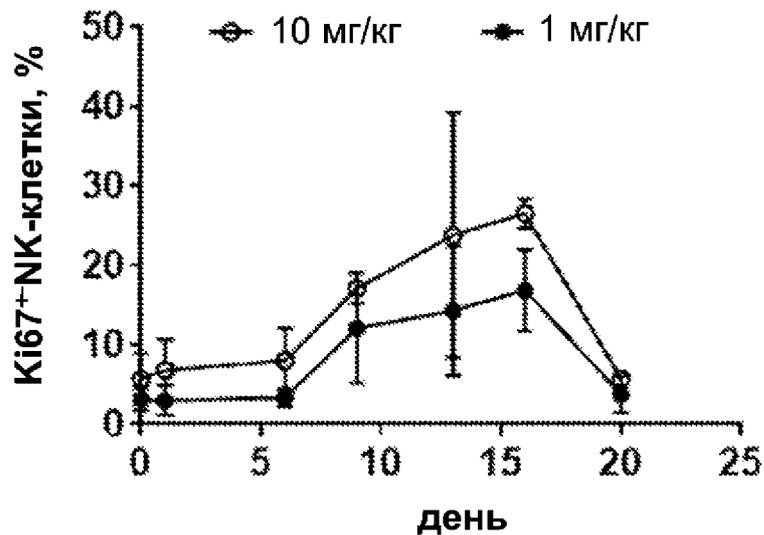
ФИГ. 8А

Пролиферация CD8⁺ Т-клеток



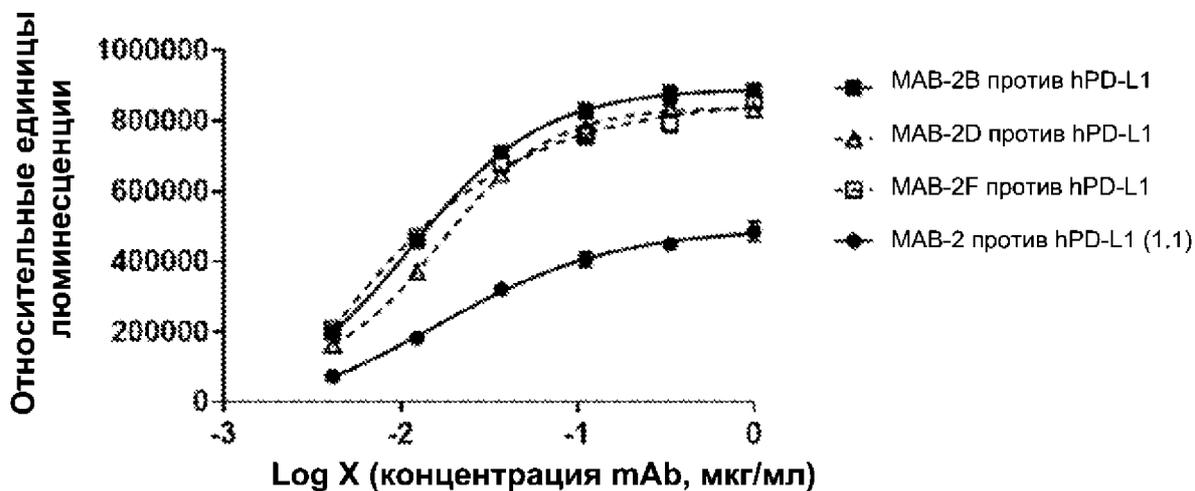
ФИГ. 8В

Пролиферация НК-клеток

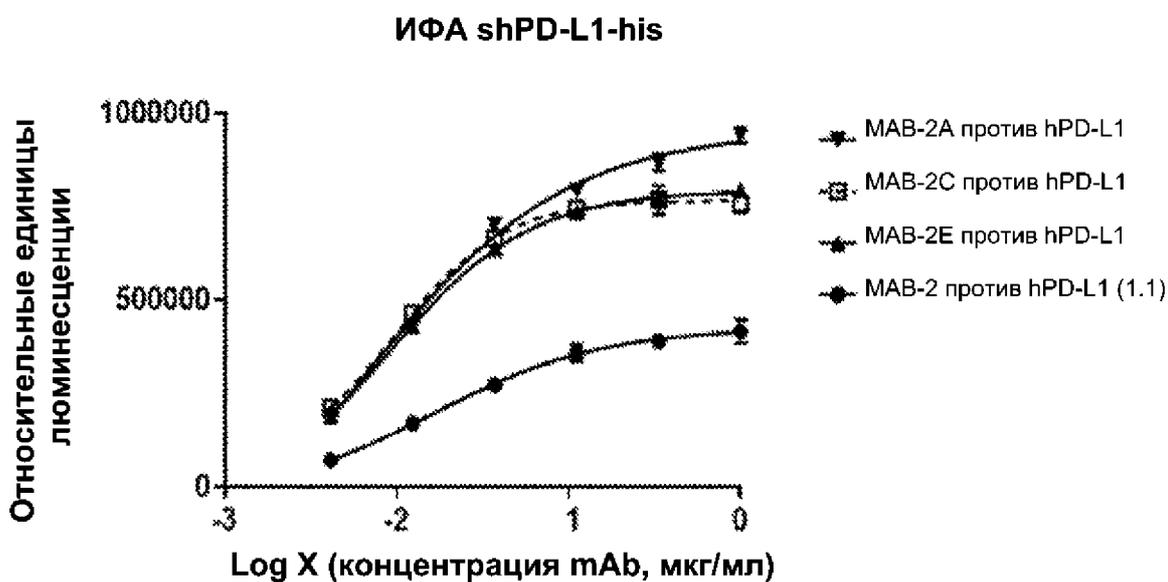


ФИГ. 8С

ИФА shPD-L1-his

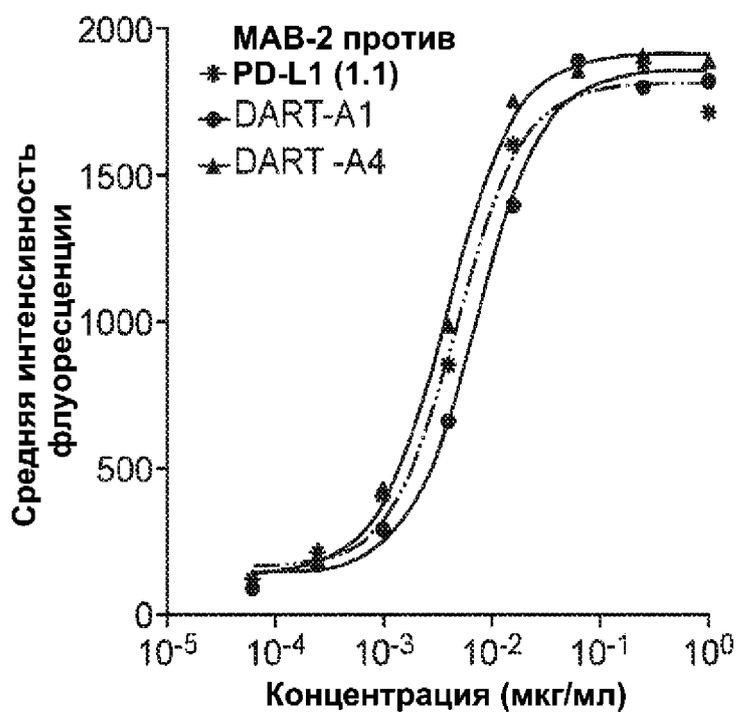


ФИГ. 9А



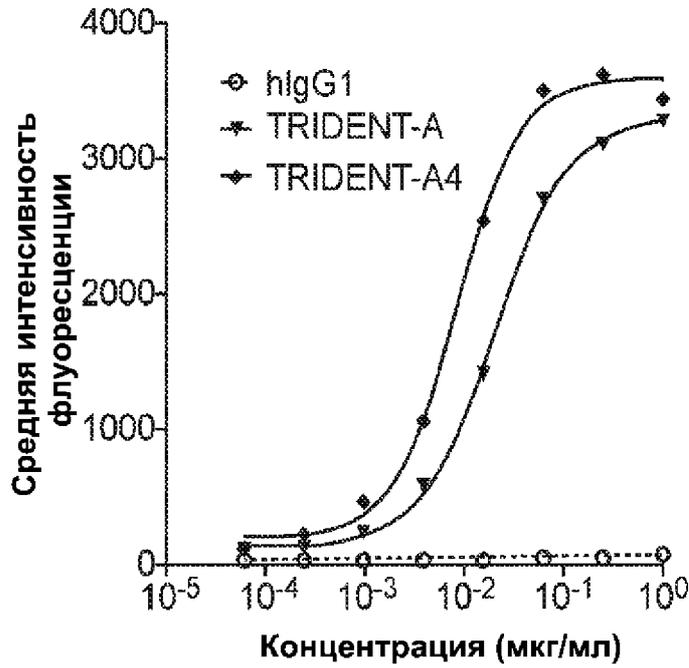
ФИГ. 9В

Связывание с клетками JIMT-1 (тетравалентное антитело)



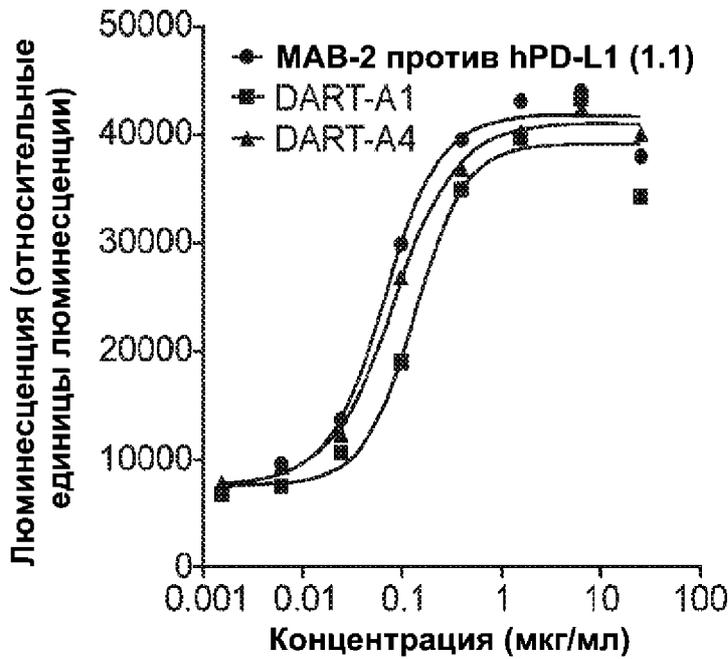
ФИГ. 10А

Связывание с клетками JIMT-1 (трехвалентное антитело)



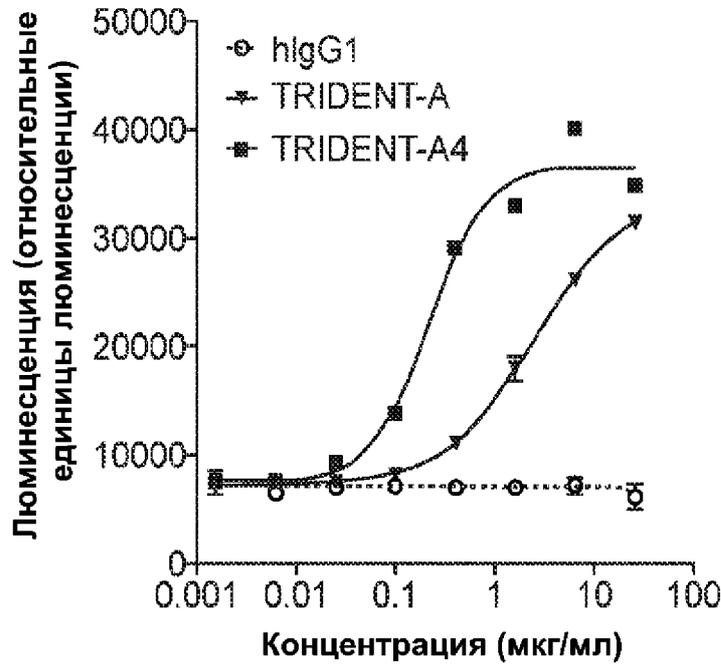
ФИГ. 10В

Блокирование PD-L1 (тетравалентное антитело)



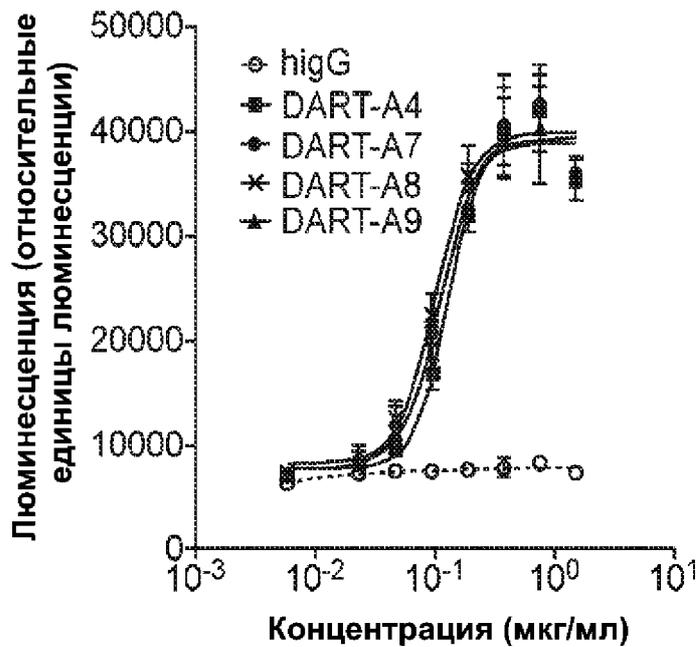
ФИГ. 11А

Блокирование PD-L1 (трехвалентное антитело)



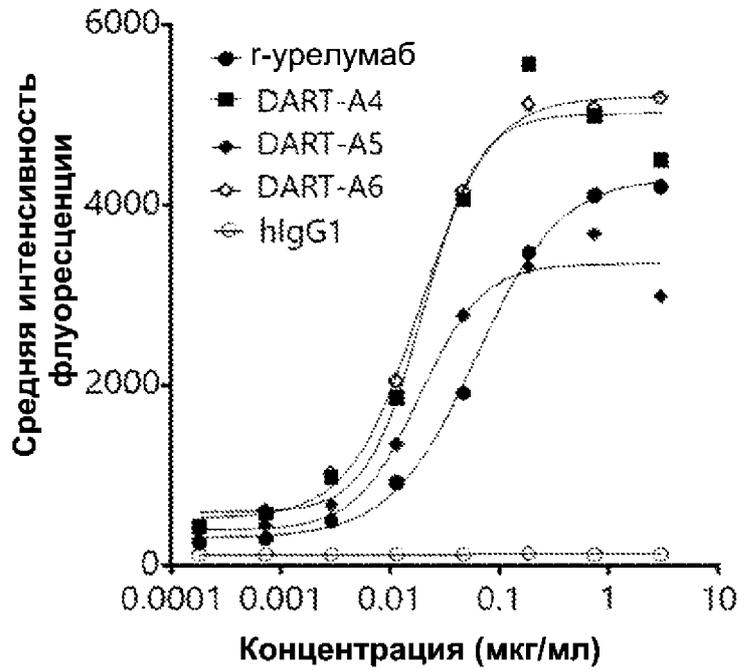
ФИГ. 11В

Блокирование PD-L1 (тетравалентное антитело)



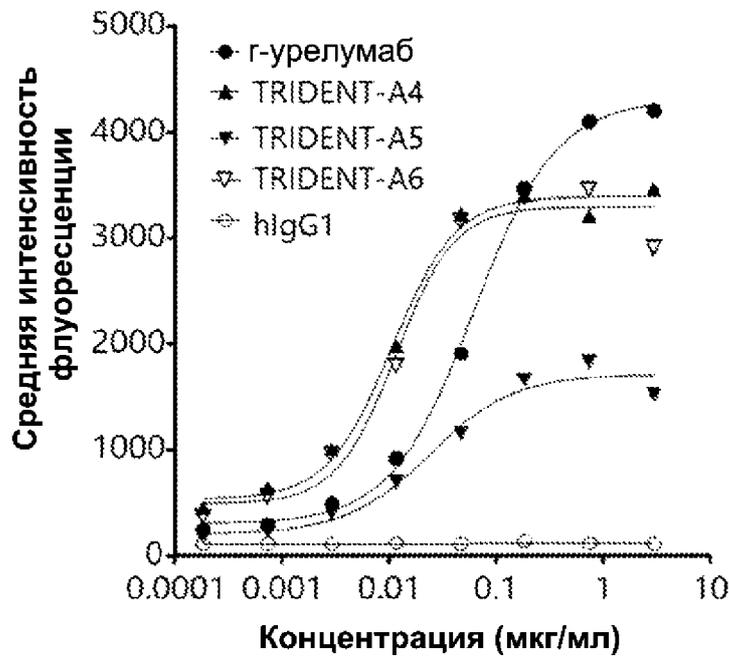
ФИГ. 11С

Связывание с клетками CHO/CD137 (тетравалентное антитело)

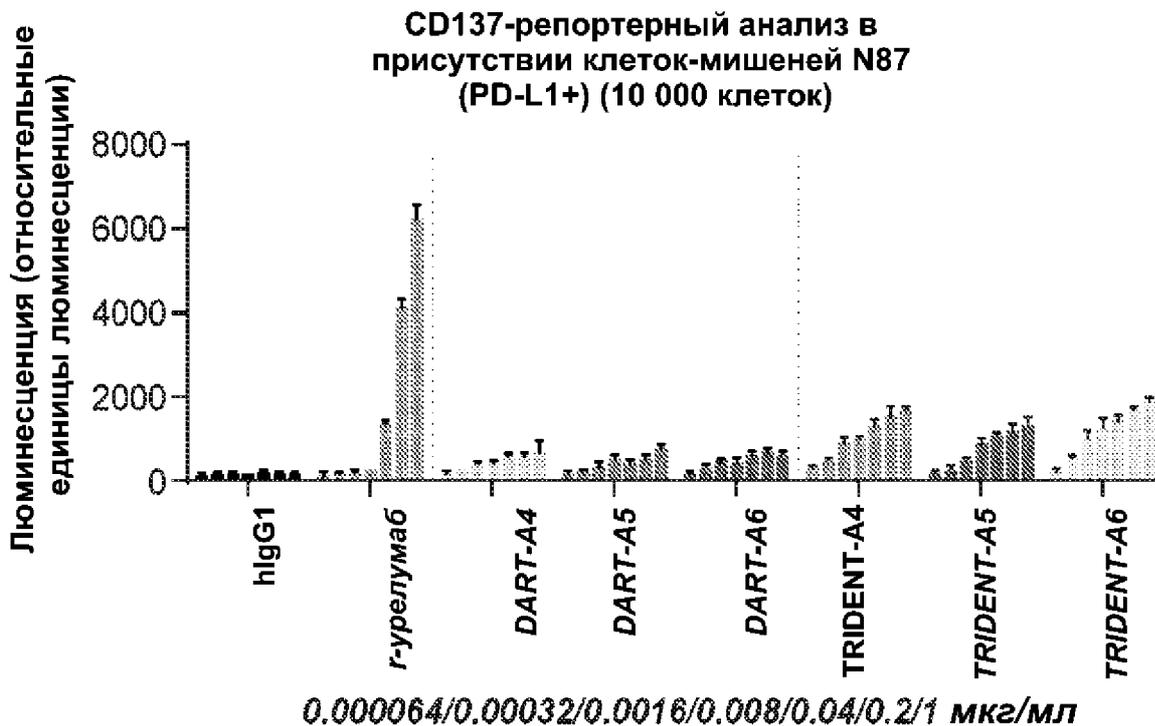


ФИГ. 12А

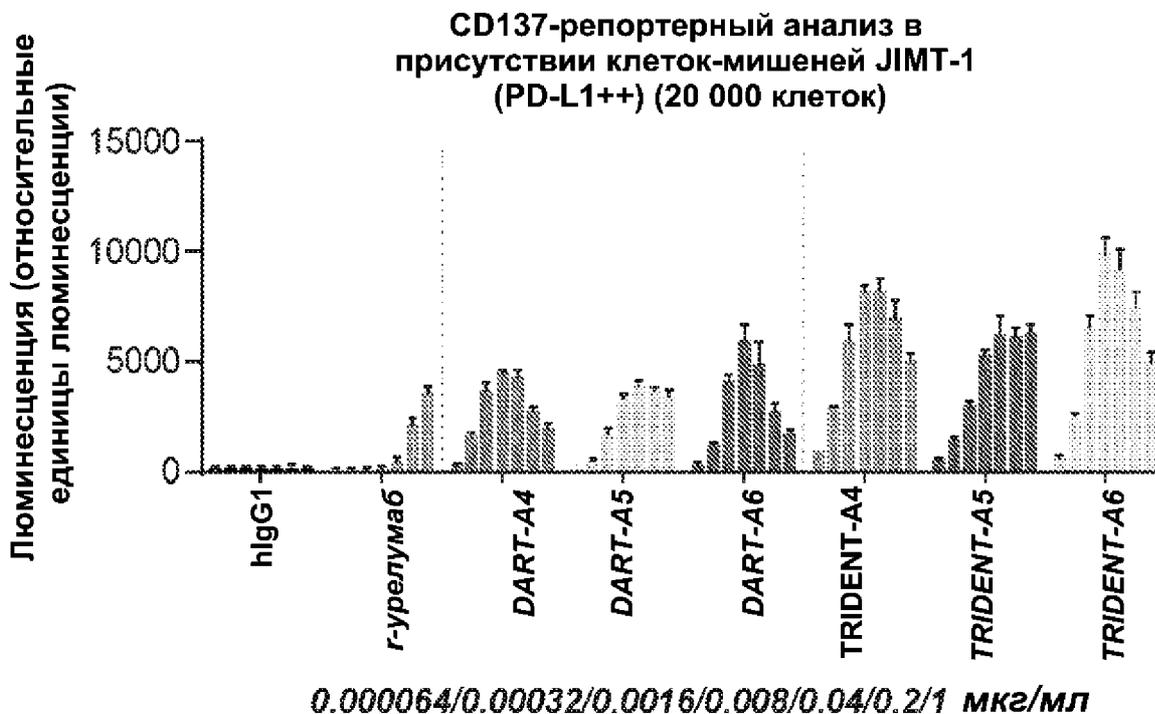
Связывание с клетками CHO/CD137 (трехвалентное антитело)



ФИГ. 12В

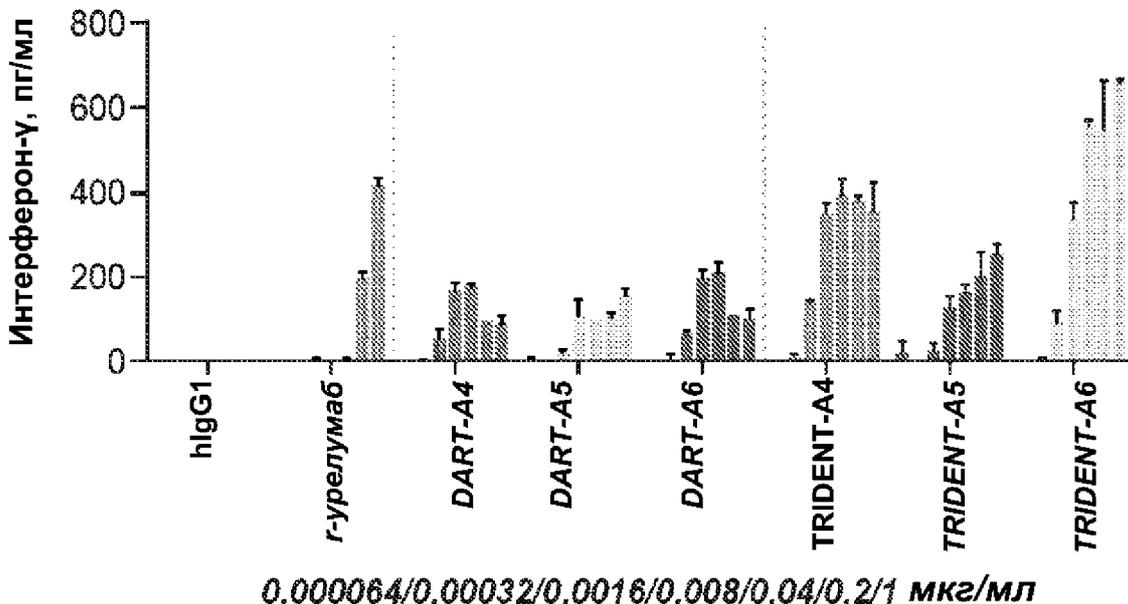


ФИГ. 13А



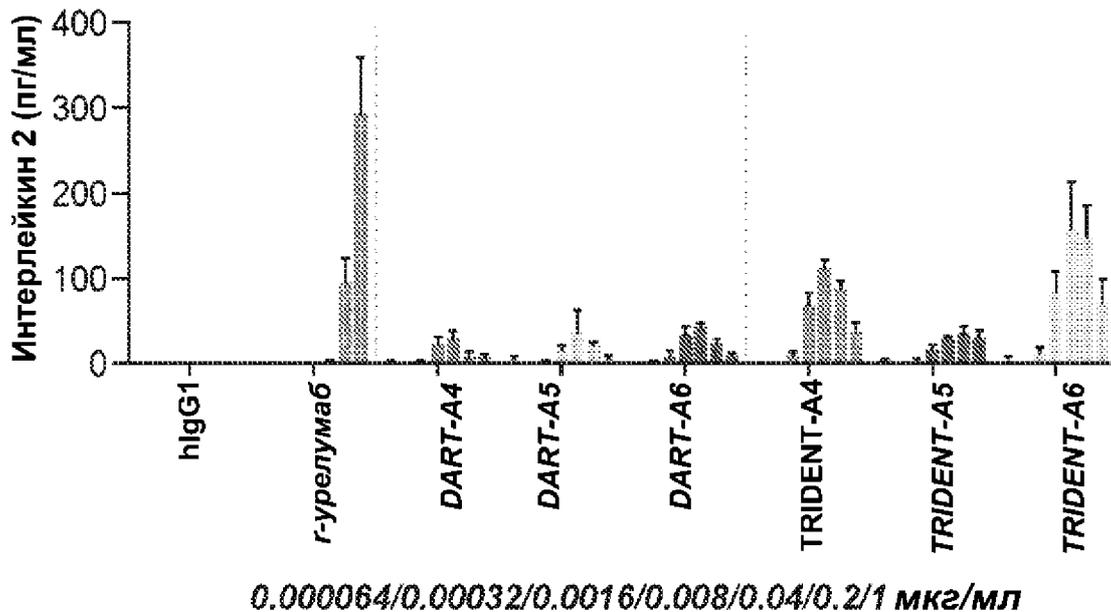
ФИГ. 13В

Высвобождение цитокинов из первичных Т-клеток в присутствии пан-Т-клеток (100 000 клеток) и клеток J1MT-1 (10 000 клеток)



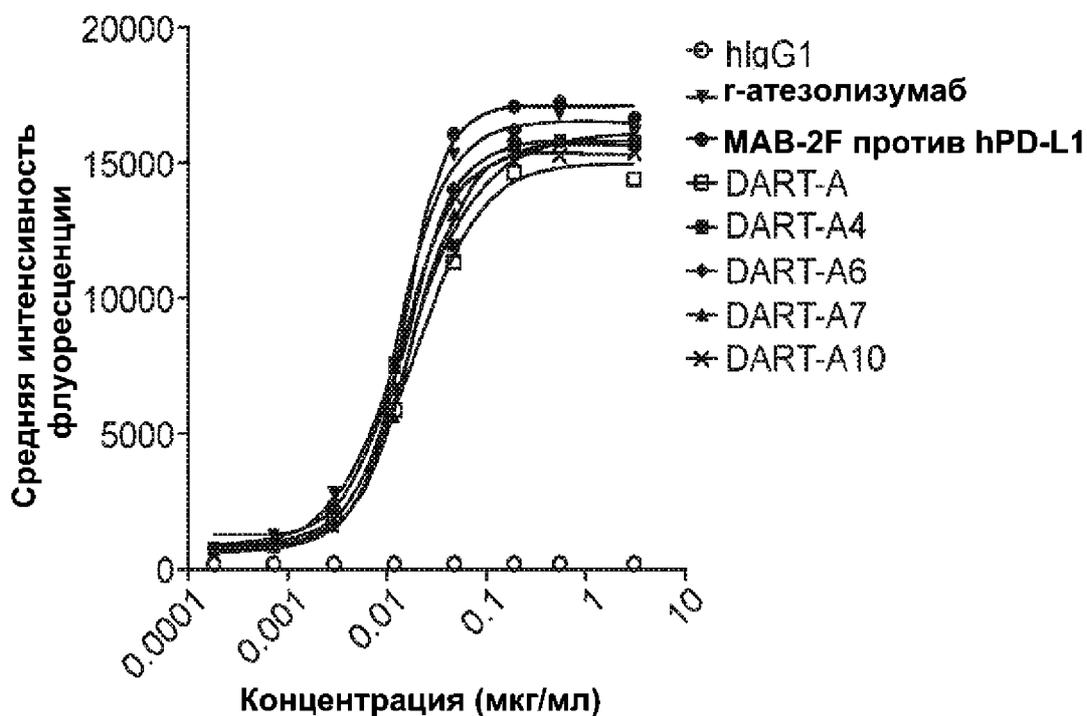
ФИГ. 14А

Высвобождение цитокинов из первичных Т-клеток в присутствии пан-Т-клеток (100 000 клеток) и клеток J1MT-1 (10 000 клеток)



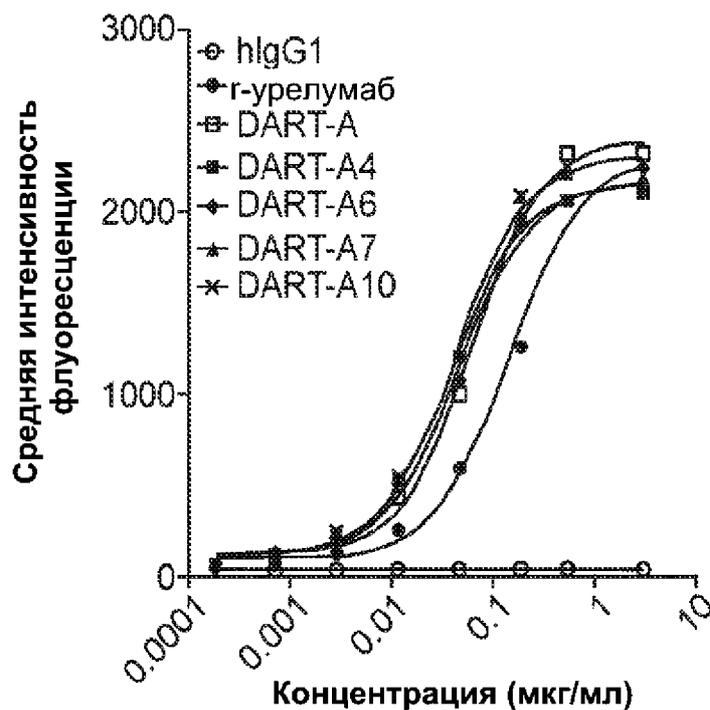
ФИГ. 14В

**Связывание с клетками CHO/PD-L1
(тетравалентное антитело)**

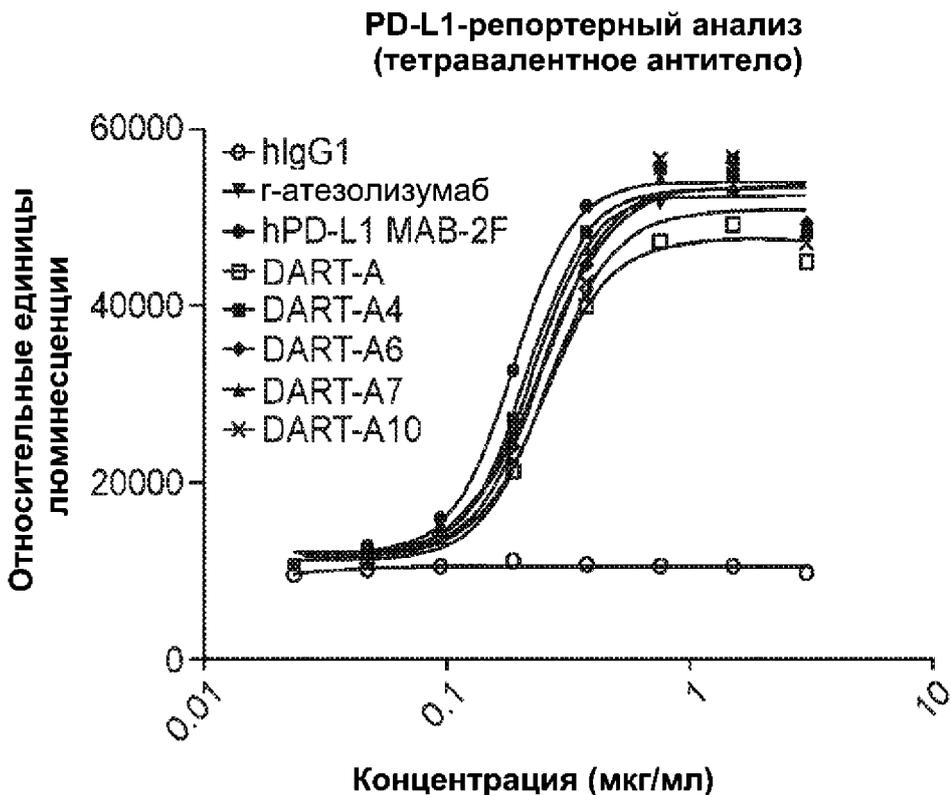


ФИГ. 15А

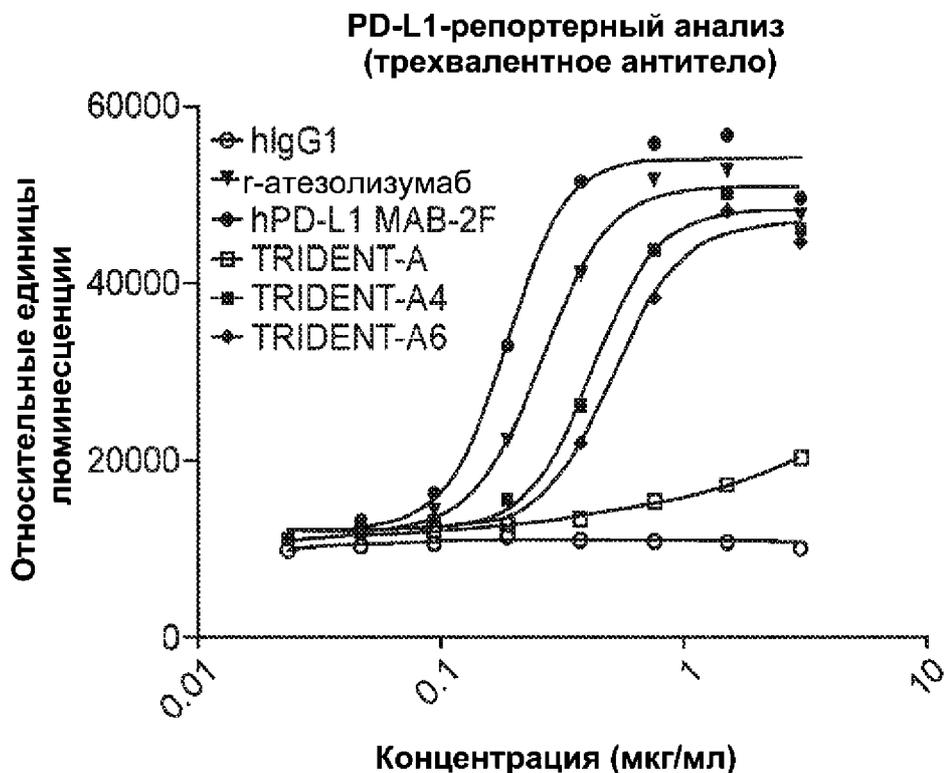
**Связывание с клетками CHO/PD-L1
(тетравалентное антитело)**



ФИГ. 15В

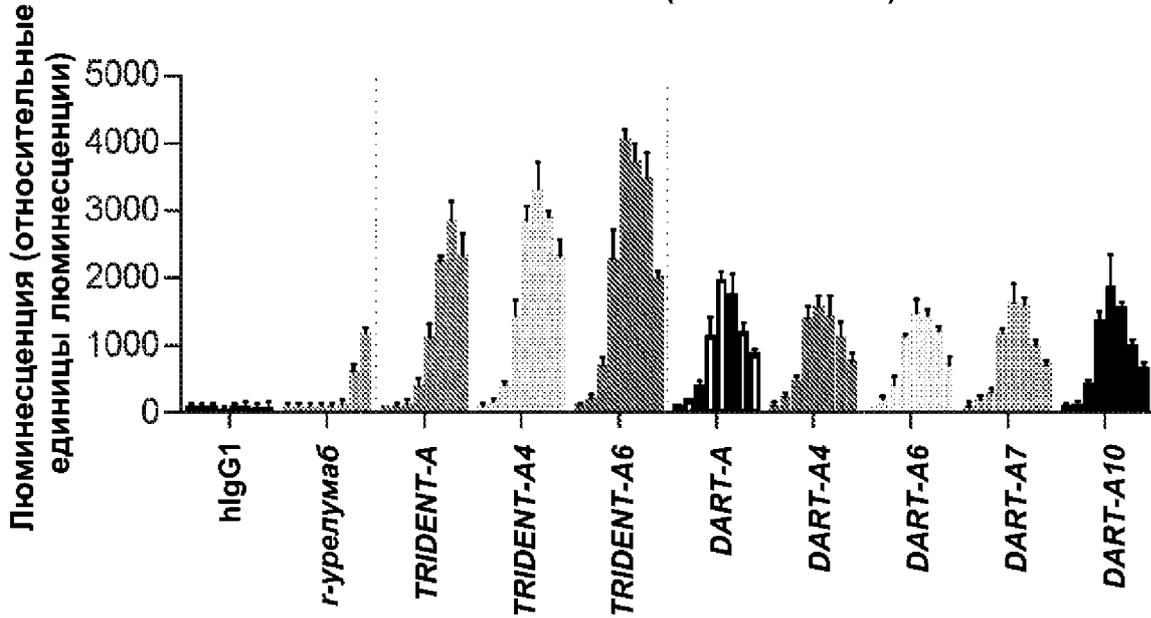


ФИГ. 16А



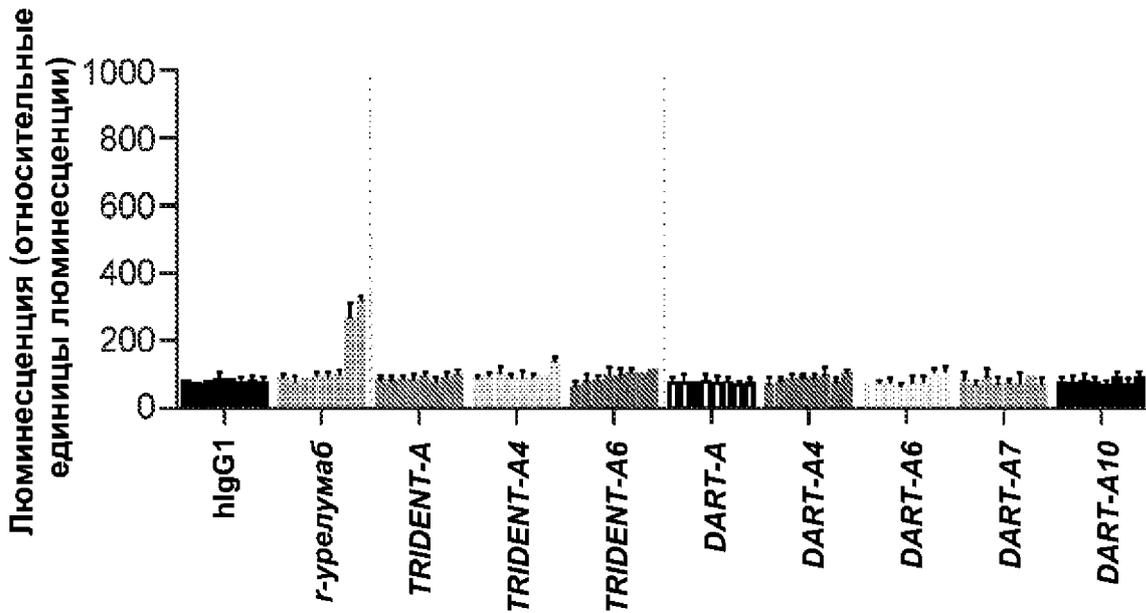
ФИГ. 16В

CD137-репортерный анализ 4-1BB в присутствии клеток JIMT-1 (10 000 клеток)



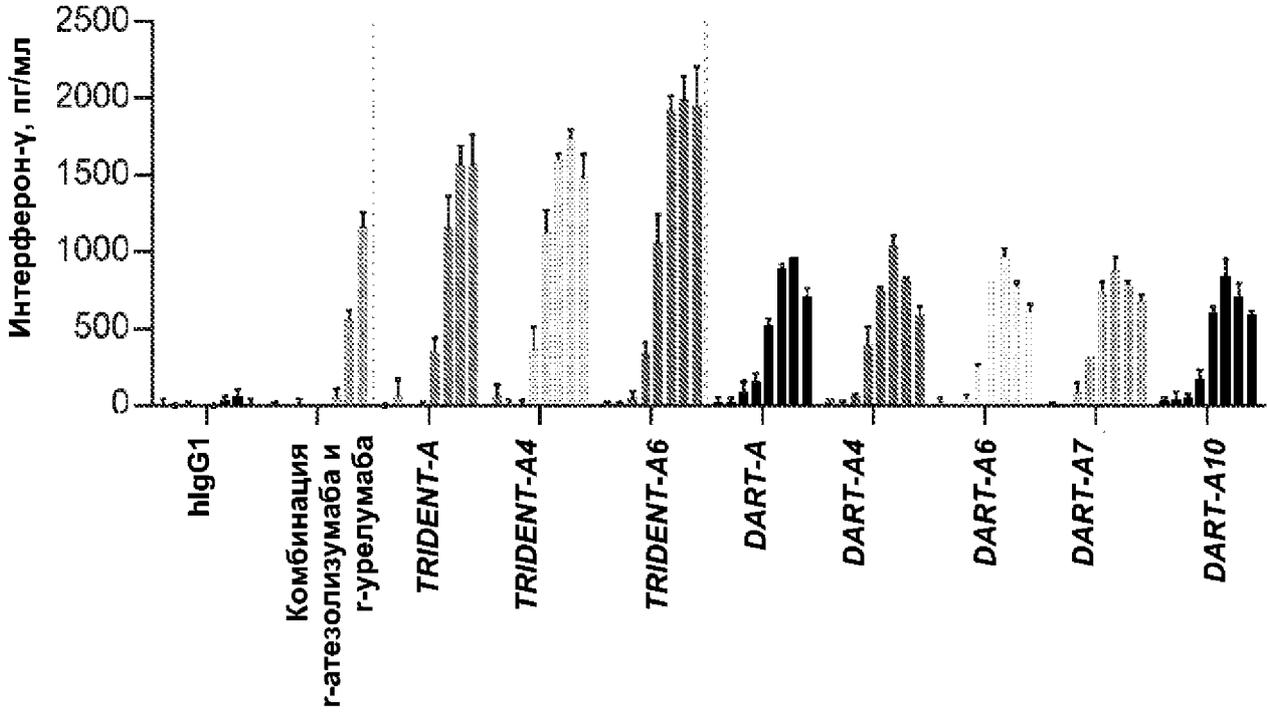
ФИГ. 17А

CD137-репортерный анализ в отсутствие клеток-мишеней



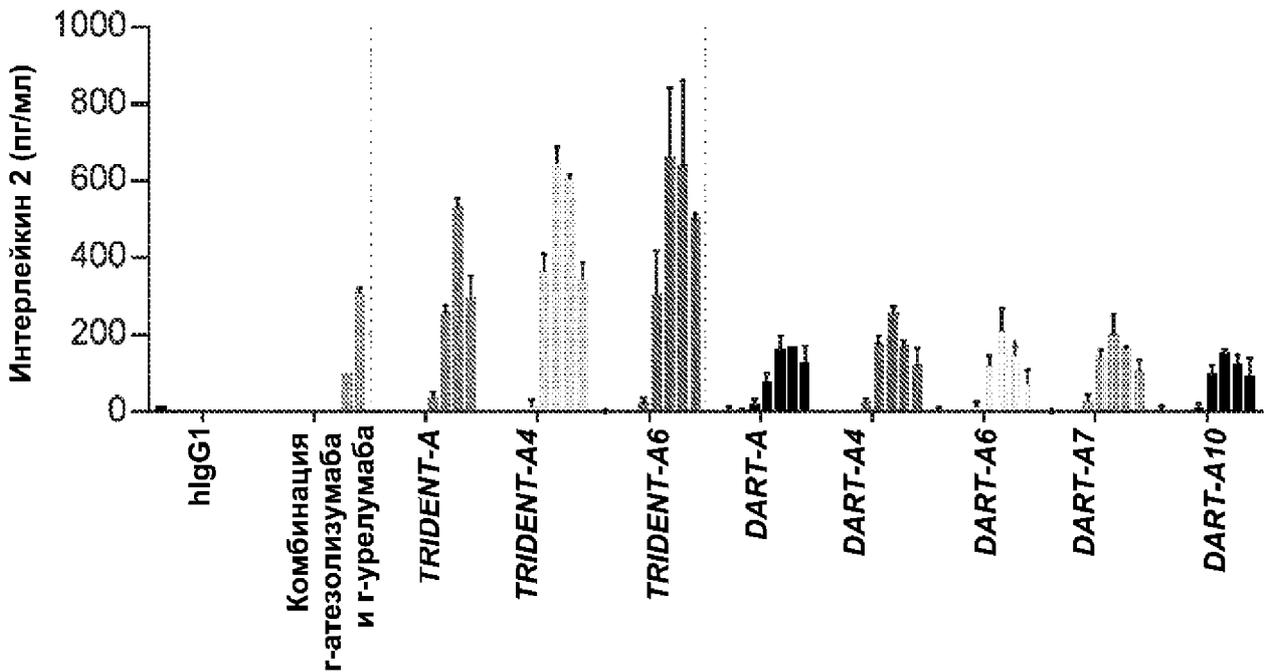
ФИГ. 17В

Высвобождение цитокинов из первичных Т-клеток в присутствии пан-Т-клеток (100К) и клеток JIMT-1 (10 000 клеток)

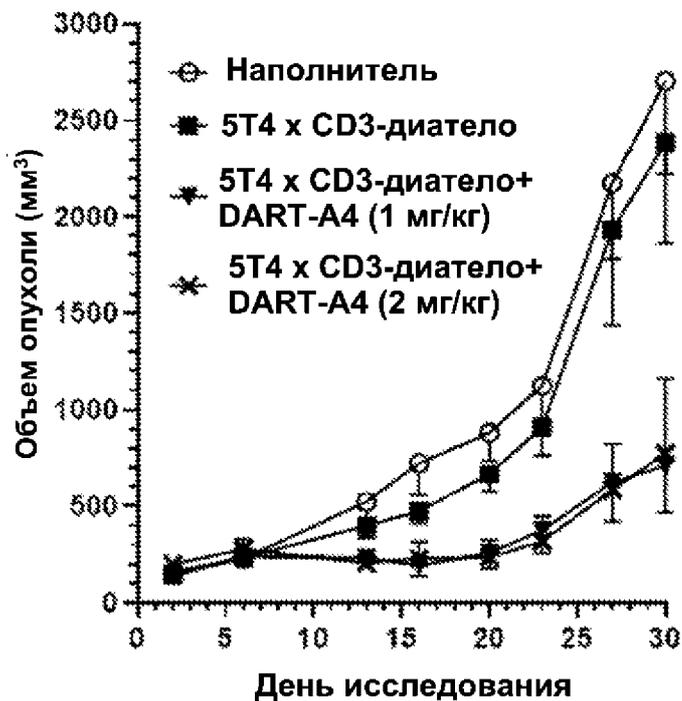


ФИГ. 18А

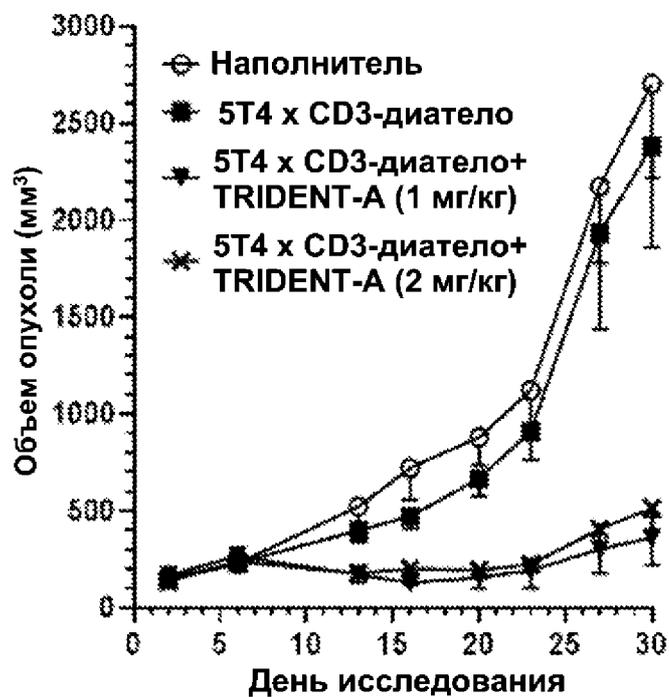
Высвобождение цитокинов из первичных Т-клеток в присутствии пан-Т-клеток (100 000 клеток) и клеток JIMT-1 (10 000 клеток)



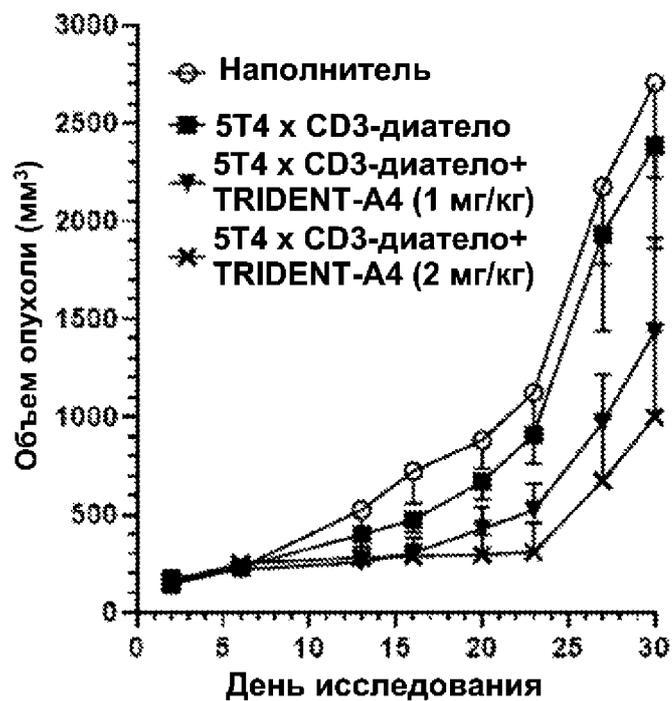
ФИГ. 18В



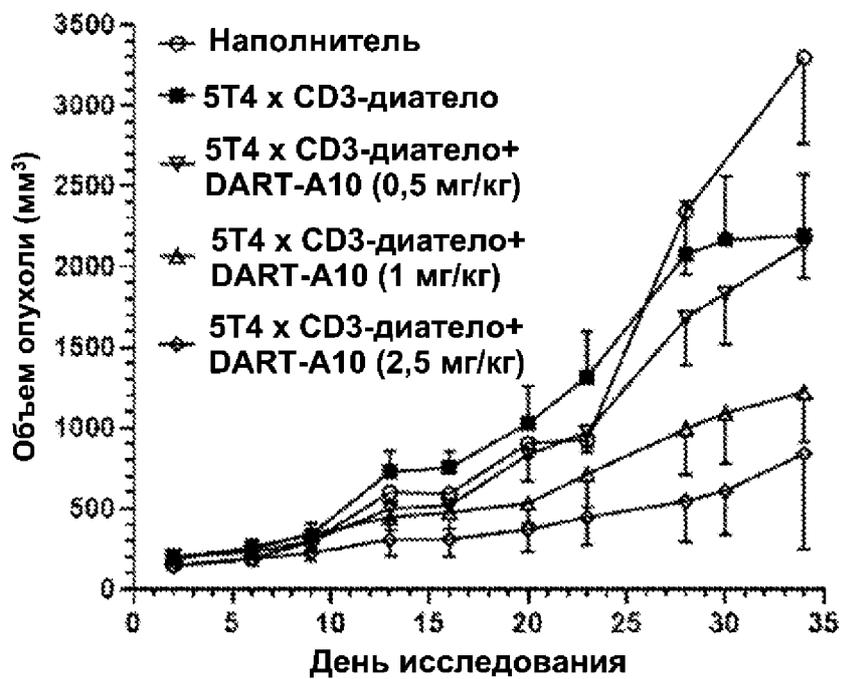
ФИГ. 19А



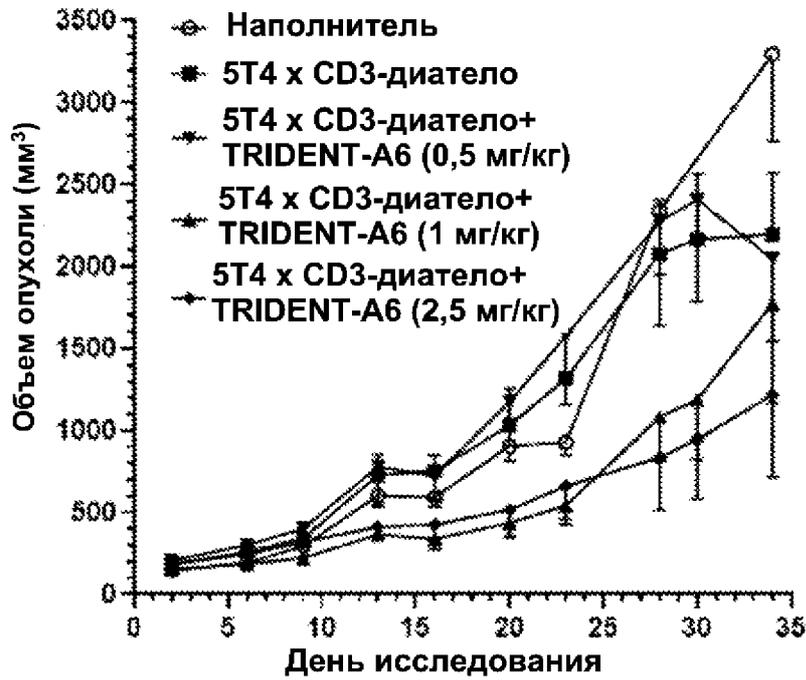
ФИГ. 19В



ФИГ. 19С

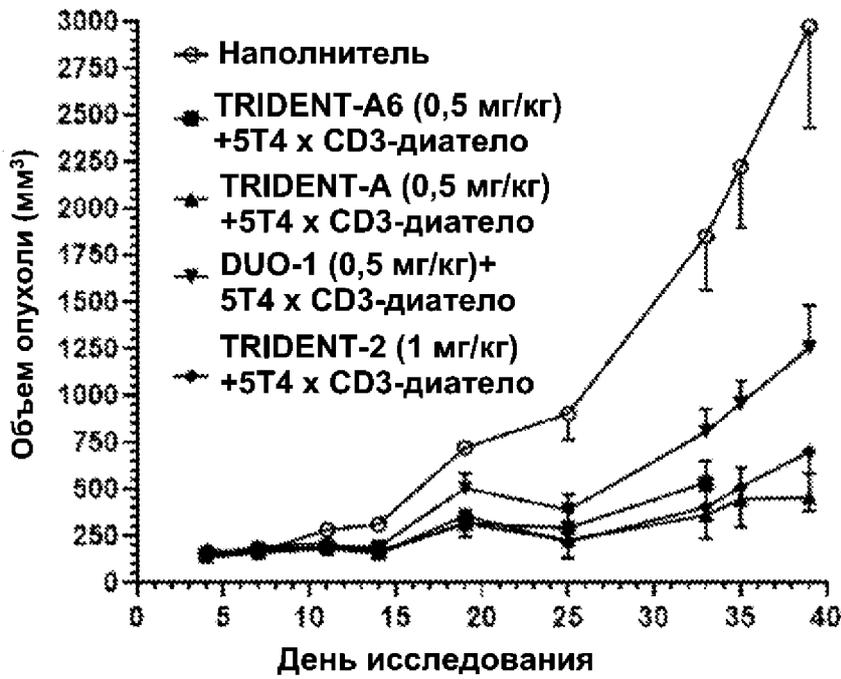


ФИГ. 20А



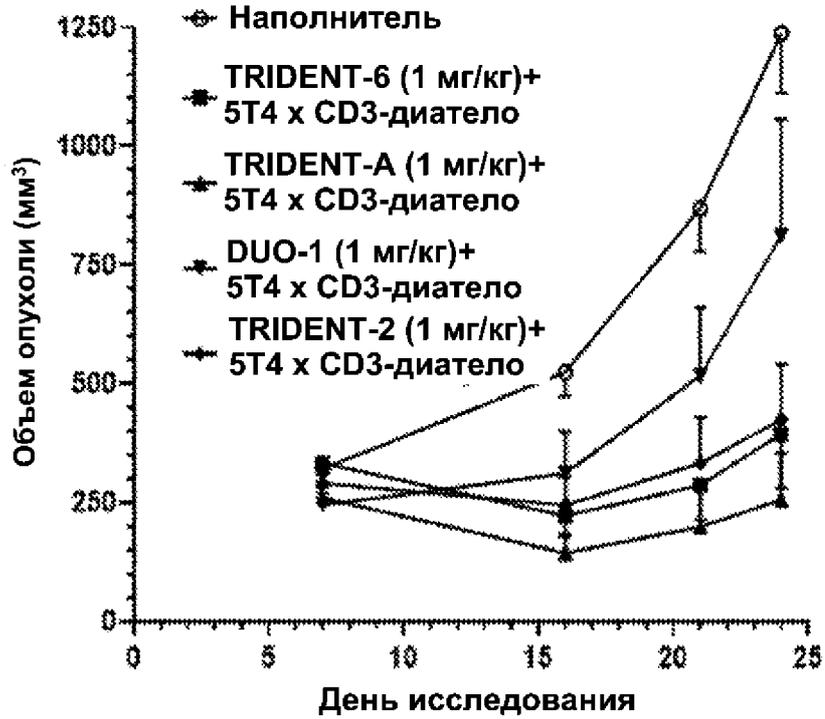
ФИГ. 20B

Исследование 1



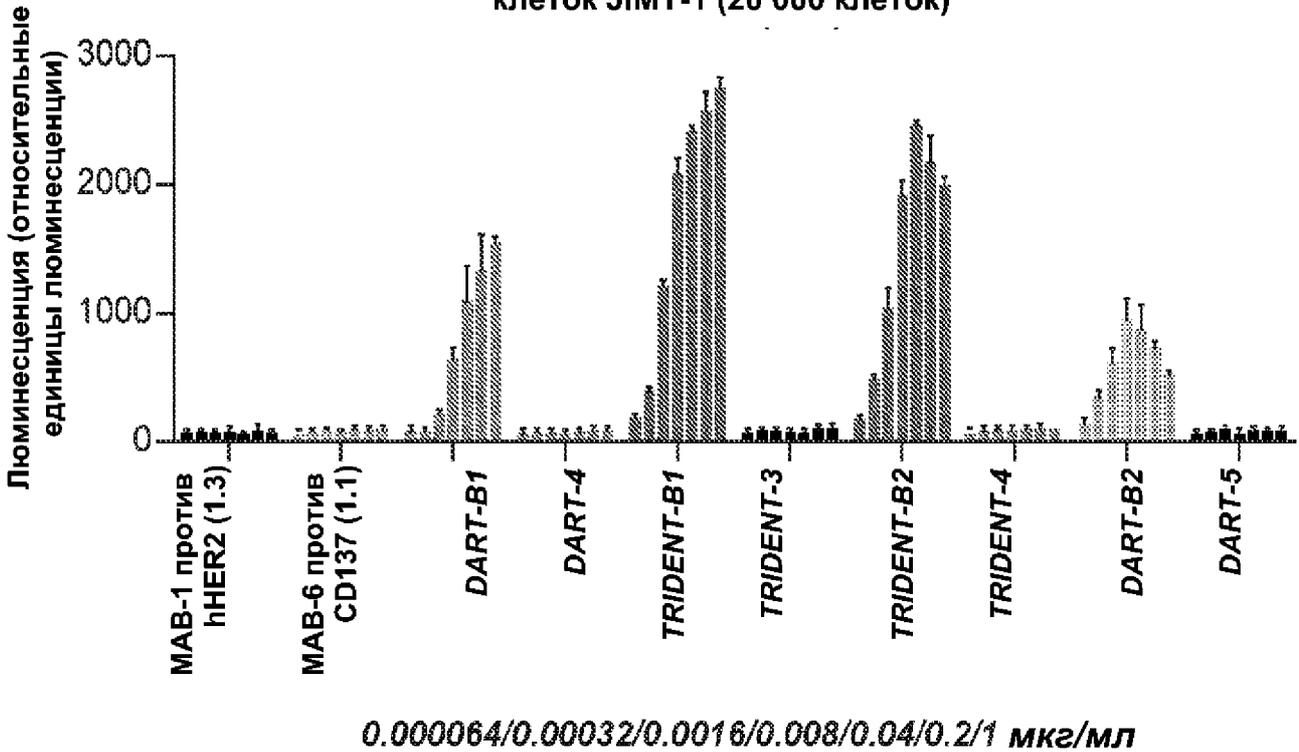
ФИГ. 21A

Исследование 2

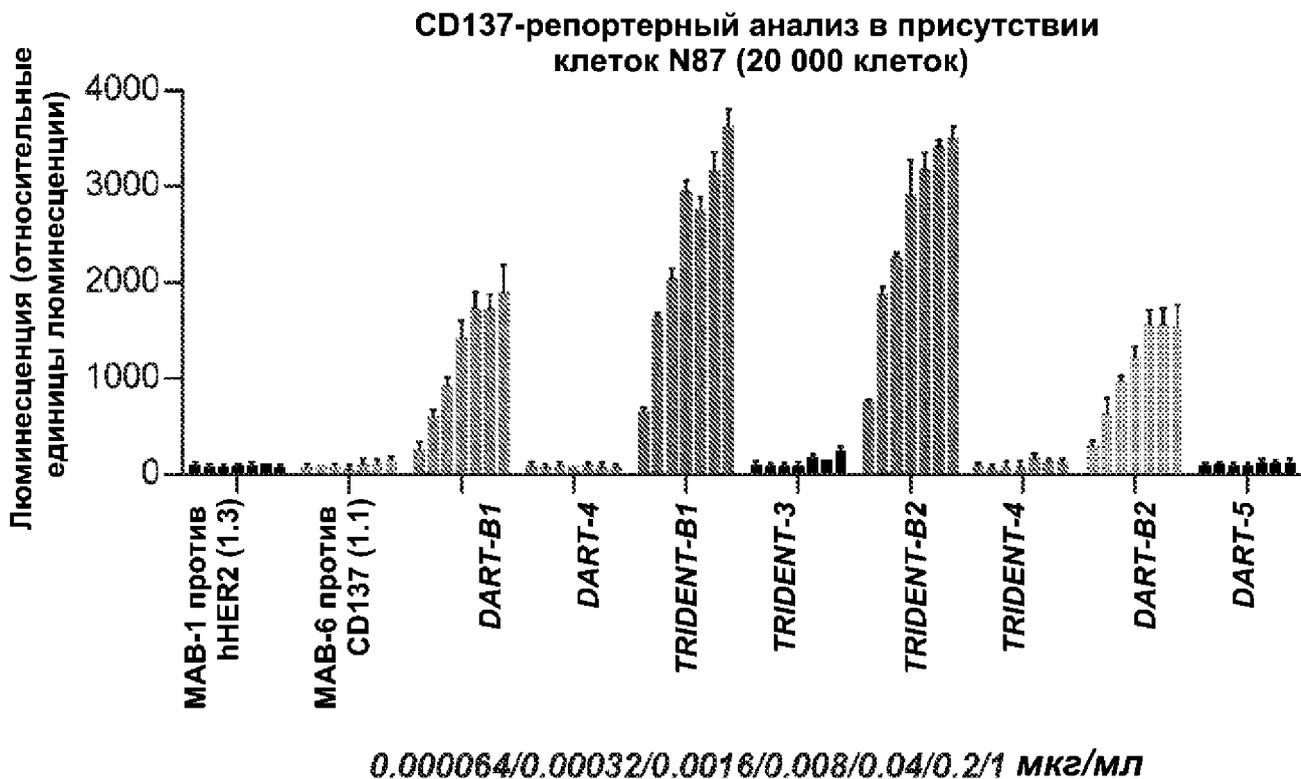


ФИГ. 21В

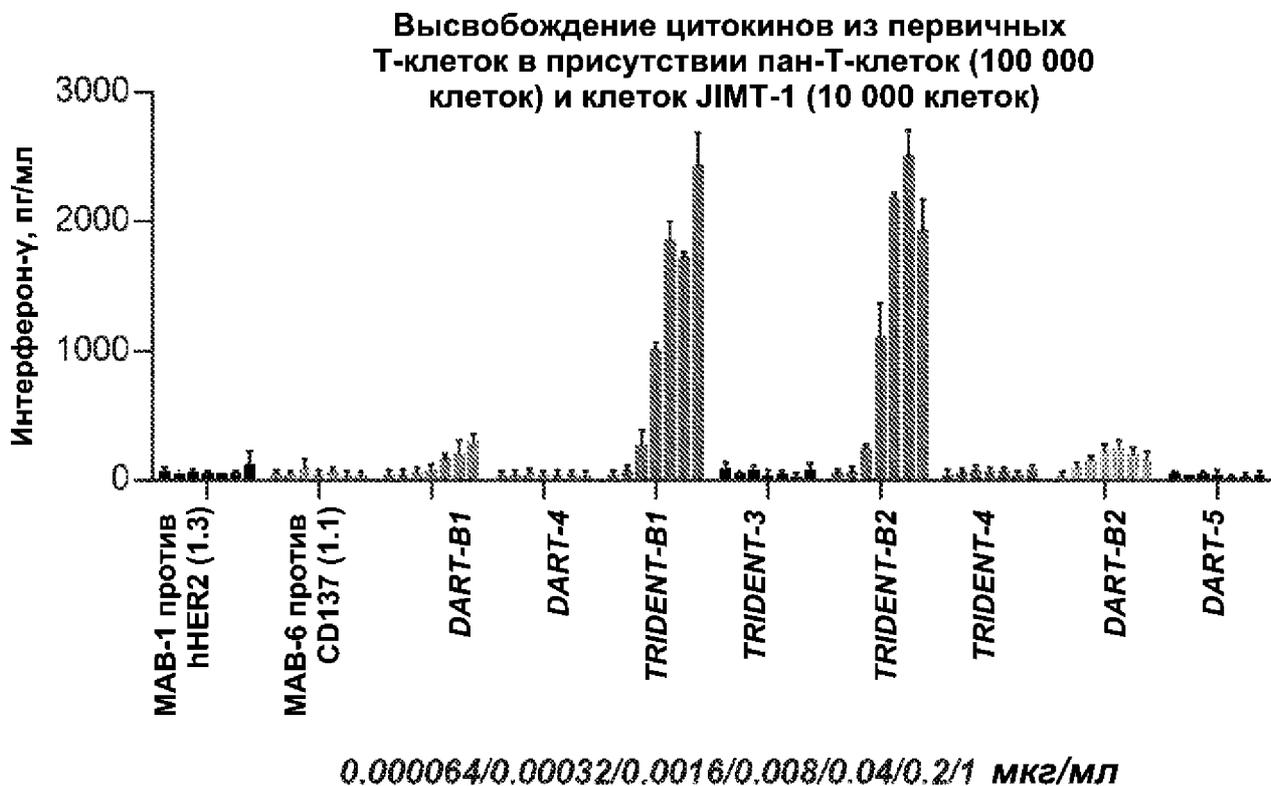
CD137-репортерный анализ в присутствии клеток JIMT-1 (20 000 клеток)



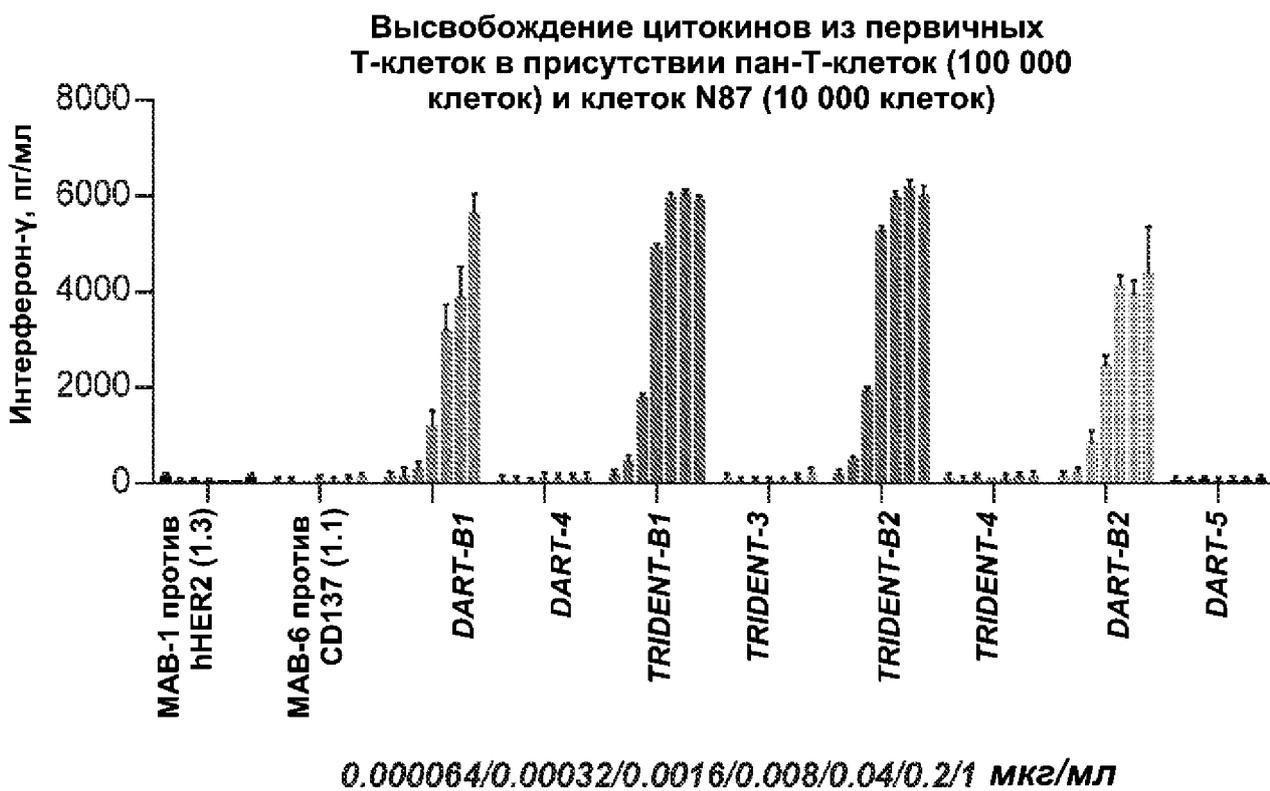
ФИГ. 22А



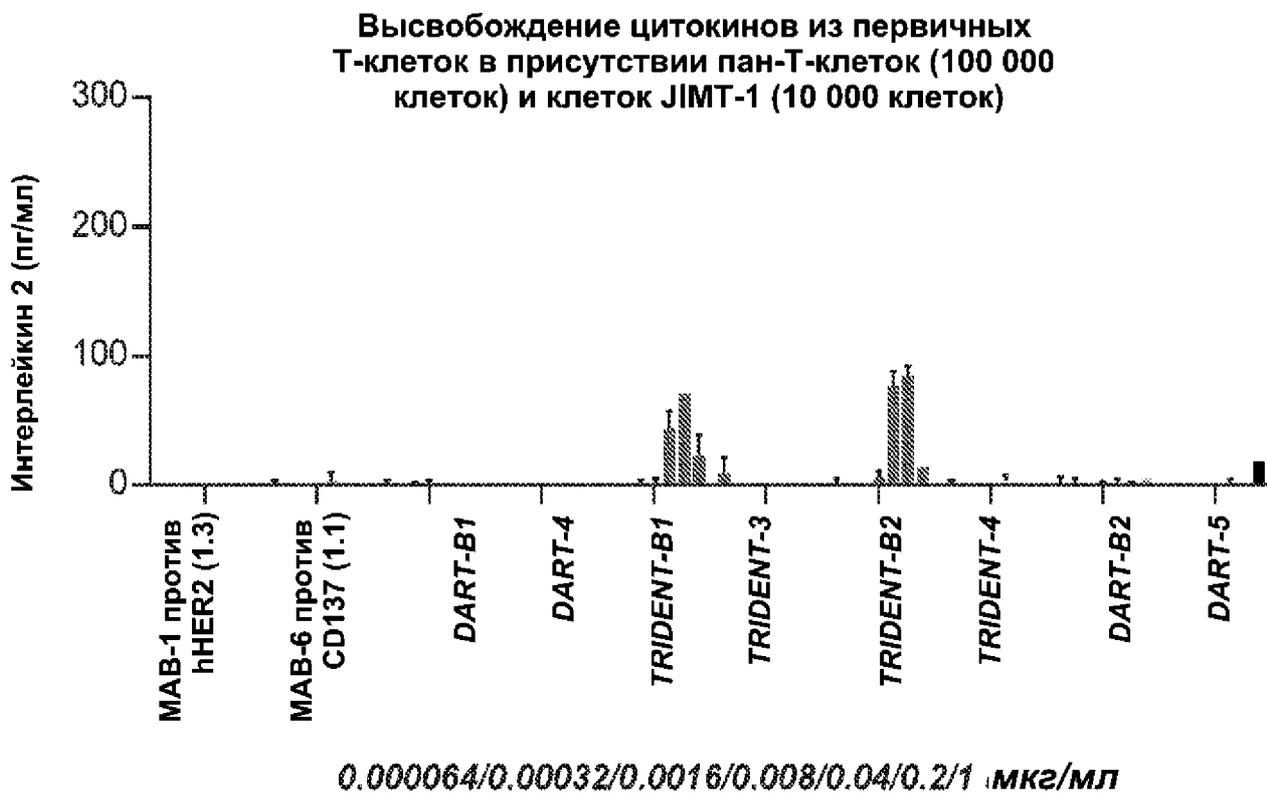
ФИГ. 22В



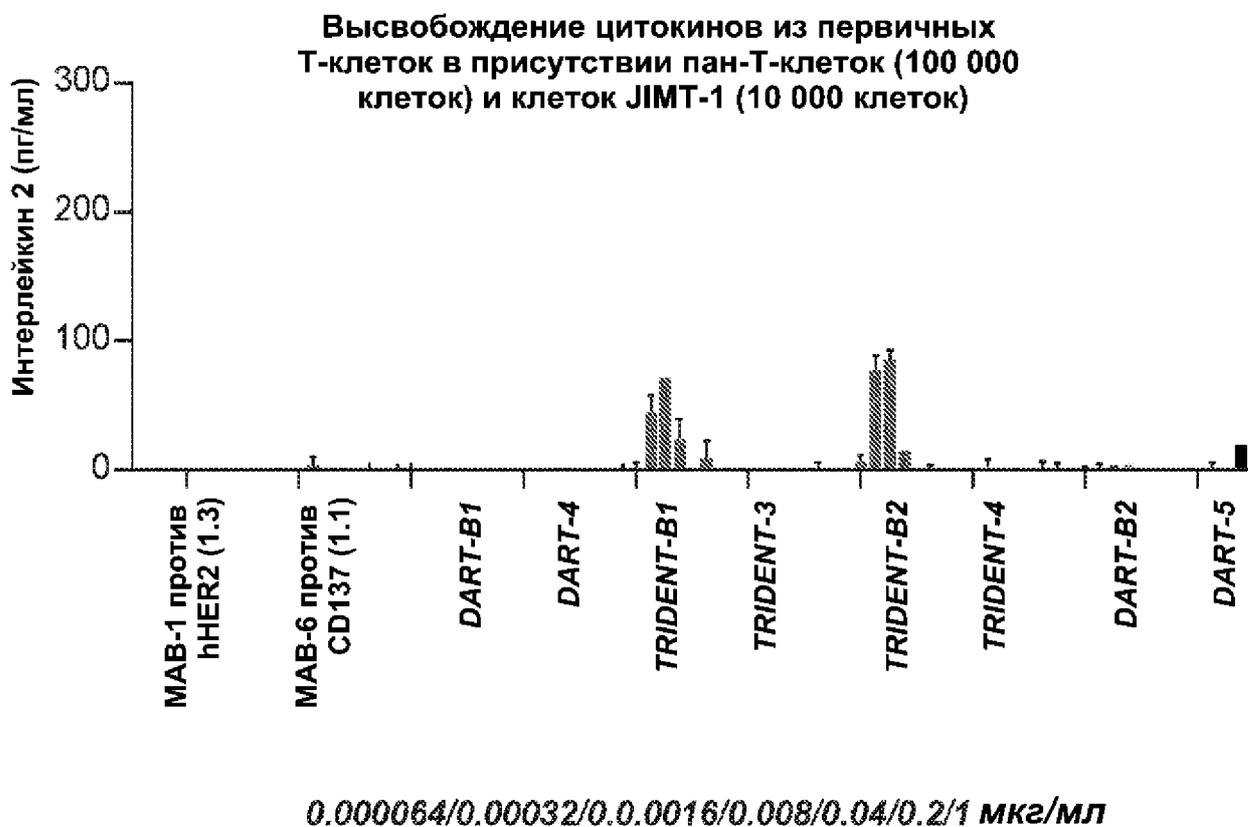
ФИГ. 23А



ФИГ. 23В



ФИГ. 23С



ФИГ. 23D