

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490723** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.09.23

(22) Дата подачи заявки
2022.10.12

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА К 4-1ВВ**

(31) **PCT/CN2021/123368**

(32) **2021.10.12**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2022/124973**

(87) **WO 2023/061421 2023.04.20**

(71) Заявитель:

**КОНЦЕПТ ТУ МЕДИСИН БИОТЕК
КО., ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:

**Гун Вэньци, Ян Лю, Гао Шань, Ян
Юаньюань, Фан Лэй (CN)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Предложены однодоменные антитела и полипептиды против 4-1ВВ, такие как биспецифичные антитела и химерные антигенные рецепторы, которые включают данные однодоменные антитела. Также предложены способы применения указанных антител или полипептидов для лечения и диагностики заболеваний, таких как рак.

202490723

A1

A1

202490723

ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА К 4-1ВВ

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[1] Однодоменное антитело (одАТ), также известное как нанотело, представляет собой фрагмент антитела, состоящий из одного мономерного переменного домена антитела. Нанотела, полученные из верблюдовых и некоторых других животных, также называют фрагментами V_{НН}. Как и целое антитело, нанотело способно селективно связываться с определенным антигеном. При молекулярной массе всего 12-15 кДа однодоменные антитела намного меньше, чем обычные антитела (150-160 кДа). Однодоменные антитела, учитывая их небольшие размеры и одноцепочечную природу, могут быть особенно подходящими для включения в качестве фрагмента в другие белки, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR) и биспецифичные антитела.

[2] 4-1ВВ (CD137, надсемейство рецепторов фактора некроза опухоли 9) является членом надсемейства рецепторов TNF (TNFRSF) и является костимулирующей молекулой, которая экспрессируется после активации иммунных клеток, как врожденного, так и адаптивного иммунитета. 4-1ВВ играет важную роль в модулировании активности различных иммунных клеток. Агонисты 4-1ВВ усиливают пролиферацию иммунных клеток, выживаемость, секрецию цитокинов CD8 Т-клетками и их цитолитическую активность. Многие другие исследования показали, что активация 4-1ВВ стимулирует иммунный ответ для устранения опухолей у мышей. Поэтому было высказано предположение, что 4-1ВВ является многообещающей молекулой-мишенью в онкоиммунологии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[3] Предложены нанотела, специфичные в отношении белка 4-1ВВ человека, а также би- или мультиспецифичные антитела, включающие такое нанотело. Согласно некоторым вариантам реализации нанотела согласно настоящему изобретению являются «неагонистическими», т.е. не активируют передачу сигналов 4-1ВВ сами по себе. Однако в комбинации с антителом к клаудину 18.2 полученное биспецифичное антитело обладает мощной активностью в активации передачи сигналов 4-1ВВ в присутствии клеток, положительных по клаудину 18.2.

[4] Активация передачи сигналов 4-1ВВ является ожидаемым механизмом действия для агонистических антител, таких как утомилумаб (PF-05082566) и урелумаб (BMS-

663513). Однако нанотела к 4-1BB, раскрытые в настоящем документе, не требуют такой активности. В сущности, предпочтительно, чтобы направленная против 4-1BB часть биспецифичного антитела была неспособна независимым образом активировать 4-1BB в отсутствие связывания с опухолеассоциированным антигеном (ТАА), на который также нацелено биспецифичное антитело, поскольку такие биспецифичные антитела будут иметь уменьшенные побочные эффекты вне опухоли.

[5] По сравнению с известными агонистическими антителами к 4-1BB, которые обычно ассоциированы с ограничивающей дозой токсичностью, связанной с целевым действием, антитела согласно настоящему изобретению являются гораздо более безопасными. Ожидается, что в ткани, такой как печень, в которой не экспрессируется соответствующий ТАА, биспецифичные антитела согласно настоящему изобретению не будут запускать цитотоксический иммунный ответ, поскольку они не смогут активировать передачу сигналов 4-1BB. Напротив, в опухолевой ткани, в которой экспрессируется и/или доступен ТАА, данные биспецифичные антитела могут инициировать мощный иммунный ответ против опухолевых клеток. Соответственно, в отличие от антител к 4-1BB, в настоящее время проходящих клинические исследования, которые обладают недостатком токсичности, связанной с целевым действием/имманентной токсичности, раскрытые в настоящем документе антитела могут быть одновременно эффективными и безопасными при лечении рака.

[6] Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено однодоменное антитело или полипептид, содержащий однодоменное антитело, причем указанное однодоменное антитело способно специфично связываться с белком 4-1BB человека и содержит определяющий комплементарность участок 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, при этом указанный CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, указанный CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, 39 или 40 и указанный CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

[7] Согласно другому варианту реализации предложено однодоменное антитело или полипептид, содержащий однодоменное антитело, причем указанное однодоменное антитело способно специфично связываться с белком 4-1BB человека и содержит определяющий комплементарность участок 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, при этом указанный CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, указанный CDR2

содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, 41 или 42 и указанный CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11.

[8] Согласно другому варианту реализации предложено однодоменное антитело или полипептид, содержащий однодоменное антитело, причем указанное однодоменное антитело способно специфично связываться с белком 4-1BB человека и содержит определяющий комплементарность участок 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, при этом указанный CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, указанный CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, 43 или 44 и указанный CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

[9] Согласно другому варианту реализации предложено однодоменное антитело или полипептид, содержащий однодоменное антитело, причем указанное однодоменное антитело способно специфично связываться с белком 4-1BB человека и содержит определяющий комплементарность участок 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, при этом указанные CDR1, CDR2 и CDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO:15-17, соответственно.

[10] Согласно другому варианту реализации предложено однодоменное антитело или полипептид, содержащий однодоменное антитело, причем указанное однодоменное антитело способно специфично связываться с белком 4-1BB человека и содержит определяющий комплементарность участок 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, при этом указанные CDR1, CDR2 и CDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO:18-20, соответственно.

[11] Согласно другому варианту реализации предложено однодоменное антитело или полипептид, содержащий однодоменное антитело, причем указанное однодоменное антитело способно специфично связываться с белком 4-1BB человека и содержит определяющий комплементарность участок 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, при этом указанные CDR1, CDR2 и CDR3 содержат аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 любой из SEQ ID NO:1-5, соответственно.

[12] Также предложены биспецифичные/мультиспецифичные антитела, которые включают одну или более единиц нанотел. Согласно некоторым вариантам реализации второй вид специфичности направлен на опухолевый антиген, такой как клаудин 18.2. Другие примеры опухолевых антигенов также раскрыты в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам реализации предложен химерный антигенный рецептор (CAR), который включает нанотело согласно настоящему изобретению.

[13] Также предложена композиция, содержащая антитело или полипептид и фармацевтически приемлемый носитель. Также предложен один или более полинуклеотидов, кодирующих антитело или полипептид, выделенная клетка, содержащая один или более полинуклеотидов, кодирующих антитело или его фрагмент.

[14] Также предложены способы лечения и варианты применения. Согласно одному варианту реализации предложен способ лечения рака у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту эффективного количества антитела или полипептида согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации рак представляет собой солидную опухоль. Согласно некоторым вариантам реализации рак выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака печени, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака эндометрия, лейкоза, лимфомы, рака поджелудочной железы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака уретры, рака головы и шеи, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака пищевода, рака яичника, рака почки, меланомы, рака предстательной железы и рака щитовидной железы. Согласно некоторым вариантам реализации способ дополнительно включает введение пациенту второго агента для терапии рака.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[15] На **ФИГ. 1** показаны результаты тестирования активности связывания антител к 4-1ВВ с антигеном 4-1ВВ человека, антигеном 4-1ВВ яванского макака и антигеном 4-1ВВ мыши методом ИФА.

[16] На **ФИГ. 2** показано связывание с белком 4-1ВВ человека на клетках.

[17] На **ФИГ. 3** показана полная кинетическая активность тестируемых антител к 4-1ВВ, измеренная с помощью *Biocore*.

[18] На **ФИГ. 4** представлены графики связывания по данным ИФА, чтобы показать, что тестируемые антитела не реагируют с ОХ40 человека или CD40 человека.

[19] На **ФИГ. 5** показано, что в отличие от референсного антитела к 4-1ВВ урелумаба тестируемые антитела не активировали передачу сигналов 4-1ВВ.

[20] На **ФИГ. 6** показано, что тестируемые биспецифичные антитела активировали передачу сигналов 4-1BB только в клетках СНО, положительных по клаудину 18.2.

[21] На **ФИГ. 7** показано, что тестируемые биспецифичные антитела активировали передачу сигналов 4-1BB в клетках МКПК только в присутствии клеток СНО, сверхэкспрессирующих клаудин 18.2.

[22] На **ФИГ. 8** показано, что биспецифичные антитела, включающие гуманизированное антитело В31, обладали активностью по активации NFκB, сопоставимой с активностью химерного антитела В31.

[23] На **ФИГ. 9** показано, что биспецифичные антитела, включающие гуманизированное антитело В31, обладали активностью по индукции секреции IL-2, сопоставимой с активностью химерного антитела В31.

[24] На **ФИГ. 10** показана активность тестируемых антител в ингибировании роста опухоли *in vivo*.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

[25] Следует отметить, что термин в единственном числе относится к одному или более выраженным таким термином объектам; например, под «антителом» подразумевается одно или более антител. Соответственно, термины в единственном числе, «один или более» и «по меньшей мере один» в настоящей заявке могут использоваться взаимозаменяемо.

[26] Если полинуклеотид или полинуклеотидная область (или полипептид или полипептидная область) имеет определенный процент (например, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) «идентичности последовательностей» с другой последовательностью, это означает, что при выравнивании последовательностей этот процент оснований (или аминокислот) при сравнении двух последовательностей является одинаковым. Это выравнивание и процент гомологии или идентичности последовательностей могут быть определены с использованием программного обеспечения, известного в данной области техники, например, описанного в Ausubel *et al.* eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*. Предпочтительно для выравнивания используются параметры по умолчанию. Одной из программ для выравнивания является

BLAST, использующая параметры по умолчанию. В частности, программами являются BLASTN и BLASTP, использующие следующие параметры по умолчанию: Генетический код = стандартный; фильтр = отсутствует; цепь = обе; отсечка = 60; ожидание = 10; Матрица = BLOSUM62; Описания = 50 последовательностей; сортировать по = ВЫСОКИЙ ПРОЦЕНТ СОВПАДЕНИЯ; Базы данных = неизбыточные, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR. Биологически эквивалентными полинуклеотидами являются полинуклеотиды, имеющие указанный выше процент гомологии и кодирующие полипептид, имеющий такую же или схожую биологическую активность.

[27] Термин «эквивалентная нуклеиновая кислота или полинуклеотид» относится к нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность нуклеотидов с некоторой степенью гомологии или идентичности последовательности с указанной последовательностью нуклеотидов нуклеиновой кислоты или ее комплемента. Подразумевается, что гомолог двухцепочечной нуклеиновой кислоты включает нуклеиновые кислоты с нуклеотидной последовательностью, которая в некоторой степени гомологична ей или ее комплементу. В одном аспекте гомологи нуклеиновых кислот способны гибридизоваться с нуклеиновой кислотой или ее комплементом. Аналогичным образом, «эквивалентный полипептид» относится к полипептиду с некоторой степенью гомологии или идентичности с последовательностью аминокислот референсного полипептида. В некоторых аспектах идентичность последовательностей составляет по меньшей мере приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%. В некоторых аспектах эквивалентный полипептид или полинуклеотид содержит одну, две, три, четыре или пять вставок, делеций, замен и их комбинаций по сравнению с референсным полипептидом или полинуклеотидом. В некоторых аспектах эквивалентная последовательность сохраняет активность (например, связывание с эпитопом) или структуру (например, солевой мостик) референсной последовательности.

[28] В контексте настоящей заявки «антитело» или «антигенсвязывающий полипептид» относится к полипептиду или полипептидному комплексу, который специфичным образом распознает антиген и связывается с ним. Антитело может представлять собой целое антитело и любой антигенсвязывающий фрагмент или одну его цепь. Таким образом, термин «антитело» включает любую молекулу, содержащую белок или пептид, которая содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, обладающую биологической активностью связывания с антигеном. Их примеры включают, но не ограничиваются перечисленными, определяющий комплементарность участок (CDR)

тяжелой или легкой цепи или его лигандсвязывающую часть, переменную область тяжелой цепи или легкой цепи, константную область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасную (FR) область, или любую их часть, или по меньшей мере одну часть связывающего белка.

[29] Термины «фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий фрагмент» в контексте настоящего документа представляют собой часть антитела, такую как $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , Fv , $scFv$ и тому подобное. Независимо от структуры фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который распознается интактным антителом. Термин «фрагмент антитела» включает аптамеры, шпигельмеры и диатела. Термин «фрагмент антитела» также включает любой синтетический или генетически модифицированный белок, действующий как антитело, связываясь с определенным антигеном с образованием комплекса.

[30] «Одноцепочечный переменный фрагмент» или « $scFv$ » относится к слитому белку переменных областей тяжелой (V_H) и легкой (V_L) цепей иммуноглобулинов. В некоторых аспектах области соединены коротким линкерным пептидом длиной от 10 до приблизительно 25 аминокислот. Линкер может иметь высокое содержание глицина для гибкости, а также серина или треонина для растворимости, и может либо соединять N-конец V_H с C-концом V_L , либо наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкера. Молекулы $scFv$ известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США 5892019.

[31] Термин «антитело» охватывает различные широкие классы полипептидов, которые являются биохимически различимыми. Специалистам в данной области техники известно, что тяжелые цепи подразделяют на гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon (γ , μ , α , δ , ϵ), среди которых также есть несколько подклассов (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Именно природа этой цепи определяет «класс» антитела как IgG , IgM , IgA , IgG или IgE , соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например, IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 , IgG_4 , IgG_5 и т. д., хорошо охарактеризованы и, как известно, придают функциональную специализацию. Модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов легко различимы специалистом в данной области техники с учетом настоящего описания и, соответственно, находятся в пределах объема настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов со всей очевидностью находятся в пределах объема настоящего изобретения, при этом последующее обсуждение будет большей частью касаться класса IgG молекул

иммуноглобулинов. Что касается IgG, стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи молекулярной массой приблизительно 23000 дальтон и два идентичных полипептида тяжелой цепи молекулярной массой 53000-70000. Четыре цепи, как правило, соединены дисульфидными связями в конфигурацию «Y», где легкие цепи заключают в себе тяжелые цепи, начинающиеся в устье «Y» и продолжающиеся через вариабельную область.

[32] Антитела, антигенсвязывающие полипептиды, их варианты или производные согласно настоящему изобретению включают, не ограничиваясь перечисленным, поликлональные, моноклональные, мультиспецифичные, человеческие, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитопсвязывающие фрагменты, например, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fvs, одноцепочечные Fvs (scFv), одноцепочечные антитела, дисульфидсвязанные Fvs (sdFv), фрагменты, содержащие домен VK или VH, фрагменты, полученные с помощью экспрессионной библиотеки Fab-фрагментов, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id-антитела к антителам LIGHT, раскрытым в настоящем документе). Молекулы иммуноглобулинов или антител согласно настоящему изобретению могут относиться к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу молекул иммуноглобулинов.

[33] Под «специфично связывает» или «обладает специфичностью к» обычно подразумевается, что антитело связывается с эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена, и что связывание сопряжено с некоторой комплементарностью между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Согласно этому определению антитело, как говорят, «специфично связывается» с эпитопом, когда оно связывается с этим эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена вероятнее, чем оно связалось бы со случайным, неродственным эпитопом. Термин «специфичность» используется в настоящем документе для оценки относительной аффинности, с которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, можно считать, что антитело «А» имеет более высокую специфичность для данного эпитопа, чем антитело «В», или об антителе «А» можно сказать, что оно связывается с эпитопом «С» с более высокой специфичностью, чем его специфичность для родственного эпитопа «D».

[34] В контексте настоящего документа термины «лечить» или «лечение» относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, где целью является предупреждение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства, например, прогрессирования рака. Благоприятные или желательные клинические результаты включают, не ограничиваясь перечисленным, частичное снятие симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) течение заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, уменьшение интенсивности или временное ослабление течения заболевания и ремиссию (частичную или полную), как обнаружимые, так и не обнаружимые. «Лечение» также может означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если лечение не проводится. Субъекты, нуждающиеся в лечении, включают уже имеющих состояние или расстройство, а также тех, кто предрасположен к развитию этого состояния или расстройства, или тех, у кого состояние или расстройство необходимо предупредить.

[35] Под «субъектом», «индивидуумом», «животным», «пациентом» или «млекопитающим» подразумевается любой субъект, в частности млекопитающее, для которого желательны диагностика, прогнозирование или терапия. Субъекты-млекопитающие включают людей, одомашненных животных, сельскохозяйственных животных и животных зоопарка, животных, принимающих участие в спорте, или домашних животных, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и так далее.

[36] В настоящей заявке такие выражения как «нуждающемуся в лечении пациенту» или «нуждающийся в лечении субъект» включают субъектов, таких как субъекты-млекопитающие, которые получили бы пользу от введения антитела или композиции согласно настоящему изобретению при применении, например, для обнаружения, для процедуры диагностики и/или для лечения.

Однородные антитела к 4-1BB

[37] Согласно настоящему изобретению предложены одноцепочечные антитела к 4-1BB с высокой аффинностью в отношении белка 4-1BB человека. Согласно некоторым вариантам реализации предложенные нанотела не способны активировать передачу сигналов 4-1BB посредством только такого связывания и, таким образом, называются

«неагонистическими» антителами к 4-1BB. Такие неагонистические нанотела к 4-1BB особенно подходят для получения биспецифичных антител.

[38] Активация передачи сигналов 4-1BB является ожидаемым механизмом действия для агонистических антител, таких как утомилумаб (PF-05082566) и урелумаб (BMS-663513). Однако не требуется, чтобы нанотела к 4-1BB, раскрытые в настоящем документе, обладали такой активностью. В сущности, предпочтительно, чтобы направленная против 4-1BB часть биспецифичного антитела была неспособна независимым образом активировать 4-1BB в отсутствие связывания CLDN18.2, поскольку такие биспецифичные антитела будут иметь уменьшенные нецелевые побочные эффекты.

[39] По сравнению с известными агонистическими антителами к 4-1BB, такими как утомилумаб (PF-05082566) и урелумаб (BMS-663513), которые обычно ассоциированы с ограничивающей дозу токсичностью, связанной с целевым действием, биспецифичные антитела согласно настоящему изобретению являются гораздо более безопасными. Ожидается, что в ткани, в которой не экспрессируется CLDN18.2, биспецифичные антитела согласно настоящему изобретению не будут запускать цитотоксический иммунный ответ, поскольку они не могут активировать передачу сигналов 4-1BB. Напротив, в опухолевой ткани, в которой экспрессируется и/или доступен CLDN18.2, данные биспецифичные антитела могут инициировать мощный иммунный ответ против опухолевых клеток. Соответственно, в отличие от антител к 4-1BB, в настоящее время проходящих клинические исследования, которые обладают недостатком токсичности, связанной с целевым действием/имманентной токсичности, раскрытые в настоящем документе антитела могут быть одновременно эффективными и безопасными при лечении рака.

[40] Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены однодоменные антитела и полипептиды, которые включают такое однодоменное антитело. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено однодоменное антитело или полипептид, содержащий однодоменное антитело, причем указанное однодоменное антитело включает CDR1, CDR2 и CDR3, которые, соответственно, имеют последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 антитела B31 (SEQ ID NO:1). Согласно некоторым вариантам реализации CDR1 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, CDR2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, 39 или 40 и CDR3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8. Согласно некоторым вариантам реализации CDR1,

CDR2 и CDR3 включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:6-8, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации CDR1, CDR2 и CDR3 включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:6, 39 и 8, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации CDR1, CDR2 и CDR3 включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:6, 40 и 8, соответственно.

[41] Также предложены гуманизированные антитела, такие как те, которые предложены в SEQ ID NO:21-25 для антитела B31. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированные антитела включают обратные мутации, выбранные из группы, состоящей из 23A, 37Y, 40P, 41Q, 44Q, 45R, 49A, 74N, 78M, 82(82A)D и 94A в соответствии с нумерацией по Kabat. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированные антитела включают обратные мутации 37Y, 44Q, 45R и 94A. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированные антитела включают обратные мутации 23A, 37Y, 44Q, 45R, 49A, 74N и 94A. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированные антитела включают обратные мутации 23A, 37Y, 44Q, 45R, 49A, 78M, 82(82A)D и 94A. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированные антитела включают обратные мутации 23A, 37Y, 40P, 41Q, 44Q, 45R, 49A, 74N, 82(82A)D и 94A. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированные антитела включают обратные мутации 37Y, 44Q, 45R и 49A.

[42] Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает гуманизированную последовательность SEQ ID NO:21. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает гуманизированную последовательность SEQ ID NO:22. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает гуманизированную последовательность SEQ ID NO:23. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает гуманизированную последовательность SEQ ID NO:24. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает гуманизированную последовательность SEQ ID NO:25. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает указанные CDR1, CDR2 и CDR3 и имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:1 и 21-25.

[43] Согласно другому варианту реализации предложено однодоменное антитело или полипептид, содержащий однодоменное антитело, причем указанное однодоменное антитело включает CDR1, CDR2 и CDR3, которые, соответственно, имеют последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 антитела B16 (SEQ ID NO:2). Согласно

некоторым вариантам реализации CDR1 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, CDR2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, 41 или 42 и CDR3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11. Согласно некоторым вариантам реализации CDR1, CDR2 и CDR3 включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:9-11, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации CDR1, CDR2 и CDR3 включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:9, 41 и 11, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации CDR1, CDR2 и CDR3 включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:9, 42 и 11, соответственно.

[44] Также предложены гуманизированные антитела, такие как те, которые предложены в SEQ ID NO:31-34 для антитела B16. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированные антитела включают обратные мутации, выбранные из группы, состоящей из 29L, 30D, 37F, 44E, 45R, 47G, 74A, 84P и 94T в соответствии с нумерацией по Kabat. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированные антитела включают обратные мутации, выбранные из группы, состоящей из 37F, 44E, 45R, 47G и 94T в соответствии с нумерацией по Kabat. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированные антитела включают обратные мутации, выбранные из группы, состоящей из 29L, 30D, 37F, 44E, 45R, 47G и 94T в соответствии с нумерацией по Kabat. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированные антитела включают обратные мутации, выбранные из группы, состоящей из 29L, 30D, 37F, 44E, 45R, 47G, 74A, 84P и 94T в соответствии с нумерацией по Kabat.

[45] Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает гуманизированную последовательность SEQ ID NO:31. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает гуманизированную последовательность SEQ ID NO:32. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает гуманизированную последовательность SEQ ID NO:33. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает гуманизированную последовательность SEQ ID NO:34. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает указанные CDR1, CDR2 и CDR3 и имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:2 и 31-34.

[46] Согласно другому варианту реализации предложено однодоменное антитело или полипептид, содержащий однодоменное антитело, причем указанное однодоменное

антитело включает CDR1, CDR2 и CDR3, которые, соответственно, имеют последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 антитела B125 (SEQ ID NO:3). Согласно некоторым вариантам реализации CDR1 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, CDR2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, 43 или 44 и CDR3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14. Согласно некоторым вариантам реализации CDR1, CDR2 и CDR3 включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:12-14, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации CDR1, CDR2 и CDR3 включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:12, 43 и 14, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации CDR1, CDR2 и CDR3 включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:12, 44 и 14, соответственно.

[47] Также предложены гуманизированные антитела, такие как те, которые предложены в SEQ ID NO:26-30 для антитела B125. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированные антитела включают обратные мутации, выбранные из группы, состоящей из 37F, 43K, 44E, 45R, 47G, 74A, 84P и 94T в соответствии с нумерацией по Kabat. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированные антитела включают обратные мутации, выбранные из группы, состоящей из 37F, 44E, 45R, 47G и 94T в соответствии с нумерацией по Kabat. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированные антитела включают обратные мутации, выбранные из группы, состоящей из 37F, 43K, 44E, 45R, 47G и 74A в соответствии с нумерацией по Kabat. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированные антитела включают обратные мутации, выбранные из группы, состоящей из 37F, 43K, 44E, 45R, 47G, 74A и 94T в соответствии с нумерацией по Kabat. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированные антитела включают обратные мутации, выбранные из группы, состоящей из 37F, 43K, 44E, 45R, 47G, 74A, 84P и 94T в соответствии с нумерацией по Kabat.

[48] Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает гуманизированную последовательность SEQ ID NO:26. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает гуманизированную последовательность SEQ ID NO:27. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает гуманизированную последовательность SEQ ID NO:28. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает гуманизированную последовательность SEQ ID NO:29. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает гуманизированную последовательность SEQ ID

NO:30. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает указанные CDR1, CDR2 и CDR3 и имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:3 и 26-30.

[49] Согласно другому варианту реализации предложено однодоменное антитело или полипептид, содержащий однодоменное антитело, причем указанное однодоменное антитело включает CDR1, CDR2 и CDR3, которые, соответственно, имеют последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 антитела B164 (SEQ ID NO:4). Согласно некоторым вариантам реализации CDR1, CDR2 и CDR3 включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:15-17, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает указанные CDR1, CDR2 и CDR3 и имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:4.

[50] Согласно другому варианту реализации предложено однодоменное антитело или полипептид, содержащий однодоменное антитело, причем указанное однодоменное антитело включает CDR1, CDR2 и CDR3, которые, соответственно, имеют последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 антитела B210 (SEQ ID NO:5). Согласно некоторым вариантам реализации CDR1, CDR2 и CDR3 включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:18-20, соответственно.

[51] Также предложены гуманизированные антитела, такие как те, которые предложены в SEQ ID NO:26-30 для антитела B210. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированные антитела включают обратные мутации, выбранные из группы, состоящей из 27L, 29L, 37F, 44E, 45R, 47G, 89D и 94T в соответствии с нумерацией по Kabat. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированные антитела включают обратные мутации, выбранные из группы, состоящей из 37F, 44E, 45R, 47G и 94T в соответствии с нумерацией по Kabat. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированные антитела включают обратные мутации, выбранные из группы, состоящей из 27L, 37F, 44E, 45R, 47G и 94T в соответствии с нумерацией по Kabat. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированные антитела включают обратные мутации, выбранные из группы, состоящей из 27L, 29L, 37F, 44E, 45R, 47G, 89D и 94T в соответствии с нумерацией по Kabat.

[52] Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает гуманизированную последовательность SEQ ID NO:35. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает гуманизированную последовательность SEQ ID

NO:36. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает гуманизованную последовательность SEQ ID NO:37. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает гуманизованную последовательность SEQ ID NO:38. Согласно некоторым вариантам реализации антитело включает указанные CDR1, CDR2 и CDR3 и имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:5 и 35-38.

[53] Согласно некоторым вариантам реализации также предложены антитела к 4-1BB и антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют с любым из антител, раскрытых в настоящем документе, при связывании с 4-1BB человека. Согласно некоторым вариантам реализации также предложены антитела к 4-1BB и антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из антител, раскрытых в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации также предложены антитела к 4-1BB и антигенсвязывающие фрагменты, которые включают CDR1, CDR2 и CDR3 антител, раскрытых в настоящем документе.

[54] Также предложены композиции, которые включают антитело или полипептид и фармацевтически приемлемый носитель.

[55] Специалисту в данной области техники также будет ясно, что антитела, раскрытые в настоящем документе, могут быть модифицированы таким образом, что их аминокислотная последовательность будет отличаться от встречающегося в природе связывающего полипептида, из которого они происходят. Например, полипептидная или аминокислотная последовательность, происходящая из обозначенного белка, может быть схожей, например, иметь определенный процент идентичности исходной последовательности, например, она может быть на 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична исходной последовательности. Согласно некоторым вариантам реализации модифицированное антитело или фрагмент сохраняет обозначенные последовательности CDR.

[56] Согласно определенным вариантам реализации антитело содержит аминокислотную последовательность или один или более фрагментов, которые обычно не связаны с антителом. Примеры модификаций более подробно описаны ниже. Например, антитело согласно настоящему изобретению может содержать гибкую линкерную последовательность или может быть модифицировано с добавлением функционального фрагмента (например, ПЭГ, лекарственного средства, токсина или метки).

[57] Также предложены биспецифичные и мультиспецифичные антитела, которые включают одну, две, три или четыре единицы однодоменного антитела к 4-1BB, раскрытого в настоящем документе, и имеют один или более других видов специфичности (не 4-1BB).

Биспецифичные и мультиспецифичные антитела и химерные антигенные рецепторы (CAR)

[58] Как предложено, антитела к 4-1BB, раскрытые в настоящем документе, особенно пригодны для получения биспецифичных и мультиспецифичных антител, а также химерных антигенных рецепторов (CAR). Это связано по меньшей мере с повышенным терапевтическим индексом этих антител и их небольшими размерами.

[59] Соответственно, согласно одному варианту реализации предложено биспецифичное антитело, которое включает нанотело к 4-1BB согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, и второе антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способный специфично связываться с антигеном-мишенью, который не является 4-1BB. Согласно некоторому варианту реализации дополнительно включен третий или четвертый вид специфичности.

[60] Антиген-мишень, не являющийся 4-1BB, согласно некоторым вариантам реализации представляет собой опухолевый антиген. В данной области техники известно большое количество опухолевых антигенов, и новые опухолевые антигены можно легко обнаружить путем скрининга. Неограничивающие примеры опухолевых антигенов включают ABL, ALK, B4GALNT1, BAFF, BCL2, BRAF, BTK, CD19, CD20, CD30, CD38, CD52, CD73, клаудин 18.2, CTLA-4, EGFR, FOLR1, FLT3, HDAC, HER2, IDH2, IL-1 β , IL-6, IL-6R, JAK1/2, JAK3, KIT, LAG-3, MEK, нектин 4, ROR1, mTOR, PARP, PD-1, PDGFR, PDGFR α , PD-L1, PI3K δ , PIGF, PTCH, RAF, RANKL, Smoothed, VEGF, VEGFR и VEGFR2. Другие примеры представляют собой Her2, EpCAM, CD33, CD47, CD133, CEA, gpA33, муцины, TAG-72, CIX, PSMA, GD2, GD3, GM2, интегрин, α V β 3, α 5 β 1, ERBB2, ERBB3, MET, IGF1R, EphA3, TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP и тенаascin.

[61] Согласно некоторым вариантам реализации биспецифичное антитело обладает специфичностью в отношении 4-1BB и клаудина 18.2.

[62] Также предложен химерный антигенный рецептор (CAR), который включает нанотело согласно настоящему изобретению. В CAR нанотело может служить в качестве

антигенраспознающего домена. Кроме того, согласно некоторым вариантам реализации CAR также включает внеклеточную шарнирную область, трансмембранный домен и внутриклеточный T-клеточный сигнальный домен.

[63] Шарнир, также называемый спейсером, представляет собой небольшой структурный домен, который находится между областью распознавания антигена и внешней мембраной клетки. Подходящий шарнир повышает гибкость головки рецептора scFv, уменьшая пространственные ограничения между CAR и его антигеном-мишенью. Примеры шарнирных последовательностей основаны на проксимальных относительно мембраны областях из иммунных молекул, таких как IgG, CD8 и CD28.

[64] Трансмембранный домен представляет собой структурный компонент, состоящий из гидрофобной альфа-спирали, которая пронизывает клеточную мембрану. Он прикрепляет CAR к плазматической мембране, соединяя внеклеточный шарнир и домены распознавания антигена с внутриклеточной сигнальной областью. Как правило, можно применять трансмембранный домен из проксимального относительно мембраны компонента эндодомена, такой как трансмембранный домен CD28.

[65] Внутриклеточный T-клеточный сигнальный домен находится в эндодомене рецептора, внутри клетки. После связывания антигена с внешним доменом распознавания антигена CAR-рецепторы кластеризуются вместе и передают сигнал активации. Затем внутренний цитоплазматический конец рецептора передает сигналы внутрь T-клетки. Чтобы имитировать этот процесс в качестве основного компонента эндодомена CAR обычно используется цитоплазматический домен CD3-дзета.

[66] T-клеткам также требуются костимулирующие молекулы в дополнение к передаче сигналов CD3, чтобы сохраняться после активации. Согласно некоторым вариантам реализации эндодомены CAR-рецептора также включают один или более химерных доменов из костимулирующих белков, таких как CD28, CD27, CD134 (OX40) и CD137 (4-1BB).

Полинуклеотиды, кодирующие антитела, и способы получения антител

[67] Настоящее изобретение также относится к выделенным полинуклеотидам или молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела, их варианты или производные согласно настоящему изобретению. Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут кодировать целые переменные области тяжелой и легкой цепей

антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов. Кроме того, полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут кодировать части переменных областей тяжелой и легкой цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов.

[68] Способы получения антител хорошо известны в данной области техники и описаны в настоящем документе. В отдельных вариантах осуществления как переменные, так и константные области антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению являются полностью человеческими. Полностью человеческие антитела могут быть получены с использованием методик, описанных в данной области техники и в настоящем документе. Например, полностью человеческие антитела против определенного антигена могут быть получены путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для выработки таких антител в ответ на провокацию антигеном, при этом его эндогенные локусы были дезактивированы. Примеры методик, которые могут быть использованы для получения таких антител, описаны в патентах США: 6150584; 6458592; 6420140, которые полностью включены посредством ссылки.

Лечение рака

[69] Как описано в настоящей заявке, антитела, биспецифичные антитела, полипептиды, варианты или производные согласно настоящему изобретению можно применять в определенных способах лечения и диагностики.

[70] Настоящее изобретение дополнительно относится к методам терапии на основе антител, включающим введение антител согласно настоящему изобретению пациенту, такому как животное, млекопитающее и человек, для лечения одного или более расстройств или состояний, описанных в настоящем документе. Терапевтические соединения согласно настоящему изобретению включают, не ограничиваясь перечисленным, антитела согласно настоящему изобретению (включая их варианты и производные, как описано в настоящем документе) и нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды, кодирующие антитела согласно настоящему изобретению (включая их варианты и производные, как описано в настоящем документе).

[71] Согласно некоторым вариантам реализации предложены способы лечения рака у нуждающегося в этом пациента. Способ согласно одному варианту реализации включает введение указанному пациенту эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере одна из раковых клеток (например, стромальных клеток) у пациента сверхэкспрессирует опухолевый антиген, такой как клаудин 18.2.

[72] Способы клеточной терапии, такие как терапия Т-клетками или НК-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR), также охватываются настоящим изобретением. Можно применять подходящую клетку, которую приводят в контакт с антителом или CAR согласно настоящему изобретению (или, в качестве альтернативы, сконструированную для экспрессии антитела или CAR согласно настоящему изобретению). После такого контакта или конструирования клетку затем можно ввести онкологическому пациенту, нуждающемуся в лечении. Онкологический пациент может иметь рак любого типа, раскрытого в настоящем документе. Клетка (например, Т-клетка или НК-клетка) может представлять собой, например, инфильтрирующий опухоль Т-лимфоцит, CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку или их комбинацию, не ограничиваясь перечисленным.

[73] Согласно некоторым вариантам реализации клетка была выделена у самого онкологического пациента. Согласно некоторым вариантам реализации клетка была предоставлена донором или получена из банка клеток. Когда клетку выделяют у онкологического пациента, можно минимизировать нежелательные иммунные реакции.

[74] Дополнительные заболевания или состояния, связанные с повышенной выживаемостью клеток, которые можно лечить, предотвращать, диагностировать и/или прогнозировать с помощью антител или их вариантов или производных в соответствии с настоящим изобретением, включают, но не ограничены перечисленными, прогрессирование и/или метастазы злокачественных новообразований и связанных с ними расстройств, таких как лейкоз (включая острые лейкозы (например, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз (включая миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз)) и хронические лейкозы (например, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз)), истинную полицитемию, лимфомы (например, болезнь Ходжкина и неходжкинскую болезнь), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей и солидные опухоли, включая, но не ограничиваясь ими, саркомы и карциномы, такие как фибросаркома,

миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, карцинома толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак щитовидной железы, рак эндометрия, меланома, рак предстательной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточная карцинома, базальноклеточная карцинома, аденокарцинома, карцинома потовых желез, карцинома сальных желез, папиллярная карцинома, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, почечно-клеточная карцинома, гепатома, карцинома желчных протоков, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, карцинома легкого, мелкоклеточная карцинома легкого, карцинома мочевого пузыря, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимомы, пинеалома, гемангиобластома, невринома слухового нерва, олигодендроглиома, менингиома, меланома, нейробластома и ретинобластома.

Способы диагностики

[75] Сверхэкспрессия 4-1BB наблюдается в образцах некоторых опухолей, и пациенты, имеющие сверхэкспрессирующие 4-1BB клетки, вероятно, будут отвечать на лечение антителами к 4-1BB согласно настоящему изобретению. Соответственно, антитела согласно настоящему изобретению также можно применять в целях диагностики и прогнозирования.

[76] Образец, который предпочтительно содержит клетку, можно получить от пациента, который может представлять собой имеющего рак пациента или пациента, ожидающего диагностики. Клетка может представлять собой клетку опухолевой ткани или опухолевого блока, образца крови, образца мочи или любого образца от пациента. После необязательной предварительной обработки образца он может быть инкубирован с антителом согласно настоящему изобретению в условиях, обеспечивающих возможность взаимодействия антитела с белком 4-1BB, потенциально присутствующим в образце. Могут быть использованы такие способы как ИФА, в которых используют антитело к 4-1BB для обнаружения присутствия белка 4-1BB в образце.

[77] Присутствие белка 4-1BB в образце (необязательно с определением количества или концентрации) может применяться для диагностики рака, как свидетельство того, что

пациент подходит для лечения антителом, или как свидетельство того, что пациент ответил (или не ответил) на лечение рака. Для способа прогнозирования обнаружение может быть осуществлено один, два или более раз, на определенных стадиях, после начала лечения рака, чтобы показать прогресс лечения.

Композиции

[78] Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям. Такие композиции содержат эффективное количество антитела и приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно включает второй противораковый агент (например, ингибитор иммунных контрольных точек).

[79] В отдельном варианте реализации термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный федеральным или региональным надзорным органом или указанный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее как подходящий для применения у животных и, более конкретно, у человека. Кроме того, «фармацевтически приемлемый носитель» обычно представляет собой нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательную композицию любого типа.

[80] Термин «носитель» относится к разбавителю, адьюванту, вспомогательному веществу или наполнителю, с которым вводится терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобные. Вода является предпочтительным носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. Физиологические растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут быть использованы в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и тому подобное. Композиция при необходимости может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или буферных агентов, таких как ацетаты, цитраты или фосфаты. Также предусмотрены антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены;

антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; комплексообразующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Эти композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и тому подобного. Композиция может быть получена в виде суппозитория с традиционными связующими агентами и носителями, такими как триглицериды. Пероральный препарат может включать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния фармацевтической степени чистоты и т. д. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в источнике Remington's Pharmaceutical Sciences за авт. E. W. Martin, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего полипептида, предпочтительно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения пациенту. Препарат должен соответствовать способу введения. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластика.

[81] В одном варианте реализации рецептура фармацевтической композиции разработана в соответствии с рутинными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения людям. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буферном растворе. При необходимости композиция может также включать солюбилизирующий агент и местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Обычно ингредиенты поставляются либо по отдельности, либо в виде смеси в составе стандартной лекарственной формы, например, в виде сухого лиофилизованного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента. Если композиция подлежит введению путем инфузии, она может быть помещена, например, в инфузионную бутылку, содержащую стерильную воду или физиологический раствор фармацевтической степени чистоты. Если композиция подлежит введению путем инъекции, может быть обеспечена ампула со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, так что ингредиенты могут быть смешаны перед введением.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Создание антител VHH против 4-1ВВ человека

[82] В этом примере описано создание однодоменных (VHH) антител против белка 4-1ВВ человека.

[83] *Иммунизация:* Для создания антител VHH к 4-1ВВ человека двух альпак иммунизировали белком 4-1ВВ человека. После 2 раундов иммунизации проводили оценку титра антител в сыворотке иммунизированных альпак с помощью ИФА.

[84] *Конструирование иммунизированной библиотеки:* Фаговую библиотеку конструировали, используя фагмидные векторы, которые содержали фрагменты генов VHH, которые были амплифицированы из МКПК альпак, иммунизированных 4-1ВВ. Формат антител представлял собой фрагмент VHH в библиотеке фагового дисплея. Создавали три иммунизированные библиотеки из МКПК разных альпак в разных раундах иммунизации. Размер каждой библиотеки составлял более 1×10^9 , и разнообразие последовательностей анализировали, как описано далее. Из каждой библиотеки отбирали по 48 клонов, а затем секвенировали. Последовательности показали достаточное разнообразие в CDR для этих трех библиотек.

[85] *Пэннинг фагов и селекция клонов:* Белок 4-1ВВ использовали в качестве антигена для пэннинга фаговой библиотеки.

[86] *Пэннинг фаговой библиотеки в жидкой фазе или пэннинг в твердой фазе против 4-1ВВ человека:* Связанные фаги элюировали Gly-HCl. Полученный в результате этого фаг представлял собой продукт 1. Связанные фаги инкубировали с клетками SS320 и высевали на планшеты 2YT для следующего раунда скрининга путем пэннинга. Всего проводили 3 раунда скрининга путем пэннинга. ИФА фагов продукта 1, продукта 2 и продукта 3 показал обогащение связывающими 4-1ВВ молекулами после трех раундов скрининга.

[87] Отдельные клоны отбирали из фагов продукта 2 и продукта 3. Фаг этих клонов подвергали анализу связывания антигена методом ИФА. Клоны, которые показали хорошую эффективность связывания, отбирали для последующего секвенирования.

[88] Пять последовательностей-кандидатов клонировали в вектор pcDNA 3.4 и экспрессировали в клетках 293F. Моноклональные антитела очищали из культурального

супернатанта с помощью белка G. Оценивали связывание очищенных антител с белком 4-1ВВ-His с помощью ИФА.

[89] Аминокислотные последовательности отдельных варибельных доменов B31, B16, B125, B164, B210 перечислены в **Таблицах 1** ниже. Последовательности CDR обобщены в **Таблице 1А-1Е**. Некоторые из последовательностей CDR включают дипептиды, такие как NG и DG, которые могут быть подвержены посттрансляционным модификациям. В таблице также приведены некоторые версии этих последовательностей «со сниженным риском», которые, как предусмотрено, сохраняют активность антитела при одновременном снижении таких рисков посттрансляционной модификации.

Таблица 1. Последовательности варибельных доменов

Название	Последовательность	SEQ NO:	ID
B31	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGDIF <u>SIMFWYRQPQ</u> GKQREYVA <u>HITSNGRTNYADSVTGRFTISRGNNDNTMYL</u> QMDNLKPQDTAVYYCA <u>ADDA TNTRTY</u> WGQGTQVTVSS	1	
B16	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLD <u>YYAIGWFRQ</u> APGKREGVSC <u>ISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTV</u> YLQMNSLKPEDTAVYYCAT <u>DTTTRCPIWSYYVESDYWG</u> QGTQVTVSS	2	
B125	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF AFS <u>DYAIGWFRQ</u> APGKREGVSC <u>ISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTV</u> YLQMNSLKPEDTAVYYCAT <u>DTTTRCPIWSYYVESDYWG</u> QGTQVTVSS	3	
B164	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIF <u>SYMFWYRQPQ</u> GKQREYVA <u>HITSGGRTNYADSVTGRFTISRGNNDNTMYL</u> QMNNLKPEDTAVYYCA <u>DDAVYTDRTY</u> WGQGTQVTVSS	4	
B210	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLSLD <u>YYAIGWFRQ</u> APGKREGVSC <u>ISSSGRSTNYADSVKGRFTISRDNKNTV</u> YLQMNSLKPEDTADYYCAT <u>DTTTRCPIWSNYVESDYWG</u> QGTQVTVSS	5	

Таблица 1А. Последовательности CDR B31

Название	Последовательность	SEQ NO:	ID
B31-CDR1	SIMF	6	
B31-CDR2	HITSNGRTNYADSVTG	7	
	HITSN <u>A</u> RTNYADSVTG	39	
	HITS <u>Q</u> GRNTNYADSVTG	40	

B31-CDR3	DDATNTRTY	8
----------	-----------	---

Таблица 1B. Последовательности CDR B16

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
B16-CDR1	YYAIG	9
B16-CDR2	CISSSDGSTYYADSVKG	10
	CISSSD <u>A</u> STYYADSVKG	41
	CISSS <u>E</u> GSTYYADSVKG	42
B16-CDR3	DTTTRCPIWSYYVESDY	11

Таблица 1C. Последовательности CDR B125

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
B125-CDR1	DYAIG	12
B125-CDR2	CISSSDGSTYYADSVKG	13
	CISSSD <u>A</u> STYYADSVKG	43
	CISSS <u>E</u> GSTYYADSVKG	44
B125-CDR3	DTTTRCPIWSYYVESDY	14

Таблица 1D. Последовательности CDR B164

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
B164-CDR1	SYMF	15
B164-CDR2	HITSGGRSTNYADSVTG	16
B164-CDR3	DDAVYTDRTY	17

Таблица 1E. Последовательности CDR B210

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
B210-CDR1	YYAIG	18
B210-CDR2	CISSSGRSTNYADSVKG	19
B210-CDR3	DTTTRCPIWSNYVESDY	20

Пример 2: Активность связывания с антигеном 4-1BB

[90] В этом примере тестировали активность связывания антител с белком 4-1BB.

2.1 Связывание с 4-1ВВ согласно ИФА

[91] Для оценки активности связывания клонов В31, В16, В125, В164 и В210 химерные МАТ из этих клонов подвергали ИФА вместе с урелумабом, референсным агонистическим антителом к 4-1ВВ.

[92] В общих чертах, планшеты для микротитрования покрывали белком 4-1ВВ-Нis человека при 0,5 мкг/мл в ФСБ, 100 мкл/лунку при 4°C в течение ночи, затем блокировали 150 мкл/лунку 1% БСА. В каждую лунку добавляли трехкратные разведения антител В31, В16, В125, В164, и В210, начиная с 3 мкг/мл, и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Планшеты промывали ФСБ/Tween и затем инкубировали с конъюгированным с пероксидазой антителом к человеческому IgG (Н&L) (КОЗЬЕ) в течение 30 минут при 37°C. После промывки планшеты проявляли с помощью субстрата ТМВ и анализировали с помощью спектрофотометра при ОП 450 нм. Как показано на **ФИГ. 1** и в **Таблице 2**, все эти клоны связывались с 4-1ВВ человека с высокой аффинностью.

[93] Планшеты для микротитрования покрывали белком 4-1ВВ-Нis яванского макака при 0,5 мкг/мл в ФСБ, 100 мкл/лунку при 4°C в течение ночи, затем блокировали 150 мкл/лунку 1% БСА. В каждую лунку добавляли трехкратные разведения антител В31, В16, В125, В164, и В210, начиная с 15 мкг/мл, и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Планшеты промывали ФСБ/Tween и затем инкубировали с конъюгированным с пероксидазой антителом к человеческому IgG (Н&L) (КОЗЬЕ) в течение 30 минут при 37°C. После промывки планшеты проявляли с помощью субстрата ТМВ и анализировали с помощью спектрофотометра при ОП 450 нм. Как показано на **ФИГ. 1** и в **Таблице 2** все эти клоны связывались с 4-1ВВ яванского макака с высокой аффинностью.

[94] Планшеты для микротитрования покрывали белком 4-1ВВ-Нis мыши при 0,5 мкг/мл в ФСБ, 100 мкл/лунку при 4°C в течение ночи, затем блокировали 150 мкл/лунку 1% БСА. В каждую лунку добавляли трехкратные разведения антител В31, В16, В125, В164 и В210, начиная с 15 мкг/мл, и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Планшеты промывали ФСБ/Tween и затем инкубировали с конъюгированным с пероксидазой антителом к человеческому IgG (Н&L) (КОЗЬЕ) в течение 30 минут при 37°C. После промывки планшеты проявляли с помощью субстрата ТМВ и анализировали с помощью спектрофотометра при ОП 450 нм. Как показано на **ФИГ. 1** и в **Таблице 2**, только В16, В125, В210 связывались с 4-1ВВ мыши.

Таблица 2. Межвидовая активность В31, В16, В125, В164, В210

	Человек	Яванский макак	Мышь
ЭК ₅₀ В31	2,415 нг/мл	4,063 нг/мл	--
ЭК ₅₀ В16	10,6 нг/мл	19,52 нг/мл	16,29 нг/мл
ЭК ₅₀ В125	2,055 нг/мл	3,543 нг/мл	4,424 нг/мл
ЭК ₅₀ В164	5,197 нг/мл	4,808 нг/мл	--
ЭК ₅₀ В210	2,514 нг/мл	3,911 нг/мл	401,8 нг/мл

--: Связывание отсутствует

2.2 Связывание с 4-1ВВ на клетках

[95] Чтобы оценить свойство связывания 4-1ВВ, биспецифичные антитела к CLDN18.2-4-1ВВ анализировали на их связывание с НЕК293, экспрессирующими 4-1ВВ, с помощью FACS. В общей сложности 1×10^5 клеток НЕК293-4-1ВВ в каждой лунке инкубировали с 4-кратно последовательно разведенными антителами, начиная со 100 нМ, в течение 30 минут при 4°C в буфере для FACS. После промывки буфером для FACS в каждую лунку добавляли конъюгированное с ФЭ антитело к человеческому IgG и инкубировали при 4°C в течение 30 минут. После промывки СИФ ФЭ оценивали с помощью MACSQuant Analyzer 16. Как показано на **ФИГ. 2**, протестированные биспецифичные антитела к CLDN18.2-4-1ВВ связывались с 4-1ВВ зависимым от концентрации образом.

2.3 Полная кинетика белка для 4-1ВВ

[96] Связывание антител В31, В16, В125, В164 и В210 с рекомбинантным белком 4-1ВВ (человеческий 4-1ВВ-his-метка) тестировали с помощью Вiascore, применяя способ захвата. МАТ В31, В16, В125, В164 и В210 захватывали с использованием чипа с белком А. Последовательное разведение человеческого белка 4-1ВВ-his-метка впрыскивали над захваченным антителом в течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин. Антигену позволяли диссоциировать в течение 360 с. Все эксперименты проводили на Вiascore Т200. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения для оценки Вiascore Т200. Результаты показаны на **ФИГ. 3** и в **Таблице 3** ниже.

Таблица 3: Полная кинетика, измеренная с помощью Вiascore

Антитела	4-1ВВ-His человека
-----------------	---------------------------

	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
B31	$1,52 \times 10^6$	$4,80 \times 10^{-3}$	$3,16 \times 10^{-9}$
B16	$3,43 \times 10^5$	$7,39 \times 10^{-3}$	$2,15 \times 10^{-8}$
B125	$3,90 \times 10^5$	$8,18 \times 10^{-3}$	$2,10 \times 10^{-8}$
B164	$1,04 \times 10^6$	$5,46 \times 10^{-4}$	$5,26 \times 10^{-10}$
B210	$3,89 \times 10^4$	$3,52 \times 10^{-3}$	$9,04 \times 10^{-8}$

2.4 Активность перекрестного связывания с OX40 и CD40

[97] Для оценки активности перекрестного связывания клонов B31, B16, B125, B164 и B210 с CD40 человека и OX40 человека химерные МАТ из этих клонов тестировали методом ИФА.

[98] В общих чертах, планшеты для микротитрования покрывали белком CD40 человека или белком OX40 человека при 0,5 мкг/мл в ФСБ, 100 мкл/лунку при 4°C в течение ночи, затем блокировали 150 мкл/лунку 1% БСА. В каждую лунку добавляли пятикратные разведения антител B31, B16, B125, B164, и B210, начиная с 3 мкг/мл, и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Планшеты промывали ФСБ/Tween и затем инкубировали с конъюгированным с пероксидазой антителом к человеческому IgG (H&L) (КОЗЬЕ) в течение 30 минут при 37°C. После промывки планшеты проявляли с помощью субстрата ТМВ и анализировали с помощью спектрофотометра при ОП 450 нм. Как показано на **ФИГ. 4**, все эти клоны не связываются перекрестно с CD40 человека или OX40 человека.

Пример 3. Функциональная активность нанотел к 4-1BB

[99] В данном примере тестировали функциональную активность антител, и показали, что в отличие от урелумаба антитела согласно настоящему изобретению не активировали передачу сигналов 4-1BB.

Определение функциональных характеристик моноклональных антител к 4-1BB на линии клеток

[100] Для оценки способности моноклональных антител к 4-1BB активировать сигнальный путь 4-1BB, использовали коммерческую репортерную систему на основе люциферазы 4-1BB NF-κB. В этом анализе НЕК-4-1BB NF-κB используют в качестве репортерной линии клеток. Линия клеток НЕК-4-1BB NF-κB генетически модифицирована для стабильной экспрессии 4-1BB и люциферазы по ходу транскрипции

от элемента ответа (Genomeditech, № по каталогу GM-C04832). Экспрессия люциферазы индуцируется при связывании антитела с рецептором 4-1BB. В общих чертах, репортерные клетки при плотности $2,5 \times 10^4$ клеток на лунку культивировали в белом 96-луночном планшете. Антитела последовательно разводили и добавляли в белый 96-луночный аналитический планшет при конечной концентрации в диапазоне от 150 нМ до 0,0000768 нМ для молекулы B31 и от 100 нМ до 0,000381 нМ для молекул B16, B125, B164 и B210. После 6-часовой инкубации при 37°C получали люминесценцию путем добавления субстрата люциферазы и измеряли с помощью считывающего устройства для микропланшетов. Анализ с использованием четырехпараметрической логистической кривой выполняли с помощью программного обеспечения GraphPad.

[101] Как показано на **ФИГ. 5**, моноклональное антитело урелумаб дозозависимо активировало передачу сигналов 4-1BB, в то время как антитела B31, B16, B125, B164 и B210 не усиливали индукцию 4-1BB в тех же экспериментальных условиях.

Пример 4. Функциональная активность биспецифичных антител к клаудину 18.2/4-1BB

[102] В этом примере создавали и тестировали биспецифичные антитела, которые включают нанотела к 4-1BB, а также обладают специфичностью в отношении клаудина 18.2.

4.1 Определение функциональных характеристик биспецифичного антитела к клаудину 18.2-4-1BB на линии клеток

[103] Для оценки способности созданных биспецифичных антител к клаудину 18.2/4-1BB активировать сигнальный путь 4-1BB использовали коммерческую репортерную систему на основе люциферазы 4-1BB NF-κB. В этом анализе в качестве эффекторных клеток использовали H_TNFRSF9(4-1BB) NF-κB-репортер Jurkat (Genomeditech, № по каталогу GM-C09468), и в качестве клеток-мишеней использовали CHO-K1, экспрессирующие клаудин 18.2 или не экспрессирующие его. Линия клеток H_TNFRSF9(4-1BB) NF-κB-репортер Jurkat генетически модифицирована для стабильной экспрессии 4-1BB и люциферазы по ходу транскрипции от элемента ответа. Экспрессия люциферазы индуцируется при связывании антитела с рецептором 4-1BB. В общих чертах, эффекторные клетки при плотности $2,5 \times 10^4$ клеток на лунку культивировали совместно с $2,5 \times 10^4$ клеток-мишеней (соотношение Э:М =1:1) в белом 96-луночном планшете. Антитела 4-кратно последовательно разводили и добавляли в белый 96-

луночный аналитический планшет в конечной концентрации в диапазоне от 100 нМ до 0,000381 нМ. После 6-часовой инкубации при 37°C люминесценцию получали путем добавления субстрата люциферазы и измеряли с помощью считывающего устройства для микропланшетов. Анализ с использованием четырехпараметрической логистической кривой выполняли с помощью программного обеспечения GraphPad.

[104] Как показано на **ФИГ. 6**, моноклональное антитело урелумаб может дозозависимо усиливать передачу сигналов 4-1BB как в клетках CHO-K1, так и в клетках CHO, сверхэкспрессирующих клаудин 18.2. Тогда как активность биспецифичных антител к клаудину 18.2/4-1BB B31-BiAb, B16-BiAb, B125-BiAb, B164-BiAb и B210-BiAb зависела от экспрессии клаудина 18.2 на клетках.

4.2 Активность биспецифичных антител по стимулированию иммунного ответа мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК)

[105] Чтобы изучить способность биспецифичных антител к клаудину 18.2/4-1BB стимулировать ответ человеческих МКПК, исследовали высвобождение цитокина IL-2 с помощью набора для обнаружения LANCE Ultra TR-FRET. В качестве эффекторных клеток использовали человеческие МКПК, стимулированные 0,5 мкг/мл человеческого антитела к CD3. CHO-K1, экспрессирующие клаудин 18.2, использовали в качестве клеток-мишеней. Человеческие МКПК (1×10^5) культивировали совместно с клетками CHO-K1-клаудин 18.2 или исходными клетками CHO-K1 ($2,5 \times 10^4$) (соотношение Э:М =4:1) в присутствии человеческого антитела к CD3. 5-кратно последовательно разведенные биспецифичные антитела добавляли к культуральной среде в конечной концентрации, начинающейся со 100 нМ. Через 48 часов уровень секреции IL-2 в культуральной среде измеряли с использованием набора для обнаружения IL-2 (человеческого) LANCE Ultra TR-FRET (PerkinElmer). Как показано на **ФИГ. 7**, биспецифичные антитела могли активировать ответ МКПК только в присутствии клеток, сверхэкспрессирующих клаудин 18.2.

Пример 5. Гуманизация VHH антител B31/B125/B16/B210

[106] Гены переменных областей B31/B125/B16/B210 применяли для создания гуманизированных МАТ. На первом этапе этого способа аминокислотные последовательности VHH B31/B125/B16/B210 сравнивали с доступной базой данных последовательностей генов Ig человека, чтобы найти наиболее совпадающие последовательности генов зародышевой линии Ig человека. Затем разработали

гуманизированные последовательности переменных доменов B31/B125/B16/B210, в которых CDRH1, H2, и H3 были привиты на каркасные последовательности гена VH.

[107] Аминокислотные и нуклеотидные последовательности некоторых гуманизированных антител перечислены в **Таблице 4** ниже.

Таблица 4А. Последовательности гуманизированных антител B31 (подчеркивание указывает на CDR; жирным/курсивным шрифтом указаны обратные мутации)

B31	Последовательность	SEQ ID NO:
VHH	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGDIF <u>SIMFWY</u> RQPQGKQREYVAHITSNGRTNYADSVTGRFTISRG NNDNTMYLQMDNLKPQDTAVYYCA <u>ADDATNTRT</u> <u>YWGQGTQVTVSS</u>	1
VHH-V2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGDIF <u>SIMFWYR</u> QAPGK QREYV SHITSNGRTNYADSVTGRFTISRDN S KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA <u>ADDATNTRTYW</u> GQGTLLVTVSS	21
VHH-V3	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDIF <u>SIMFWYR</u> QAPGK QREYVA HITSNGRTNYADSVTGRFTISRDN MKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA <u>ADDATNTRTY</u> WGQGTLLVTVSS	22
VHH-V4	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDIF <u>SIMFWYR</u> QAPGK QREYVA HITSNGRTNYADSVTGRFTISRDN S KNTMYLQMD SL RAEDTAVYYCA <u>ADDATNTRTYW</u> GQGTLLVTVSS	23
VHH-V5	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDIF <u>SIMFWYR</u> QPQ GK QREYVA HITSNGRTNYADSVTGRFTISRDN MKNTLYLQMD SL RAEDTAVYYCA <u>ADDATNTRTY</u> WGQGTLLVTVSS	24
VHH-V6	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGDIF <u>SIMFWYR</u> QAPGK QREYVA HITSNGRTNYADSVTGRFTISRDN S KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA <u>ADDATNTRTYW</u> GQGTLLVTVSS	25

Таблица 4В. Последовательности гуманизированных антител B125 (подчеркивание указывает на CDR; жирным/курсивным шрифтом указаны обратные мутации)

B125	Последовательность	SEQ ID NO:
VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF AFSDYAIG WFRQAPGKEREGV SC ISSSDGSTYYADSVKGRFTIS	3

	<u>RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCATDTTTRCPI</u> <u>WSYYVESDYWGQGTQVTVSS</u>	
VHH-V1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDYAIG WVRQAPGKGLEWVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDTTTRCP <u>IWSYYVESDYWGQGLTVTVSS</u>	26
VHH-V2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDYAIG <i>WFRQAPGKEREGV</i> SCISSSDGSTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA <u>TDTTTRCPI</u> <u>WSYYVESDYWGQGLTVTVSS</u>	27
VHH-V3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDYAIG <i>WFRQAPGKEREGV</i> SCISSSDGSTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDTTTRCPI <u>WSYYVESDYWGQGLTVTVSS</u>	28
VHH-V4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDYAIG <i>WFRQAPGKEREGV</i> SCISSSDGSTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA <u>TDTTTRCPI</u> <u>WSYYVESDYWGQGLTVTVSS</u>	29
VHH-V5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDYAIG <i>WFRQAPGKEREGV</i> SCISSSDGSTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMNSLR <u>PEDTAVYYCA</u> <u>TDTTTRCPI</u> <u>WSYYVESDYWGQGLTVTVSS</u>	30

Таблица 4С. Последовательности гуманизированных антител B16 (подчеркивание указывает на CDR; жирным/курсивным шрифтом указаны обратные мутации)

B16	Последовательность	SEQ ID NO:
VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIG WVRQAPGKEREGVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCATDTTTRCPI <u>WSYYVESDYWGQGTQVTVSS</u>	2
VHH-V1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYAIG WVRQAPGKGLEWVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDTTTRCP <u>IWSYYVESDYWGQGLTVTVSS</u>	31
VHH-V2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYAIG <i>WFRQAPGKEREGV</i> SCISSSDGSTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA <u>TDTTTRCPI</u> <u>WSYYVESDYWGQGLTVTVSS</u>	32
VHH-V3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIG <i>WFRQAPGKEREGV</i> SCISSSDGSTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA <u>TDTTTRCPI</u> <u>WSYYVESDYWGQGLTVTVSS</u>	33
VHH-V4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIG	34

	WFRQAPGKEREGVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCATDTTTRCPI WSYYVESDYWGQGLVTVSS	
--	--	--

Таблица 4D. Последовательности гуманизированных антител B210 (подчеркивание указывает на CDR; жирным/курсивным шрифтом указаны обратные мутации)

B210	Последовательность	SEQ ID NO:
VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLSLDYYAIG WFRQAPGKEREGVSCISSGRSTNYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTADYYCATDTTTRCPI WSNYVESDYWGQGTQVTVSS	5
VHH-V1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYAIG WVRQAPGKGLEWVSCISSGRSTNYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDTTTRCPI WSNYVESDYWGQGLVTVSS	35
VHH-V2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYAIG WFRQAPGKEREGVSCISSGRSTNYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDTTTRCPI WSNYVESDYWGQGLVTVSS	36
VHH-V3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSYYAIG WFRQAPGKEREGVSCISSGRSTNYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDTTTRCPI WSNYVESDYWGQGLVTVSS	37
VHH-V4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTLSYYAIG WFRQAPGKEREGVSCISSGRSTNYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTADYYCATDTTTRCPI WSNYVESDYWGQGLVTVSS	38

[108] Обратные мутации B31 включают 23A, 37Y, 40P, 41Q, 44Q, 45R, 49A, 74N, 78M, 82(82A)D и 94A. Более конкретно, VHH-v2 включал обратные мутации 37Y, 44Q, 45R и 94A; VHH-v3 включал обратные мутации 23A, 37Y, 44Q, 45R, 49A, 74N и 94A; VHH-v4 включал обратные мутации 23A, 37Y, 44Q, 45R, 49A, 78M, 82(82A)D и 94A; VHH-v5 включал обратные мутации 23A, 37Y, 40P, 41Q, 44Q, 45R, 49A, 74N, 82(82A)D и 94A; и VHH-v6 включал обратные мутации 37Y, 44Q, 45R и 49A.

[109] Обратные мутации B16 включают 29L, 30D, 37F, 44E, 45R, 47G, 74A, 84P и 94T. Более конкретно, VHH-v2 включал обратные мутации 37F, 44E, 45R, 47G и 94T; VHH-v3 включал обратные мутации 29L, 30D, 37F, 44E, 45R, 47G и 94T; VHH-v4 включал обратные мутации 29L, 30D, 37F, 44E, 45R, 47G, 74A, 84P и 94T.

[110] Обратные мутации В125 включают 37F, 43K, 44E, 45R, 47G, 74A, 84P и 94T. Более конкретно, VHH-v2 включал обратные мутации 37F, 44E, 45R, 47G и 94T; VHH-v3 включал обратные мутации 37F, 43K, 44E, 45R, 47G и 74A; VHH-v4 включал обратные мутации 37F, 43K, 44E, 45R, 47G, 74A и 94T; VHH-v5 включал обратные мутации 37F, 43K, 44E, 45R, 47G, 74A, 84P и 94T.

[111] Обратные мутации В210 включают 27L, 29L, 37F, 44E, 45R, 47G, 89D и 94T. Более конкретно, VHH-v2 включал обратные мутации 37F, 44E, 45R, 47G и 94T; VHH-v3 включал обратные мутации 27L, 37F, 44E, 45R, 47G и 94T; VHH-v4 включал обратные мутации 27L, 29L, 37F, 44E, 45R, 47G и 94T; VHH-v5 включал обратные мутации 27L, 29L, 37F, 44E, 45R, 47G, 89D и 94T.

[112] Гены гуманизованных VHH клонировали в векторы pCDNA3.4 и трансфицировали в клетки 293F для дальнейшего анализа.

Пример 6: Антигенсвязывающие свойства гуманизованных антител

Полная кинетика при определении аффинности гуманизованных антител с помощью Biacore

[113] Связывание гуманизованных антител с рекомбинантным белком 4-1BB человека (человеческий 4-1BB-his-метка) тестировали с помощью Biacore, применяя способ захвата. В31-V2, В31-V3, В31-V4, В31-V5 и В31-V6 захватывали с использованием чипа с белком А. Последовательное разведение человеческого белка 4-1BB-his-метка впрыскивали над захваченным антителом в течение 30 с при скорости потока 10 мкл/мин. Антигену позволяли диссоциировать в течение 360 с. Все эксперименты проводили на Biacore T200. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения для оценки Biacore T200, и результаты показаны в **Таблице 5** ниже. Все гуманизованные антитела проявляли сильное связывание.

Таблица 5 *Полная кинетика согласно Biacore*

Антитела	4-1BB-His		
	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)
В31-V2	$5,17 \times 10^5$	$6,80 \times 10^{-3}$	$1,31 \times 10^{-8}$
В31-V3	$5,26 \times 10^5$	$7,16 \times 10^{-3}$	$1,36 \times 10^{-8}$
В31-V4	$1,15 \times 10^6$	$5,45 \times 10^{-3}$	$4,74 \times 10^{-9}$
В31-V5	$1,30 \times 10^6$	$6,46 \times 10^{-3}$	$4,97 \times 10^{-9}$
В31-V6	$2,37 \times 10^5$	$1,56 \times 10^{-3}$	$6,58 \times 10^{-9}$

B125-V2	$8,67 \times 10^3$	$2,66 \times 10^{-2}$	$3,07 \times 10^{-6}$
B16-V2	$4,65 \times 10^4$	$8,98 \times 10^{-2}$	$1,93 \times 10^{-6}$
B210-V2	$5,37 \times 10^4$	$4,10 \times 10^{-2}$	$7,65 \times 10^{-7}$
B210-V3	$1,59 \times 10^4$	$4,08 \times 10^{-2}$	$2,56 \times 10^{-6}$

Пример 7. Функциональная активность гуманизированных биспецифичных антител

[114] Биспецифичные антитела к клаудину 18.2/4-1BB получали с гуманизированными нанотелами к 4-1BB и тестировали в данном примере.

7.1 Определение функциональных характеристик гуманизированных биспецифичных антител к клаудину 18.2-4-1BB на линии клеток

[115] Чтобы оценить способность гуманизированных биспецифичных антител к клаудину 18.2-4-1BB активировать сигнальный путь 4-1BB, использовали коммерческую репортерную систему на основе люциферазы 4-1BB NF-κB. В этом анализе в качестве эффекторных клеток использовали H_TNFRSF9(4-1BB) NFκB-репортер Jurkat (Genomeditech, № по каталогу GM-C09468), и в качестве клеток-мишеней использовали CHO-K1, экспрессирующие клаудин 18.2 или не экспрессирующие его. Линия клеток H_TNFRSF9(4-1BB) NFκB-репортер Jurkat генетически модифицирована для стабильной экспрессии 4-1BB и люциферазы по ходу транскрипции от элемента ответа. Экспрессия люциферазы индуцируется при связывании антитела с рецептором 4-1BB. В общих чертах, эффекторные клетки при плотности $2,5 \times 10^4$ клеток на лунку культивировали совместно с $2,5 \times 10^4$ клеток-мишеней (соотношение Э:М =1:1) в белом 96-луночном планшете. Антитела 3-кратно последовательно разводили и добавляли в белый 96-луночный аналитический планшет в конечной концентрации в диапазоне от 100 нМ до 0,005 нМ. После 6-часовой инкубации при 37°C люминесценцию получали путем добавления субстрата люциферазы и измеряли с помощью считывающего устройства для микропланшетов. Анализ с использованием четырехпараметрической логистической кривой выполняли с помощью программного обеспечения GraphPad.

[116] Как показано на **ФИГ. 8**, активность гуманизированных биспецифичных антител к клаудину 18.2/4-1BB была сопоставима с активностью химерного антитела B31.

7.2 Активность гуманизированных биспецифичных антител по стимулированию иммунного ответа мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК)

[117] Чтобы изучить способность гуманизированных биспецифичных антител к клаудину 18.2/4-1BB стимулировать ответ человеческих МКПК, исследовали высвобождение цитокина IL-2 с помощью набора для обнаружения LANCE Ultra TR-FRET. В качестве эффекторных клеток использовали человеческие МКПК, стимулированные 0,5 мкг/мл человеческого антитела к CD3. CHO-K1, экспрессирующие клаудин 18.2, использовали в качестве клеток-мишеней. Человеческие МКПК (1×10^5) культивировали совместно с клетками CHO-K1-клаудин 18.2 или исходными клетками CHO-K1 ($2,5 \times 10^4$) (соотношение Э:М = 4:1) в присутствии человеческого антитела к CD3. 5-кратно последовательно разведенные гуманизированные биспецифичные антитела добавляли к культуральной среде в конечной концентрации, начинающейся со 100 нМ. Через 48 часов уровень секреции IL-2 в культуральной среде измеряли с использованием набора для обнаружения IL-2 (человеческого) LANCE Ultra TR-FRET (PerkinElmer). Как показано на **ФИГ. 9**, секреция IL-2, индуцированная гуманизированными биспецифичными антителами, была сопоставима с секрецией химерным антителом B31.

Пример 8. Ингибирование роста опухоли биспецифичными антителами к клаудину 18.2/4-1BB

[118] В этом примере гуманизированных мышей, экспрессирующих внеклеточный домен 4-1BB человека, использовали для тестирования активности биспецифичных антител по ингибированию роста опухоли.

[119] Клетки аденокарциномы толстой кишки мыши (MC38) генетически модифицировали для экспрессии CLDN18.2 человека. Гуманизированным мышам (h4-1BB) подкожно имплантировали клетки MC38-hCLDN18.2. Мышам внутрибрюшинно вводили раз в неделю 3 раза следующие антитела: контрольный ФСБ (1 мг/кг), урелумаб (0,85 мг/кг), биспецифичное антитело B31 к CLDN18.2/4-1BB (1 мг/кг), биспецифичное антитело B16 к CLDN18.2/4-1BB (1 мг/кг), биспецифичное антитело B125 к CLDN18.2/4-1BB (1 мг/кг), биспецифичное антитело B164 к CLDN18.2/4-1BB (1 мг/кг), биспецифичное антитело B210 к CLDN18.2/4-1BB (1 мг/кг). Объемы опухоли контролировали с помощью измерений штангенциркулем два раза в неделю на протяжении эксперимента. Как показано на **ФИГ. 10**, урелумаб, B31, B16, B125, B164 и B210 все могут подавлять рост опухоли с TG1 от 62,4% до 96,9%.

Группа	TGI (%)
Урелумаб	68,5%
B31	96,9%
B16	93,6%
B125	68,5%
B164	97,1%
B210	78,9%

* * *

[120] Настоящее изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными описанными вариантами реализации, которые предназначены для единичного иллюстрирования отдельных аспектов настоящего изобретения, и любые композиции или способы, которые функционально эквивалентны, входят в объем настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что способы и композиции согласно настоящему изобретению могут быть подвергнуты различным модификациям и вариациям без отклонения от сущности или объема изобретения. Таким образом, подразумевается, что настоящее изобретение охватывает его модификации и вариации при условии, что они входят в объем прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов.

[121] Все публикации и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретным и индивидуальным образом включена посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Однодоменное антитело или полипептид, содержащий однодоменное антитело, отличающийся тем, что указанное однодоменное антитело способно специфично связываться с белком 4-1BB человека и содержит определяющий комплементарность участок 1 (CDR1), CDR2 и CDR3, причем:

(a) указанный CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, указанный CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, 39 или 40 и указанный CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8;

(b) указанный CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, указанный CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, 41 или 42 и указанный CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11;

(c) указанный CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, указанный CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, 43 или 44 и указанный CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14;

(d) указанный CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, указанный CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16 и указанный CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17; или

(e) указанный CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18, указанный CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19 и указанный CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

2. Антитело или полипептид по п. 1, отличающийся тем, что указанный CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, указанный CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, 39 или 40 и указанный CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

3. Антитело или полипептид по п. 2, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1 и 21-25.

4. Антитело или полипептид по п. 1, отличающийся тем, что указанный CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, указанный CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, 41 или 42 и указанный CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11.

5. Антитело или полипептид по п. 4, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1 и 31-34.

6. Антитело или полипептид по п. 1, отличающийся тем, что указанный CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, указанный CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, 43 или 44 и указанный CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

7. Антитело или полипептид по п. 6, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:3 и 26-30.

8. Антитело или полипептид по п. 1, отличающийся тем, что указанный CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, указанный CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16 и указанный CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17.

9. Антитело или полипептид по п. 8, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4.

10. Антитело или полипептид по п. 1, отличающийся тем, что указанный CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18, указанный CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19 и указанный CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

11. Антитело или полипептид по п. 10, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:5 и 35-38.

12. Антитело или полипептид по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что указанный полипептид представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR) или биспецифичное антитело, способное специфично связываться с антигеном, отличным от 4-1BB.

13. Биспецифичное антитело, содержащее антитело по любому из пп. 1-11 и второе антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способный специфично связываться с антигеном-мишенью, который не является 4-1BB.

14. Биспецифичное антитело по п. 13, отличающееся тем, что указанный антиген-мишень выбран из группы, состоящей из клаудина 18.2, EGFR, Her2, EpCAM, CD20, CD30, CD33, CD47, CD52, CD133, CD73, CEA, gpA33, муцинов, TAG-72, CIX, PSMA, связывающего фолат белка, GD2, GD3, GM2, VEGF, VEGFR, интегрина, $\alpha V\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, ERBB2, ERBB3, MET, IGF1R, EphA3, TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP и тенасцина.

15. Полинуклеотид, кодирующий антитело или полипептид по любому из пп. 1-14.

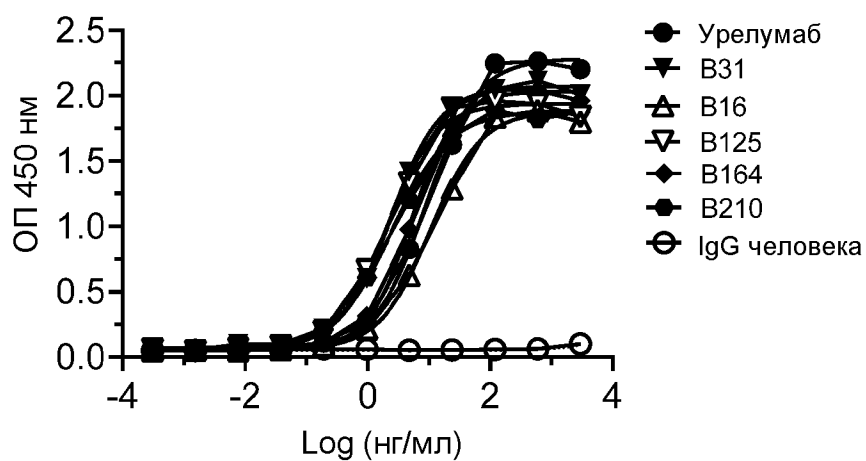
16. Клетка, содержащая полинуклеотид по п. 15.

17. Композиция, содержащая антитело или полипептид по любому из пп. 1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

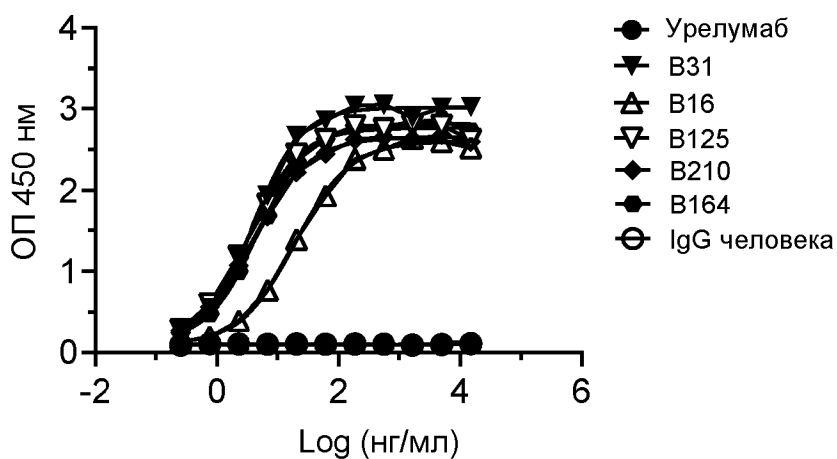
18. Способ лечения рака у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту эффективного количества антитела или полипептида по любому из пп. 1-14.

19. Применение антитела или полипептида по любому из пп. 1-14 для получения лекарственного средства для лечения рака.

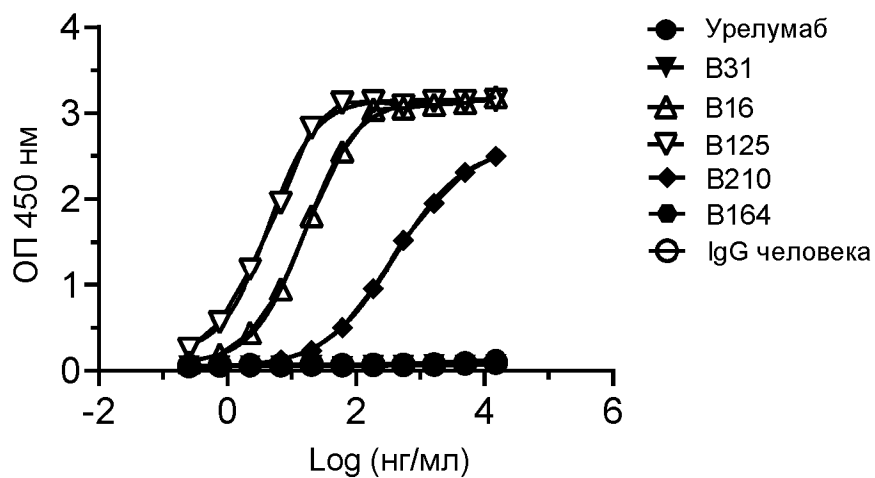
ИФА 4-1ВВ человека



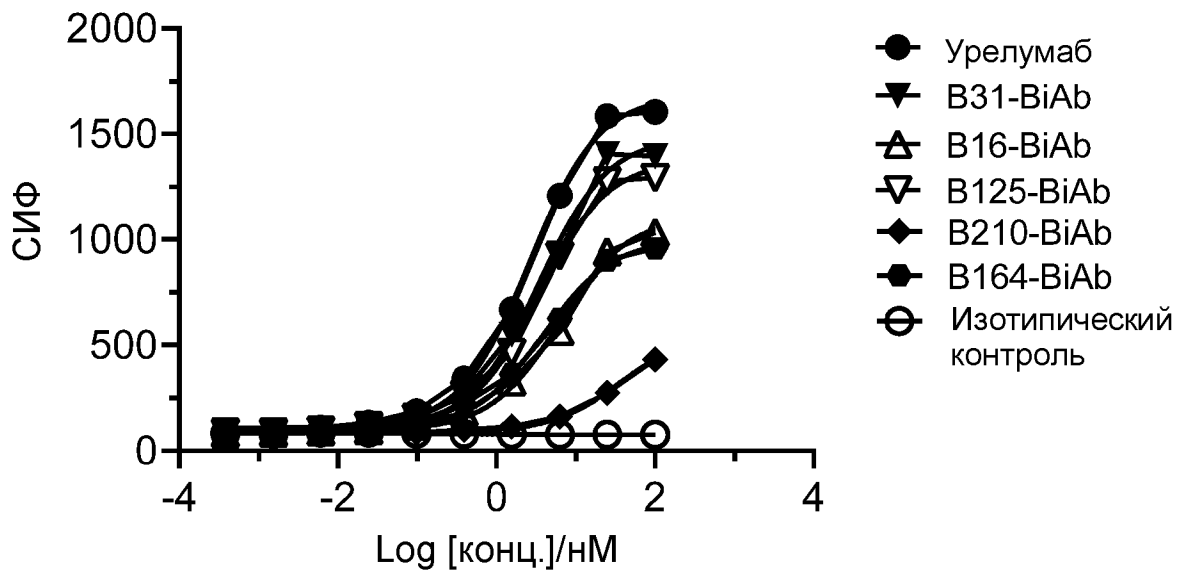
ИФА 4-1ВВ яванского макака



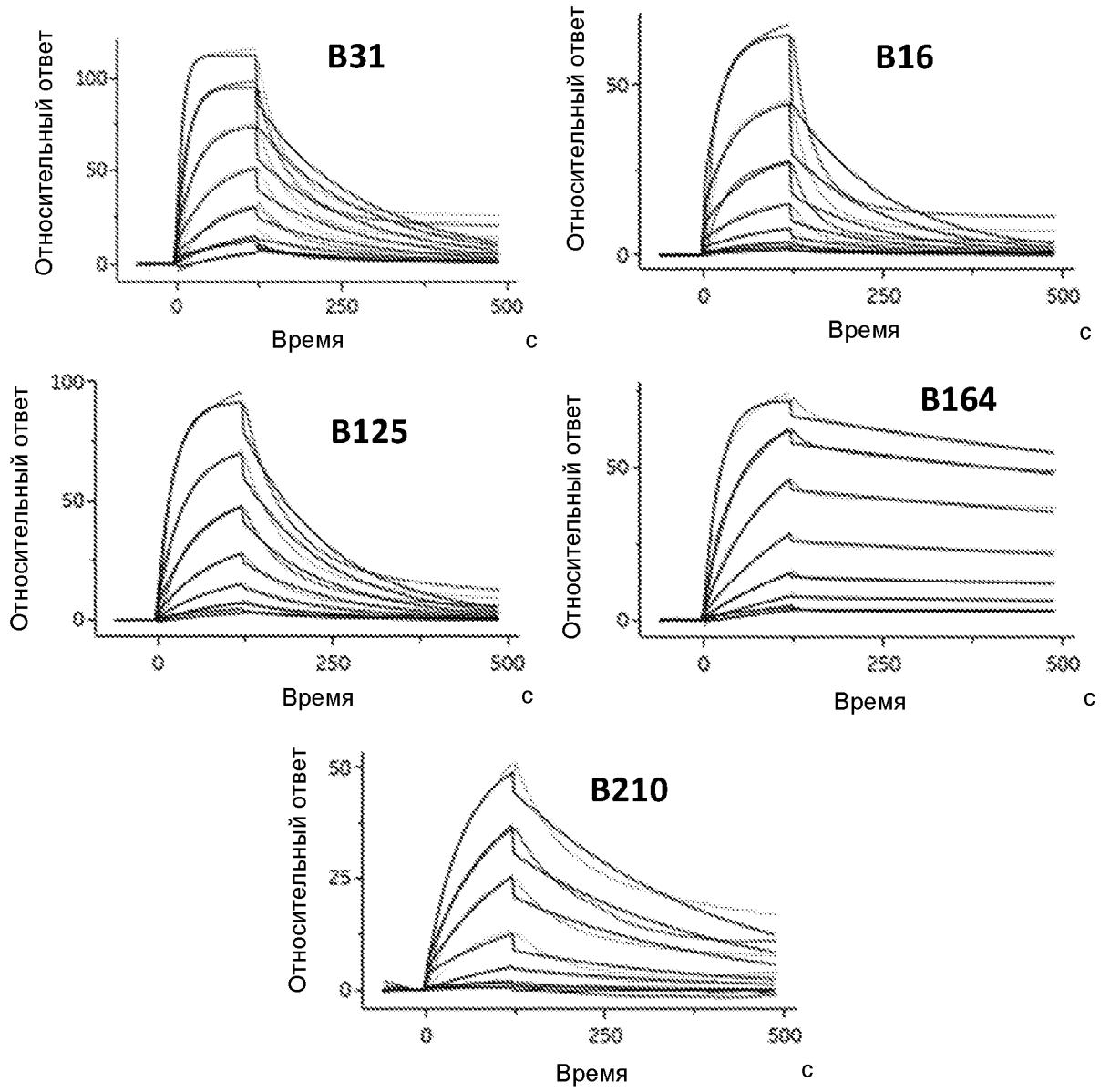
ИФА 4-1ВВ мыши



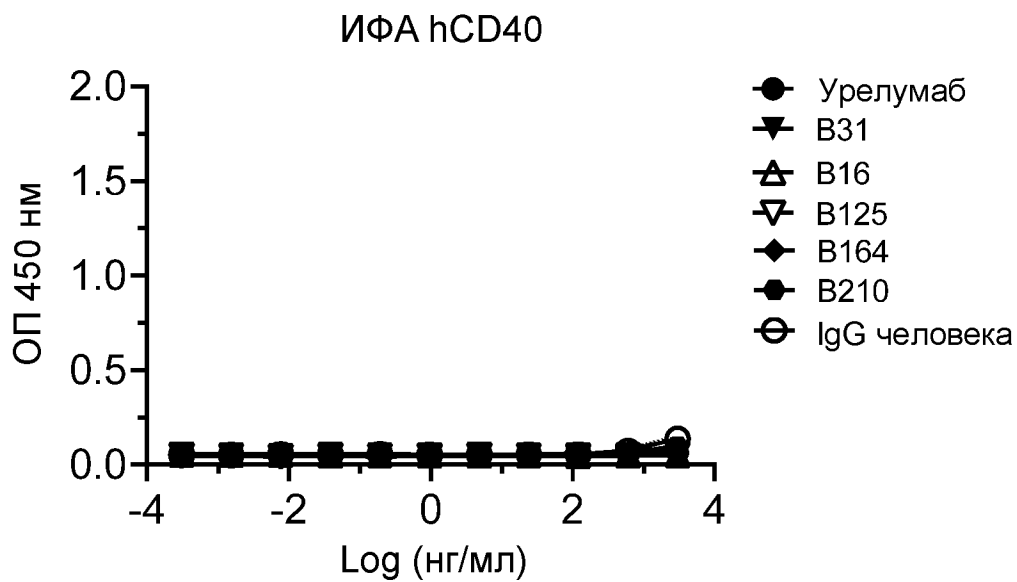
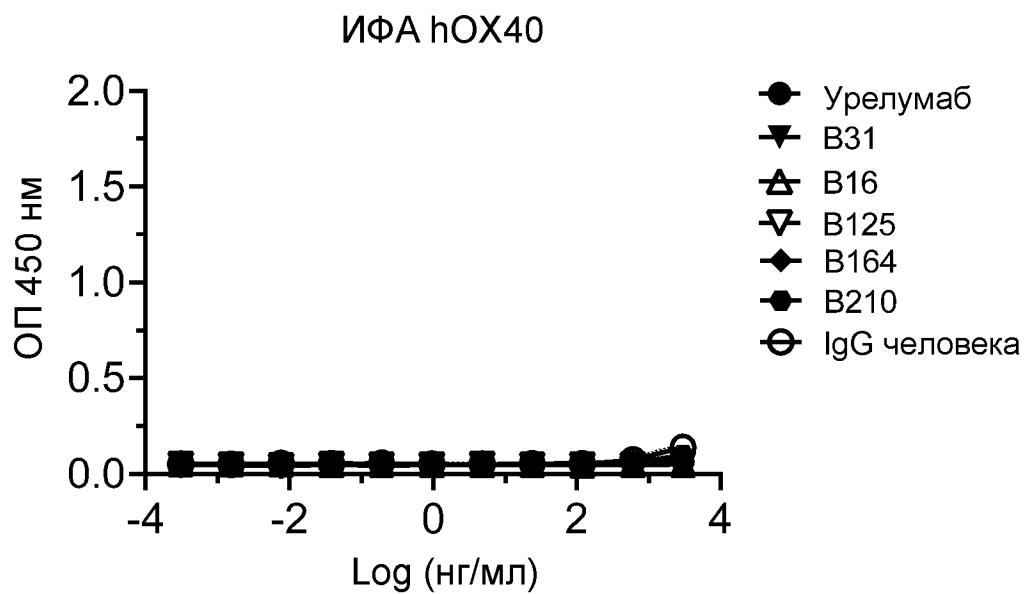
ФИГ. 1



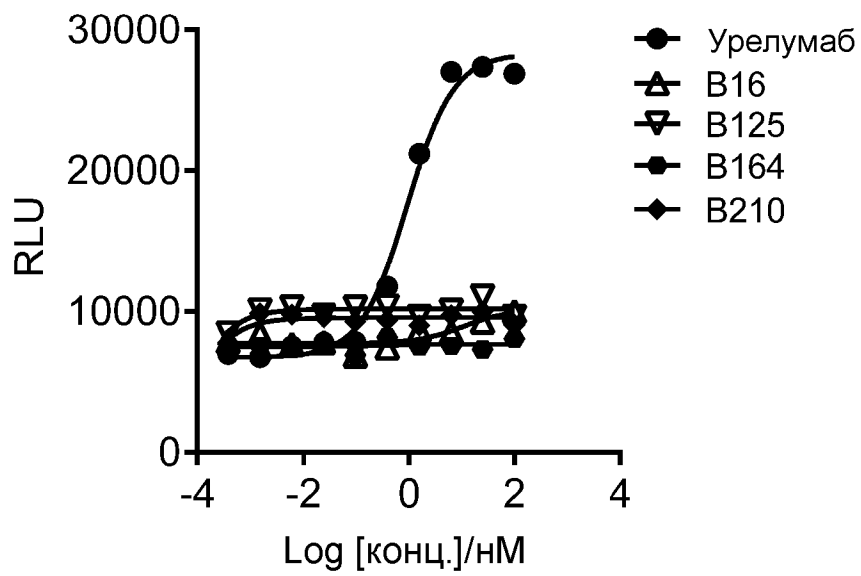
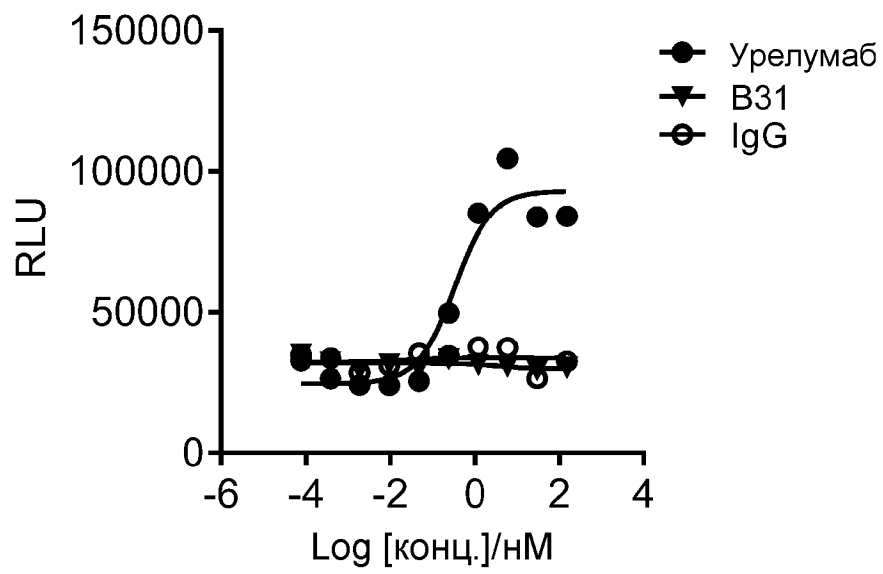
ФИГ. 2



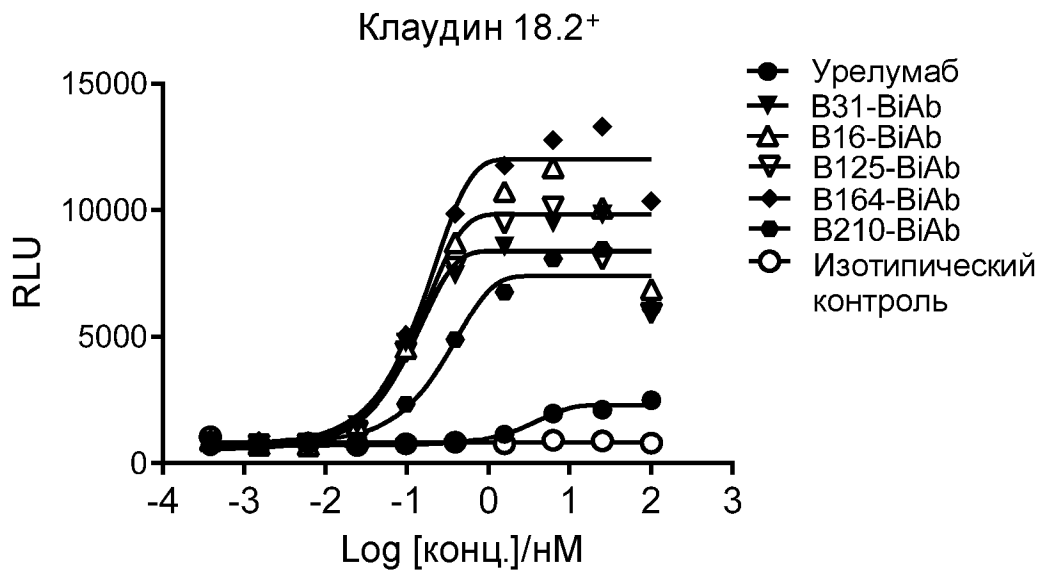
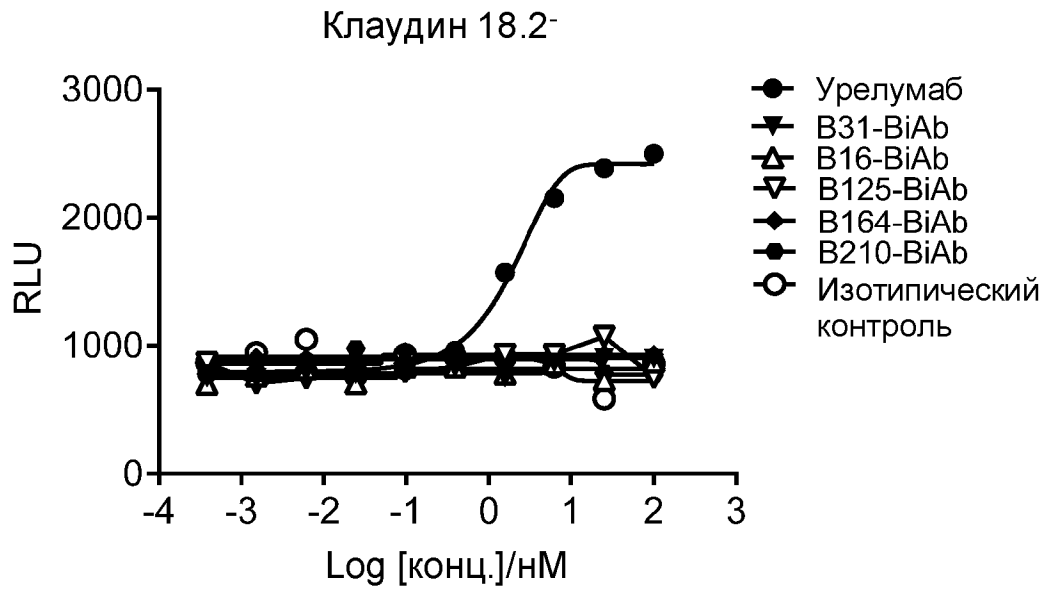
ФИГ. 3



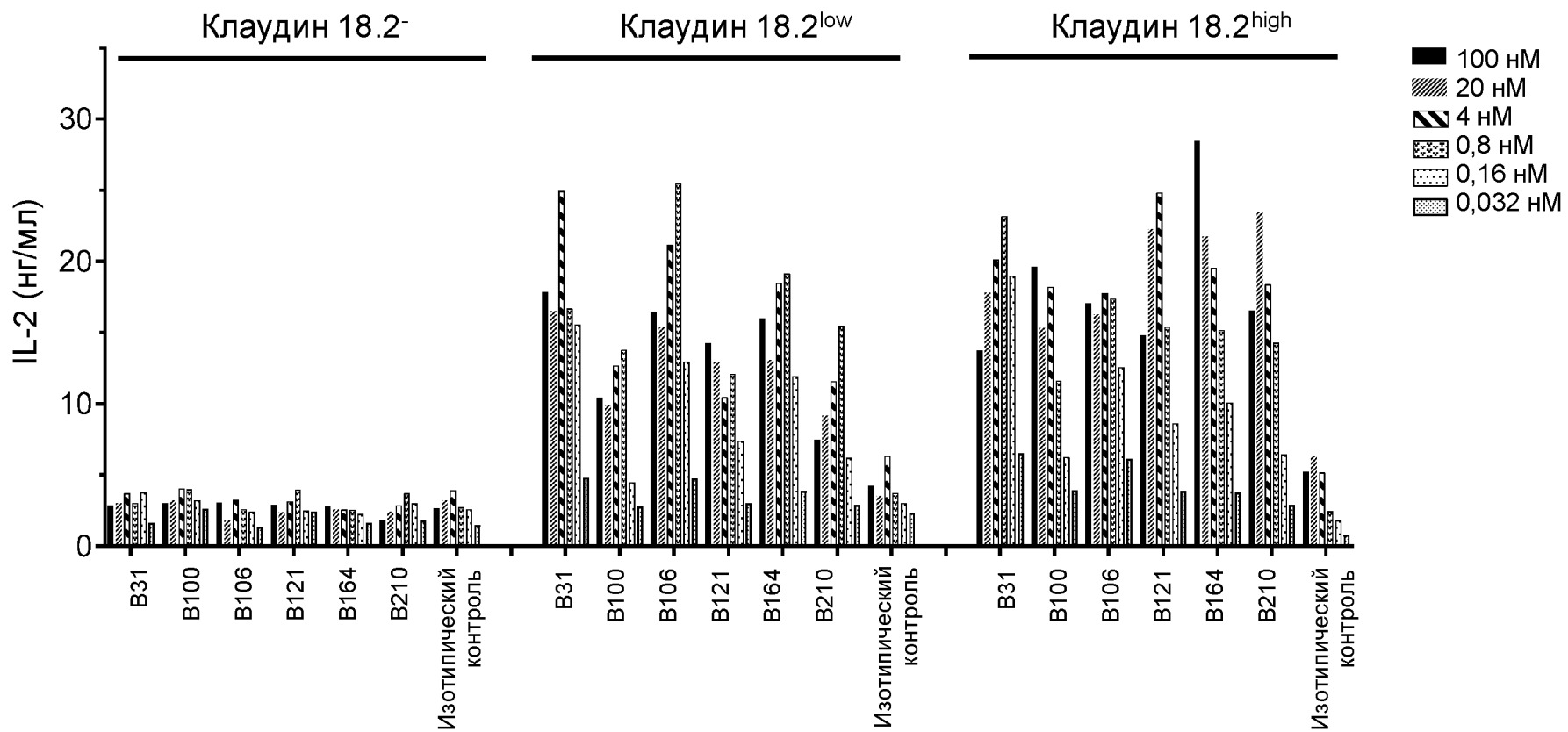
ФИГ. 4



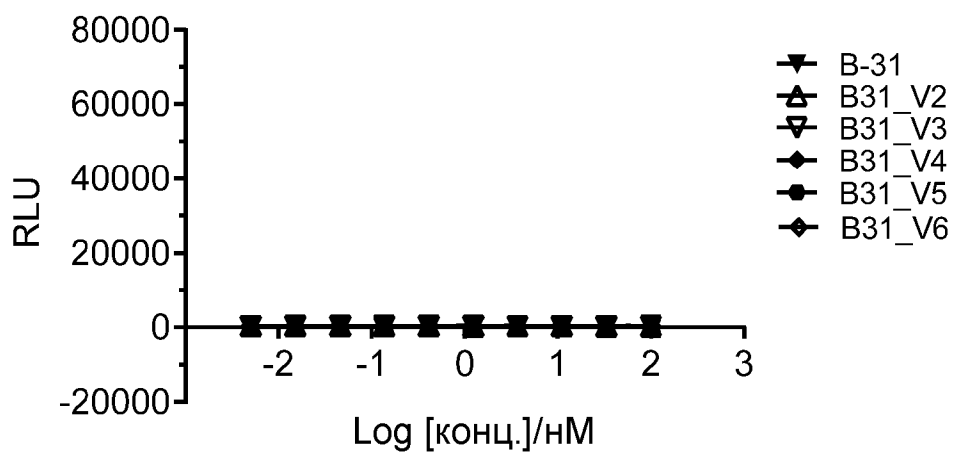
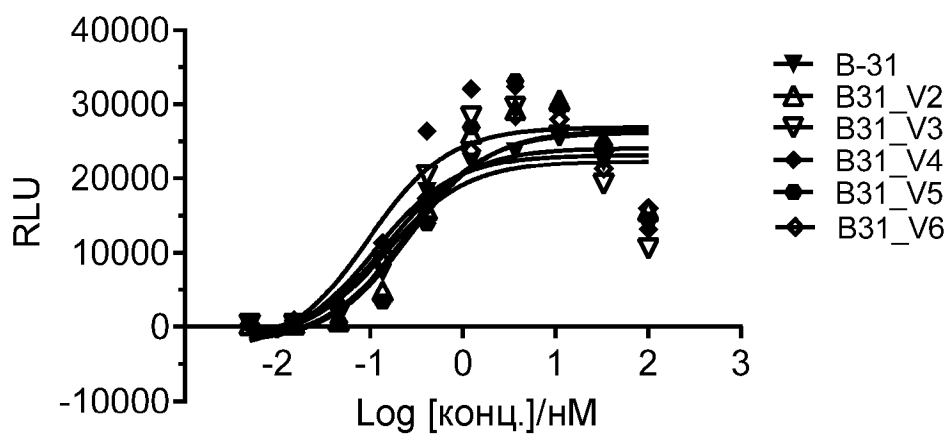
ФИГ. 5



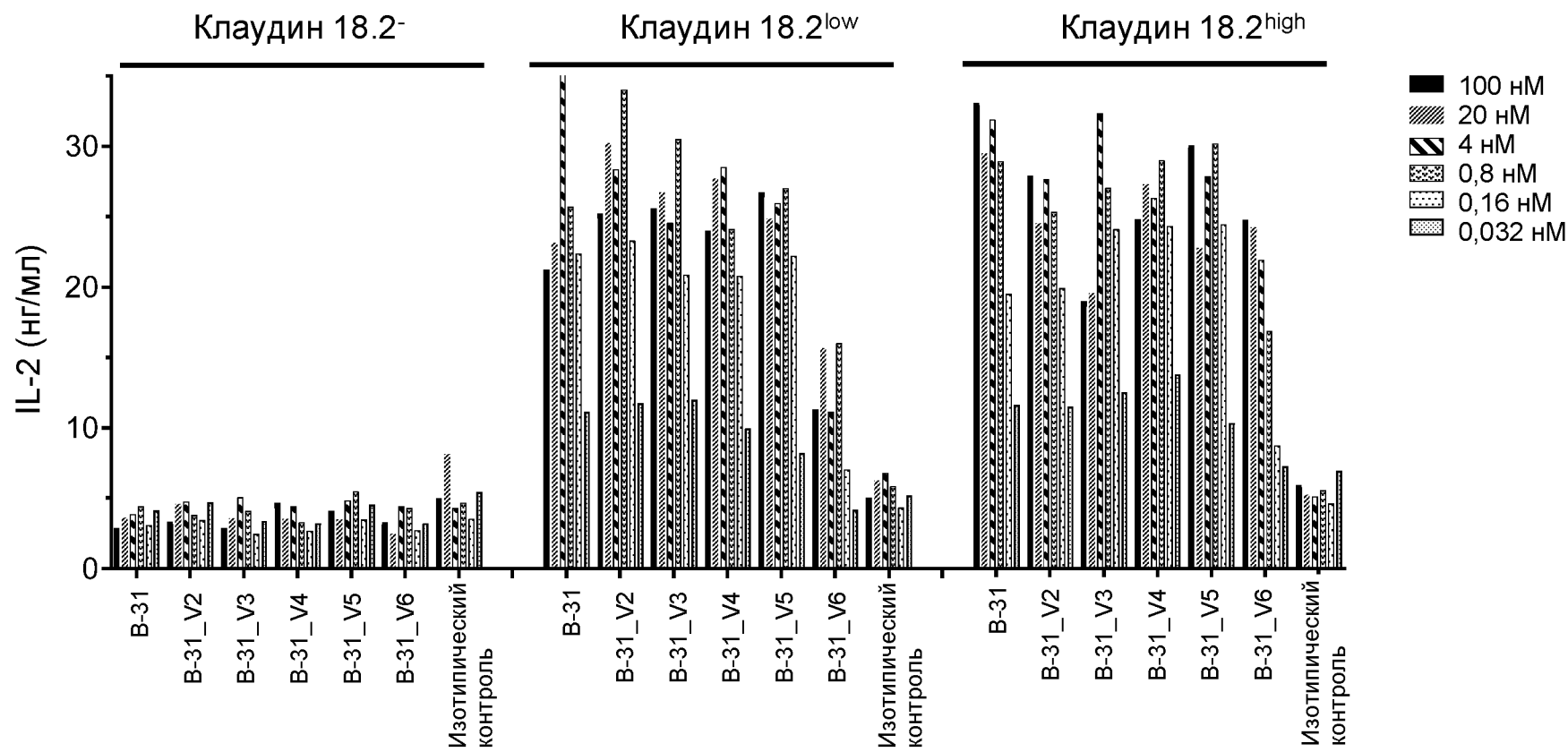
ФИГ. 6



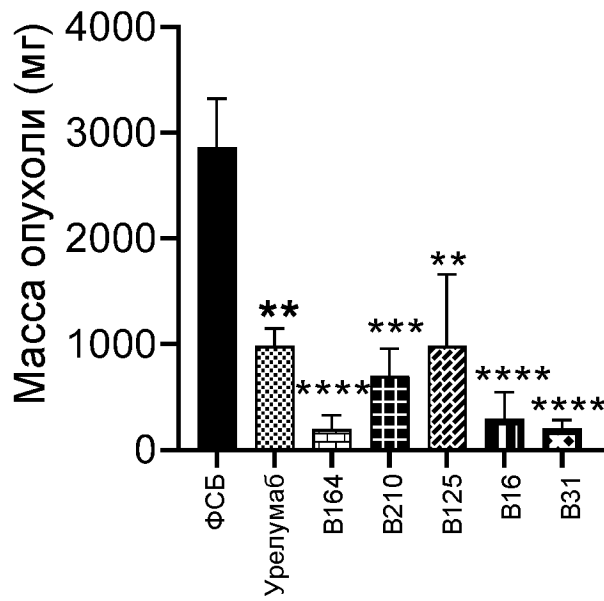
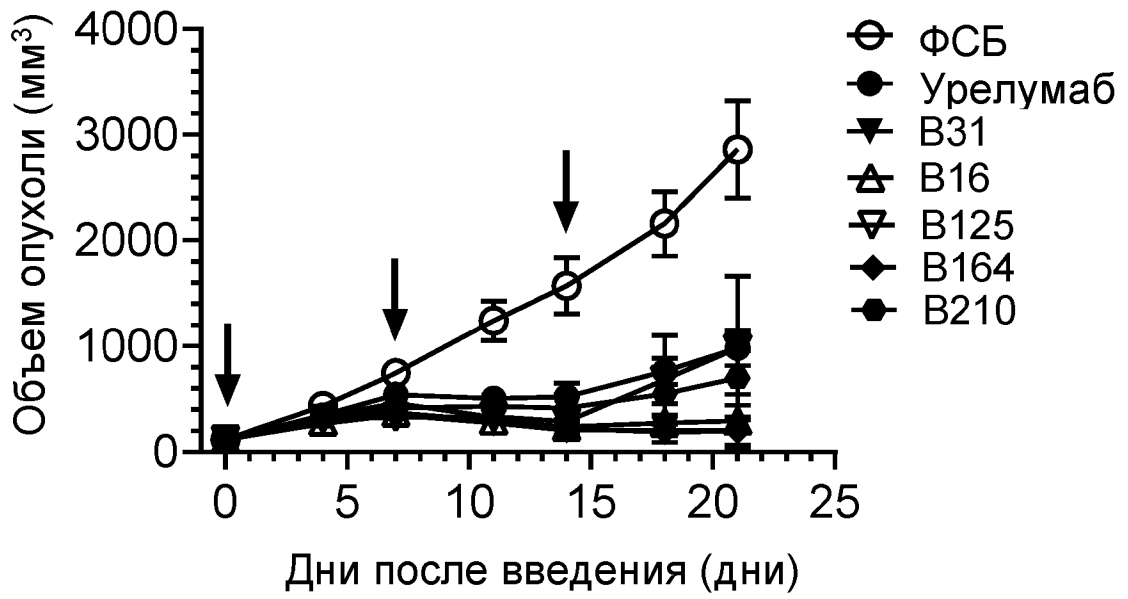
ФИГ. 7

Клаудин 18.2⁻Клаудин 18.2⁺

ФИГ. 8



ФИГ. 9



ФИГ. 10