

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490852 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.07.16

(51) Int. Cl. A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.10.05

(54) ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ АГЕНТЫ ПРОТИВ PD-L1 И CD137 В КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ

(31) 63/253,106; 63/257,901

(32) 2021.10.06; 2021.10.20

(33) US

(86) PCT/EP2022/077749

(87) WO 2023/057535 2023.04.13

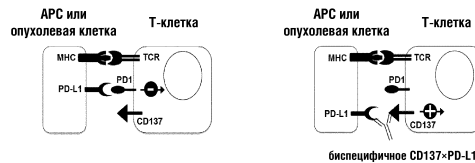
(71) Заявитель:
ДЖЕНМЭБ А/С (DK); БАЙОНТЕК
СЕ (DE); МСД ИНТЕРНЭШНЛ
БИЗНЕС ГМБХ (CN)

(72) Изобретатель:
Муик Александер, Нюрмбергер
Кристина (DE), Пенчева Нора (NL),
Юре-Кункель Мария Н. (US), Захин
Угур (DE)

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

(57) Настоящее изобретение относится к комбинированной терапии с использованием связывающего агента, который связывается с PD-L1 человека и CD137 человека в комбинации с пембролизумабом для уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли или лечения злокачественного новообразования.

А. PD1-опосредованное ингибирование Т-клеток В. PD-L1-блокада + стимуляция Т-клеток



202490852

A1

A1

202490852

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580957EA/022

ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ АГЕНТЫ ПРОТИВ PD-L1 И CD137 В КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ

Область техники

Настоящее изобретение относится к комбинированной терапии с использованием связывающего агента, который связывается с PD-L1 человека и CD137 человека, в комбинации с пембролизумабом для уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли или лечения злокачественного новообразования.

Уровень техники

CD137 (4-1BB) является членом семейства TNFR и костимулирующей молекулой на CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетках, регуляторных Т-клетках (Treg), Т-клетках-натуральных киллерах (NK(Т)-клетках), В-клетках и нейтрофилах. На Т-клетках CD137 не экспрессируется конститутивно, но индуцируется при активации Т-клеточного рецептора (TCR) (например, на инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (TIL) (Gros et al., *J. Clin Invest* 2014;124(5):2246-59)). Стимуляция через природный лиганд 4-1BBL или агонистические антитела приводит к передаче сигналов с использованием TRAF-2 и TRAF-1 в качестве адаптеров. Ранняя передача сигнала с помощью CD137 включает реакции полиубиквитинирования K-63, которые в конечном итоге приводят к активации ядерного фактора (NF)-κB и путей митогенактивируемой протеин(MAP)-киназы. Передача сигналов приводит к повышенной Т-клеточной костимуляции, пролиферации, продукции цитокинов, созреванию и продлению выживания CD8⁺ Т-клеток. В различных доклинических моделях было показано, что агонистические антитела против CD137 способствуют противоопухолевому контролю со стороны Т-клеток (Murillo et al., *Clin Cancer Res* 2008;14(21):6895-906). Антитела, стимулирующие CD137, могут индуцировать выживание и пролиферацию Т-клеток, тем самым усиливая противоопухолевый иммунный ответ. Антитела, стимулирующие CD137, были описаны в предшествующем уровне техники и включают урелумаб, IgG4-антитело человека (AU2004279877) и утомилумаб, IgG2-антитело человека (Fisher et al., 2012, *Cancer Immunol. Immunother.* 61: 1721-1733).

Лиганд белка программируемой клеточной смерти 1 (PD-L1, PDL1, CD274, B7H1) представляет собой однопроходной мембранный белок типа I массой 33 кДа. Описаны три изоформы PD-L1 на основе альтернативного сплайсинга. PD-L1 принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов (Ig) и содержит один Ig-подобный домен C2-типа и один Ig-подобный домен V-типа. Свежевыделенные Т- и В-клетки экспрессируют незначительные количества PD-L1, а часть (примерно 16%) CD14⁺ моноцитов конститутивно экспрессирует PD-L1. Однако известно, что интерферон-γ (IFNγ) активирует PD-L1 в опухолевых клетках.

PD-L1 препятствует противоопухолевому иммунитету путем 1) толеризации Т-клеток, реактивных в отношении опухоли, путем связывания с их рецептором, белком

программируемой клеточной смерти 1 (PD-1) (CD279) на активированных Т-клетках; 2) придания опухолевым клеткам устойчивости к CD8⁺ Т-клеткам и лизису, опосредованному лигандом Fas, путем передачи сигнала PD-1 через экспрессируемый опухолевыми клетками PD-L1; 3) толеризации Т-клеток посредством обратной передачи сигнала через CD80, экспрессируемый Т-клетками (B7.1); и 4) содействия развитию и поддержанию индуцированных регуляторных Т-клеток. PD-L1 экспрессируется при многих видах злокачественных новообразований человека, включая меланому, рак яичников, легких и толстой кишки (Latchman et al., 2004 Proc Natl Acad Sci USA 101, 10691-6).

Антитела, блокирующие PD-L1, продемонстрировали клиническую активность при нескольких видах злокачественных новообразований, о которых известно, что они сверхэкспрессируют PD-L1 (включая меланому, NSCLC). Например, атезолизумаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG1 против PD-L1. В настоящее время он проходит клинические испытания в качестве иммунотерапии по нескольким показаниям, включая различные типы солидных опухолей (см., например, Rittmeyer et al., 2017 Lancet 389:255-265), и одобрен для лечения немелкоклеточного рака легких и рака мочевого пузыря. Авелумаб, антитело против PD-L1, (Kaufman et al. Lancet Oncol. 2016;17(10):1374-1385) был одобрен FDA для лечения взрослых и детей 12 лет и старше с метастатической карциномой Меркеля и в настоящее время проходит клинические испытания при нескольких онкологических заболеваниях, включая рак мочевого пузыря, рак желудка, рак головы и шеи, мезотелиому, NSCLC, рак яичников и рак почки. Дурвалумаб, антитело против PD-L1, одобрен для лечения местно-распространенной или метастатической уротелиальной карциномы и находится в клинической разработке при множественных солидных опухолях и гемобластозах (см., например, Massard et al., 2016 J Clin Oncol. 34(26):3119-25). Дополнительные антитела против PD-L1 описаны, например, в WO2004004771.

Horton et al (J Immunother Cancer. 2015; 3(Suppl 2): O10) описывают комбинацию агонистического антитела 4-1BB с нейтрализующим антителом PD-L1. В WO 2019/025545 предложены связывающие агенты, такие как биспецифические антитела, связывающие PD-L1 человека и связывающие CD137 человека.

Однако, несмотря на эти достижения в данной области, существует значительная потребность в улучшенных методах лечения для предотвращения прогрессирования опухоли или лечения злокачественного новообразования.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что комбинация (i) стимуляции с помощью связывающего агента, связывающегося с PD-L1 человека и связывающегося с CD137 человека, и (ii) антитела, связывающегося с белком программируемой клеточной смерти-1 (PD-1), усиливает иммунный ответ.

Таким образом, в первом аспекте настоящее описание относится к связывающему агенту для использования в способе уменьшения или предотвращения прогрессирования

опухоли или лечения злокачественного новообразования у пациента, причем указанный способ включает введение указанному пациенту связывающего агента до, одновременно или после введения антитела, связывающегося с белком программируемой клеточной смерти-1 (PD-1), или его антигенсвязывающего фрагмента, где связывающий агент содержит первую связывающую область, связывающуюся с CD137, и вторую связывающую область, связывающуюся с PD-L1;

а) причем первая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно,

и

б) вторая антигенсвязывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно,

и где антитело, связывающееся с PD-1, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 43, 44 и 45, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL) содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно, или антитело, связывающееся с PD-1, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему

(i) связывающий агент, содержащий первую связывающую область, связывающуюся с CD137, и вторую связывающую область, связывающуюся с PD-L1

а) причем первая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно,

и

б) вторая антигенсвязывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно,

и

(ii) антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 43, 44 и 45, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно, или антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно.

В третьем аспекте настоящее описание относится к набору второго аспекта для использования в способе уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли или лечения злокачественного новообразования у пациента.

В четвертом аспекте настоящее описание относится к способу уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли или лечения злокачественного новообразования у пациента, причем указанный способ включает введение указанному пациенту связывающего агента, содержащего первую связывающую область, связывающуюся с CD137, и вторую связывающую область, связывающуюся с PD-L1,

а) причем первая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно,

и

б) вторая антигенсвязывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно,

до, одновременно или после введения антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 43, 44 и 45, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно, или антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно.

Краткое описание чертежей

На Фиг. 1 показано схематическое изображение предполагаемого механизма действия биспецифических антител CD137хPD-L1. (А) PD-L1 экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках (АРС), а также на опухолевых клетках. Связывание PD-L1 с Т-клетками, экспрессирующими негативную регуляторную молекулу PD-1, эффективно подавляет сигналы активации Т-клеток и в конечном итоге приводит к ингибированию Т-клеток. (В) При добавлении биспецифического антитела CD137хPD-L1 ингибирующее взаимодействие PD-1:PD-L1 блокируется через PD-L1-специфическое плечо, и в то же время биспецифическое антитело посредством межклеточного взаимодействия обеспечивает агонистическую передачу сигналов CD137, экспрессируемом на Т-клетках, приводя к сильной костимуляции Т-клеток.

На Фиг. 2 показана продукция IL-2, индуцированная GEN1046 в комбинации с пембролизумабом в анализе MLR LPS-созревших mDC и очищенных CD8⁺ Т-клеток. Очищенные CD8⁺ Т-клетки совместно культивировали с аллогенными mDC в течение 5 дней в присутствии GEN1046 (0,001-30 мкг/мл), пембролизумаба (0,01-100 мкг/мл) отдельно или в комбинации, контрольных антител или в отсутствие любых антител (Нет Тх). Секрецию IL-2 анализировали с помощью Luminex. Представленные данные представляют собой среднее значение IL-2 ± стандартное отклонение для дубликатов лунок. Каждый отдельный график представляет одну из трех пар доноров.

На Фиг. 3 показана продукция IFN γ , индуцированная GEN1046 в комбинации с пембролизумабом в реакции смешанных лимфоцитов (MLR) LPS-созревших дендритных клеток (mDC) и очищенных CD8⁺ Т-клеток. Очищенные CD8⁺ Т-клетки совместно культивировали с аллогенными mDC в течение 5 дней в присутствии GEN1046 (0,001-30 мкг/мл), пембролизумаба (0,01-100 мкг/мл) отдельно или в комбинации, контрольных антител или в отсутствие любых антител (Нет Тх). Секрецию IFN γ анализировали с помощью ИФА. Представленные данные представляют собой среднее значение IFN γ ± стандартное отклонение (SD) для дубликатов лунок. Каждый отдельный график представляет одну из трех пар доноров DC/Т-клеток.

На Фиг. 4 показана продукция TNF α , индуцированная GEN1046 в комбинации с пембролизумабом в анализе MLR LPS-созревших mDC и очищенных CD8⁺ Т-клеток. Очищенные CD8⁺ Т-клетки совместно культивировали с аллогенными mDC в течение 5 дней в присутствии GEN1046 (0,001-30 мкг/мл), пембролизумаба (0,01-100 мкг/мл) отдельно или в комбинации, контрольных антител или в отсутствие любых антител (Нет Тх). Секрецию TNF α анализировали с помощью Luminex. Представленные данные представляют собой средние значения TNF α ± SD для дубликатов лунок. Каждый отдельный график представляет одну из трех пар доноров.

На Фиг. 5 показана модель сингенной опухоли MC38, созданная путем подкожной инокуляции 1×10^6 клеток MC38 мышам C57BL/6. Когда опухоли достигали среднего объема 64 мм³, мышей рандомизировали и вводили mbsIgG2a-PD-L1 \times 4-1BB (5 мг/кг), антитело против мышинового PD-1 (анти-mPD-1; 10 мг/кг), отдельно или в комбинации, или

PBS (все 2QW×3). А. Показанные данные представляют собой средний объем опухоли на группу обработки (n=10) с данными, перенесенными для животных, достигших критериев прекращения. Кривые роста прекращались, когда <50% животных в группе обработки оставались живыми (PBS, mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB, анти-mPD-1) или до 35-го дня (комбинация mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB с анти-mPD-1). Стрелки указывают дни обработки. В. Выживаемость без прогрессирования, определенная как процент мышей с объемом опухоли менее 500 мм³, показана в виде кривой Каплана-Мейера. Анализ Мантеля-Кокса использовали для сравнения выживаемости между группами обработки на 45-й день (Таблица Y).

На Фиг. 6 показан анализ зависимости пролиферации от дозы GEN1046 (DuoBody-PD-L1×4-1BB) и антитела против PD-1 пембролизумаба в антигенспецифическом Т-клеточном анализе с активной осью PD1/PD-L1. Сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина (CFSE)-меченные Т-клетки, подвергнутые электропорации с клаудин-6-специфичной транслированной *in vitro* (IVT)-РНК Т-клеточного рецептора (TCR) и PD-1, инкубировали с электропорированными клаудин-6-IVT-РНК незрелыми дендритными клетками в присутствии (А) GEN1046 (в 3-кратных серийных разведениях от 1 до 0,00015 мкг/мл) или (В) Пембролизумаба (в 4-кратных серийных разведениях от 0,8 до 0,00005 мкг/мл) в течение пяти дней. Пролиферацию CD8⁺ Т-клеток измеряли с помощью проточной цитометрии. Представленные данные представляют собой индексы расширения, рассчитанные с использованием программного обеспечения FlowJo v10.7.1 в зависимости от концентрации антител. Планки погрешности (SD) указывают на вариации в рамках эксперимента (n=3 повтора в (А); n=2 дубликата в (В), с использованием клеток от одного репрезентативного донора). Кривые были аппроксимированы 4-параметрической логарифмической аппроксимацией, а значения EC50 и углового коэффициента Хилла (показаны в таблицах 1 и 2) были определены с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v9.0.

На Фиг. 7 показано высвобождение опосредованного PD-1/PD-L1 ингибирования Т-клеток и дополнительная стимуляция пролиферации CD8⁺ Т-клеток с помощью GEN1046 в отсутствие или в присутствии антитела против PD-1 пембролизумаба. Т-клетки, меченные CFSE, подвергнутые электропорации с клаудин-6-специфичной транслированной *in vitro* (IVT)-РНК TCR и PD-1, инкубировали с электропорированными клаудин-6-IVT-РНК незрелыми дендритными клетками в присутствии 0,2 мкг/г мл, 0,0067 мкг/мл или 0,0022 мкг/мл GEN1046 в комбинации с фиксированной концентрацией 0,8 мкг/мл пембролизумаба или изотипического контрольного антитела IgG1-контрл. или в течение пяти дней (n=2 технических повтора на каждое условие, с использованием клеток от n=3 индивидуальных доноров). Только среду, только 0,8 мкг/мл IgG1-контрл. и только 0,8 мкг/мл пембролизумаба использовали для определения исходного уровня пролиферации в отсутствие GEN1046. Пролиферацию CD8⁺ Т-клеток измеряли с помощью проточной цитометрии. Гистограммы представляют среднее значение ± стандартное отклонение индексов расширения для указанных условий, рассчитанное с

использованием программного обеспечения FlowJo версии 10.7.1. Пунктирная линия представляет исходную пролиферацию в присутствии антитела против PD-1 пембролизумаба.

На Фиг. 8 схематически представлено первое открытое исследование с участием людей с увеличением дозы с расширением когорт для оценки безопасности GEN1046 у пациентов со злокачественными солидными опухолями.

Фиг. 9 представляет собой каскадный график, показывающий выживаемость без прогрессирования у пациентов, ранее получавших терапию ингибитором контрольной точки (серая линия), и у пациентов, ранее не принимавших ингибиторы контрольной точки (черная линия).

На Фиг. 10 сравнивается время, прошедшее с момента последнего предшествующего приема анти-PD-(L)1, у пациентов из групп расширения, в которых применялся CPI (монотерапия GEN1046), с клиническим ответом (PR) по сравнению с пациентами со стабильным заболеванием (SD) или прогрессирующим заболеванием (PD). Группы ответов сравнивались с использованием критерия Вилкоксона. PR vs. PD: $p=0,0017$; PR vs. SD: $p=0,034$.

На Фиг. 11 показаны прогнозируемые показатели частичного ответа (PR) и полного ответа (CR) для GEN1046, введенного в дозе 100 мг каждые 3 недели или 6 недель в комбинации с пембролизумабом в модели интегрированной количественной системной фармакологии (QSP).

На Фиг. 12 показана характеристика истощенного фенотипа CD3⁺ Т-клеток после двух раундов стимуляции CD3/CD28. (А) Истощенные *in vitro* CD3⁺ Т-клетки или наивные Т-клетки стимулировали CD3/CD28-гранулами. Секрецию IFN γ анализировали с помощью ИФА. Показанные данные представляют собой среднее значение+стандартное отклонение (SD) для дубликатов лунок одной репрезентативной пары доноров. (В) Экспрессию TIM3, LAG3, PD-1 и 4-1BB на наивных и истощенных *in vitro* CD3⁺ Т-клетках определяли методом проточной цитометрии. Представленные данные представляют собой среднюю интенсивность флуоресценции с поправкой на фоновую флуоресценцию (Δ MFI). (С) Экспрессию Ki67 на наивных и истощенных *in vitro* CD3⁺ Т-клетках определяли методом проточной цитометрии.

На Фиг. 13 показана секреция IFN γ , индуцированная GEN1046 в комбинации с пембролизумабом в реакции смешанных лимфоцитов (MLR) зрелых дендритных клеток (mDC) и истощенных *in vitro* CD3⁺ Т-клеток (Tex). Tex культивировали совместно с аллогенными LPS-зрелыми DC (при соотношении DC:Т-клетки 1:4) в присутствии GEN1046 (0,001-30 мкг/мл) или пембролизумаба (1 мкг/мл) отдельно или в комбинации в течение 5 дней. Совместные культуры без обработки антителами (без антител) или обработанные bsIgG1-PD-L1 \times ctrl (30 мкг/мл), bsIgG1-ctrl \times 4-1BB (30 мкг/мл), изотипическим контролем IgG4 (1 мкг/мл) или IgG1-ctrl-FEAL (30 мкг/мл) были включены в качестве контроля. Секрецию IFN γ анализировали с помощью ИФА. Показанные данные представляют собой среднее значение+стандартное отклонение (SD)

для дубликатов лунок одной репрезентативной пары доноров из четырех протестированных пар доноров.

На Фиг. 14 показаны самые высокие показатели синергии отдельного агента (HSA) для комбинации GEN1046 с пембролизумабом в MLR mDC и Тех. Тех культивировали совместно с аллогенными LPS-зрелыми DC (при соотношении DC:T-клетки 1:4) в присутствии GEN1046 (0,001-30 мкг/мл) или пембролизумаба (1 мкг/мл) отдельно или в комбинации в течение 5 дней. Представленные данные представляют собой показатели синергии HSA одной репрезентативной пары доноров из четырех протестированных пар доноров (тот же донор, что показан на Фигуре 13). Оценки >10 указывают на синергию в этой модели.

На Фиг. 15 показана модель рака толстой кишки MC38, созданная путем подкожной инокуляции 1×10^6 клеток MC38 мышам C57BL/6. Когда опухоли достигали среднего объема 60 мм^3 , мышей рандомизировали и обрабатывали указанными антителами или их комбинациями (все 2QW \times 3). А. Показанные данные представляют собой средний объем опухоли на группу обработки (n=10) с данными, перенесенными для животных, достигших критериев прекращения. Кривые роста прекращались, когда $<50\%$ животных в группе обработки оставались живыми (mIgG2a-ctrl-AAKR, mbsIgG2a-PD-L1 \times 4-1BB, антитело против PD-1 мыши [анти-mPD-1]) или до дня 60 (комбинация mbsIgG2a-PD-L1 \times 4-1BB с анти-mPD-1). Треугольники, обращенные вниз, обозначают дни обработки. В. Выживаемость без прогрессирования, определенная как процент мышей с объемом опухоли менее 500 мм^3 , показана в виде кривой Каплана-Мейера. Анализ Мантеля-Кокса использовали для сравнения выживаемости между группами обработки на 69-й день (Таблица 19).

На Фиг. 16 показано (повторное) заражение мышей с полной регрессией опухоли после обработки и контрольной группы мышей, не имеющих опухоль. Мышам (повторно) вводили 1×10^6 опухолевых клеток MC38, которые инъецировали подкожно на 121 день после начала обработки антителами. Представленные данные представляют собой средние объемы опухолей \pm SEM.

На Фиг. 17 показаны количественные данные ИНС и ISH по клеточным иммунным и опухолевым маркерам, экспрессируемым в удаленных опухолевых тканях на модели рака толстой кишки MC38. Мышам C57BL/6 инокулировали 1×10^6 клеток MC38. Когда опухоли достигали среднего объема $50-70 \text{ мм}^3$, мышей рандомизировали и обрабатывали mbsIgG2a-PD-L1 \times 4-1BB, анти-mPD-1 или их комбинацией. Опухоли удаляли на 7-й день (n=5 на группу обработки) или на 14-й день (n=5 на группу обработки) после начала обработки. Некоторые из удаленных образцов опухолей были слишком малы для проведения ИНС-анализа, в результате чего на группу обработки приходилось анализировать 4-5 опухолей. Срезы удаленных опухолей (4 мкм) окрашивали с использованием антител против CD3, против CD4, против CD8 или против PD-L1 методом иммуногистохимии (ИНС) или окрашивали на 4-1BB или PD-L2 методом гибридизации *in situ* ISH. Данные ИНС представлены как % клеток с положительным

маркером от общего числа клеток, подсчитанных на предметном стекле, а также среднее значение \pm SEM на группу обработки. Данные ISH представлены в виде показателя H RNAscore на предметное стекло, а также среднего значения \pm SEM на группу обработки.

На Фиг. 18 показана экспрессия GzmB и Ki67 в субпопуляциях CD8 T-клеток из диссоциированной опухолевой ткани из модели рака толстой кишки MC38. Мышам C57BL/6 инокулировали 1×10^6 клеток MC38. Когда опухоли достигали среднего объема 50-70 мм³, мышей рандомизировали и обрабатывали mbsIgG2a-PD-L1 \times 4-1BB, анти-mPD-1 или их комбинацией. Опухоли удаляли на 7-й день (n=5 на группу обработки) после начала обработки, диссоциировали на суспензии отдельных клеток и анализировали с помощью проточной цитометрии. Показанные данные представляют собой процент клеток GzmB+ (A) или Ki67+ (B) в популяции CD8+ T-клеток отдельных мышей и среднее значение \pm SEM на группу обработки. Статистический анализ Манна-Уитни проводился для сравнения процентного содержания клеток GzmB+ или Ki67+ в популяции CD8+ T-клеток между группами обработки, при * p <0,05 и **p <0,01.

На Фиг. 19 показаны уровни цитокинов в периферической крови мышей C57BL/6 с MC38-опухолью, обработанных mbsIgG2a-PD-L1 \times 4-1BB, антителом против mPD-1 либо в виде отдельных агентов, либо в комбинации, или несвязывающим контрольным антителом IgG2a-Ctrl-AAKR. Образцы периферической крови брали исходно (за день до обработки [День -1], пунктирная линия) и через два дня после каждой обработки (День 2 и День 5). Цитокиновый анализ проводили с помощью ECLIA.

Таблица 1 - Последовательности: Жирным и подчеркнутым шрифтом обозначены F; E; A; L и R, соответствующие положениям 234 и 235; 265; 405 и 409, соответственно, причем указанные положения соответствуют нумерации EU. В SEQ ID No: 63 и 64 показанные жирным шрифтом аминокислоты представляют мутации -AAKR или -AALT, необходимые для контролируемого обмена Fab-плеч. В переменных областях подчеркнуты указанные области CDR, которые были аннотированы в соответствии с определениями IMGT (если не указано иное или не противоречит контексту).

SEQ ID	НАЗВАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	Организм
1	VH_CD137-009-H7	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGF <u>SLNDYWMSWVRQAPGKGLEWVGYID</u> <u>VGGSLYYAASVKGRFTISRDDSKSIAY</u> <u>LQMNSLKTEDTAVYYCARGGLTYGFD</u> <u>LWGQGLTVTVSS</u>	синтетическая конструкция
2	VH_CD137-009-H7_CDR1	GFSLNDYW	синтетическая конструкция
3	VH_CD137-009-H7_CDR2	IDVGGSL	синтетическая конструкция
4	VH_CD137-009-H7_CDR3	ARGGLTYGFDL	синтетическая конструкция
5	VL_CD137-009-L2	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASE <u>DISSYLAWYQQKPGKAPKRLIYGASDL</u> <u>ASGVPSRFSASGSGTDYFTFISLQPEDI</u> <u>ATYYCHYYATISGLGVAFGGGTKVEI</u>	синтетическая конструкция

		K	
6	VL_CD137-009-L2_CDR1	EDISSY	синтетическая конструкция
7	VL_CD137-009-L2_CDR2	GAS	синтетическая конструкция
8	VL_CD137-009-L2_CDR3	HYYATISGLGVA	синтетическая конструкция
9	VH_CD137-009	<u>QSLEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFSL</u> <u>NDYWMSWVRQAPGKGLEWIGYIDVG</u> <u>GSLYYASWAKGRFTISRTSTTVDLKM</u> <u>TSLTTEDTATYFCARGGLTYGFDLWG</u> <u>PGTLTVSS</u>	синтетическая конструкция
10	VL_CD137-009	DIVMTQTPASVSEPVGGTVTINCQASE DISSYLAWYQQKPGQRPKRLIYGASDL ASGVPSRFSASGSGTEYALTISDLESAD AATYYCHYYATISGLGVAFGGGTEVV VK	синтетическая конструкция
11	VH-PD-L1-547	<u>EVQLLEPGGGLVQPGGSLRLSCEASGS</u> <u>TFSTYAMSWVRQAPGKLEWVSGFSG</u> <u>SGGFTFYADSVRGRFTISRDSKNTLFL</u> <u>QMSSLRAEDTAVYYCAIPARGYNYGS</u> <u>FQHWGQGTLTVSS</u>	синтетическая конструкция
12	VH- PD-L1-547-CDR1	GSTFSTYA	синтетическая конструкция
13	VH- PD-L1-547-CDR2	FSGSGGFT	синтетическая конструкция
14	VH- PD-L1-547-CDR3	AIPARGYNYGSFQH	синтетическая конструкция
15	VL- PD-L1-547	<u>SYVLTQPPSVSVAPGQATARITCGGNNI</u> <u>GSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDDND</u> <u>RPSGLPERFSGSNSGNTATLTISRVEAG</u> <u>DEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKL</u> <u>TVL</u>	синтетическая конструкция
16	VL- PD-L1-547-CDR1	NIGSKS	синтетическая конструкция
17	VL- PD-L1-547-CDR2	DDN	синтетическая конструкция
18	VL- PD-L1-547-CDR3	QVWDSSSDHVV	синтетическая конструкция
19	IgG1-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHT CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK	синтетическая конструкция

20	IgG1-Fc_F405L	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKLSLSLSPGK</p>	синтетическая конструкция
21	IgG1-Fc_K409R	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKLSLSLSPGK</p>	синтетическая конструкция
22	IgG1-Fc_FEA	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKLSLSLSPGK</p>	синтетическая конструкция
23	IgG1-FEAR-Fc	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKLSLSLSPGK</p>	синтетическая конструкция

24	IgG1-FEAL-Fc	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPE<u>FE</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVA<u>V</u>SHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGS<u>FL</u>LYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKLSLSLSPGK</p>	синтетическая конструкция
25	IgG1-Fc без C- концевого лизина	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPE<u>LL</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGS<u>FF</u>LYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKLSLSLSPG</p>	синтетическая конструкция
26	IgG1-Fc_F405L без C- концевого лизина	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPE<u>LL</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGS<u>FL</u>LYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKLSLSLSPG</p>	синтетическая конструкция
27	IgG1-Fc_K409R без C-концевого лизина	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPE<u>LL</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGS<u>FF</u>LYS<u>R</u>LT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKLSLSLSPG</p>	синтетическая конструкция

28	IgG1-Fc_FEA без C-концевого лизина	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPE <u>F</u> EGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVA <u>V</u> SHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKLSLSLSPG	синтетическая конструкция
29	IgG1-FEAR-Fc без C-концевого лизина	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPE <u>F</u> EGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVA <u>V</u> SHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS <u>R</u> LT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKLSLSLSPG	синтетическая конструкция
30	IgG1-FEAL-Fc без C-концевого лизина	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPE <u>F</u> EGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVA <u>V</u> SHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSF <u>L</u> LYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKLSLSLSPG	синтетическая конструкция
31	CD137-009, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGF SLNDYWMSWVRQAPGKGLEWVGYID VGGSLYYAASVKGRFTISRDDSKSIAY LQMNSLKTEDTAVYYCARGGLTYGFD LWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP	синтетическая конструкция

		REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV LDSGDGFFLYSRLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	
32	CD137-009 light chain	DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCQASE DISSYLAWYQQKPGKAPKRLIYGASDL ASGVPSRFSASGSGTDYFTISSLQPEDI ATYYCHYYATISGLGVAFGGGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	синтетическая конструкция
33	PD-L1-547, тяжелая цепь	EVQLLEPGGGLVQPGGSLRLSCEASGS TFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVSGFSG SGGFTFYADSVRGRFTISRDSKNTLFL QMSSLRAED TAVYYCAIPARGYNYGSFQHWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVTHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKF NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGFFL YSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG	синтетическая конструкция
34	PD-L1-547 легкая цепь	SYVLTQPPSVSVAPGQARITCGGNNI GSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDDND RPSGLPERFSGSNSGNTATLTISRVEAG DEADYYCQVWDSDDHVVFGGGTKL TVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPE QWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPT ECS	синтетическая конструкция
35	Каппа-С	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	синтетическая конструкция
36	Лямбда-С	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWK SHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	синтетическая конструкция

37	CD137 человека (UniProtKB - Q07011; вкл. последовательность сигнального пептида: aa 1-23)	MGNSCYNIVALLLVLNFERTRSLQDPC SNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSA GGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSN AECDCPTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQG QELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRP WTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPS PADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISF FLALTSTALLFLLFLLTLRFSVVKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCEL	Homo sapiens
38	CD137 человека (UniProtKB - Q07011; зрелая последовательность)	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPP NSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKE CSSTNAECDCTPGFHCLGAGCSMCE QDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQ KRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKER DVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREP GHSPQIISFFLALTSTALLFLLFLLTLRF SVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEGGCEL	Homo sapiens
39	PD-L1 человека (UniProtKB - Q9NZQ7; вкл. последовательность сигнального пептида: aa 1-18)	MRIFAVFIFMTYWHELLNAFTVTVPKDL YVVEYGSNMTIECFPVEKQLDLAALIV YWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSY RQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQ DAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAP YNKINQRILVVDVPTSEHELTCQAEGY PKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKRE EKLNFVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLD PEENHTAELVIPELPLAHPNERTHLVI LGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVK KCGIQDTNSKKQSDTHLEET	Homo sapiens
40	PD-L1 человека (UniProtKB - Q9NZQ7; зрелая последовательность)	FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVE KQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGE EDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNA ALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADY KRITVKVNAPYNKINQRILVVDVPTSE HELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLS GKTTTTNSKREEKLNVTSTLRINTTT NEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPL AHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIF RLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSD THLEET	Homo sapiens
41	PD-1 человека	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFL DSPDRPWNPTFSPALLVVTEGDNATF TCSFSNTSEFVLNWyRMSPSNQTDKL AAFPEDRSQPGQDCRFRTQLPNGRDF HMSVVRARRNDSGYLCAISLAPKA QIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSP RPAGQFQTLVVGVVGGLLGLVLLVW VLAVICRAARGTIGARRTGQPLKEDP SAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVP CVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGS ADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL	Homo sapiens

42	CTLA-4	MACLGFQRHKAQLNLATRTWPCTLLF FLLFIPVFCKAMHVAQPAVVLASSRGI ASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADS QVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTG TSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVE LMYPPPYLGGIGNGTQIYVIDPEPCPDS DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSK MLKKRSPLTTGVYVKMPPEPECEKQ FQPYFIPIN	Homo sapiens
43	Пембролизумаб VH CDR1	GYTFTNY	синтетическая конструкция
44	Пембролизумаб VH CDR2	INPSNGGT	синтетическая конструкция
45	Пембролизумаб VH CDR3	ARRDYRFDMGFDY	синтетическая конструкция
46	Пембролизумаб VL CDR1	KGVSTSGYSY	синтетическая конструкция
47	Пембролизумаб VL CDR2	LAS	синтетическая конструкция
48	Пембролизумаб VL CDR3	QHSRDLPLT	синтетическая конструкция
49	Пембролизумаб VH	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASG YTFTNYMYWVRQAPGQGLEWMGGI NPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTT AYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRF DMGFDYWGQGTTVTVSS	синтетическая конструкция
50	Пембролизумаб VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKG VSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYL ASYLESQVPAFSGSGSDFTLTISSL EPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKV EIK	синтетическая конструкция
51	Пембролизумаб, тяжелая цепь	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASG YTFTNYMYWVRQAPGQGLEWMGGI NPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTT AYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRF DMGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV	синтетическая конструкция

		DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK	
52	Пембролизумаб Легкая цепь	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKG VSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYL ASYLESQVPARFSGSGSGTDFTLTISL EPEDFAVYYCQHSRDPLPTFGGGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC	синтетическая конструкция
53	VH_IgG1-b12	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASG</u> <u>YRFSNFVIHWVRQAPGQRFEWGWIN</u> <u>PYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTSANT</u> <u>AYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYS</u> <u>WDDSPQDNYYMDVWGKGTIVVSS</u>	синтетическая конструкция
54	VL_IgG1-b12	EIVLTQSPGTLSPGERATFSCRSSH <u>SI</u> <u>RSRRVAWYQHKGQAPRLVIHGVSNR</u> ASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPED FALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERK	синтетическая конструкция
55	m4-1BB-3H3 VH	EMQLVESGGGLVQPGRSMKLSCAG <u>SG</u> <u>FTLSDYGVAVWRQAPKKGLEWVAYIS</u> <u>YAGGTTYRESVKGRFTISRDNASTL</u> <u>YLQMDSLRSEDATYYCTIDGYGGYS</u> <u>GSHWYFDFWGPVTMTVSS</u>	синтетическая конструкция
56	m4-1BB-3H3 VL	DIQMTQSPSLLSASVGDRVTLNCR <u>TSQ</u> <u>NVYKNLAWYQQKLGEPKLLIYNANS</u> LQAGIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED VATYFCQYYSGNTFGAGTNLELK	синтетическая конструкция
57	AALT	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGC LVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFP AVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITC NVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPC KCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPMVTCTVVDVSEDDPDVQISWVFN	синтетическая конструкция

		VEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPI QHQDWMMSGKEFKCKVNNKALPAPIER TISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKK QVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKT ELNYKNTEPVLDSDGSYLMYSKLTVE KKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTT KSFSRTPGK	
58	AAKR	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGC LVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFP AVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITC NVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPC KCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPMVTVCVVVDVSEDDPDVQISWV FNNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVS ALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKAL PAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPE EEMTKKQVTLTCMVKDFMPEDIYVE WTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYF MYSRLRV EKKNWVERNSYSCSVV HEGLHNHHTT KSFSRTPGK	синтетическая конструкция
59	Константная область Каппа LC мыши	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASV VCF LNNFYPKDINVKWKIDGSERQ NGVLN SWTDQDSKDSTYSMSSTL TLTKDEYE RHNSYTCEATHKTST SPIVKSFNRECE	синтетическая конструкция
60	MPDL3280A VH	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG</u> <u>FTFSDSWIHWRQAPGKGLEWYAWIS</u> <u>PYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTA</u> <u>YLQMNSLR AEDTAVYYCARRHWPGG</u> <u>FDYWGQGT LVTVSS</u>	синтетическая конструкция
61	MPDL3280A VL	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ</u> <u>DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF</u> <u>LYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE</u> <u>DFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIK</u>	синтетическая конструкция
62	Пембролизумаб VH CDR1 (Нумерация)	NYYMY	синтетическая конструкция

	Kabat)		
63	Пембролизумаб VH CDR2 (Нумерация Kabat)	GINPSNGGTNFNEKFKN	синтетическая конструкция
64	Пембролизумаб VH CDR3 (Нумерация Kabat)	RDYRFDMGFDY	синтетическая конструкция
65	Пембролизумаб VL CDR1 (Нумерация Kabat)	RASKGVSTSGYSYLH	синтетическая конструкция
66	Пембролизумаб VL CDR2 (Нумерация Kabat)	LASYLES	синтетическая конструкция
67	Пембролизумаб VL CDR3 (Нумерация Kabat)	QHSRDLPLT	синтетическая конструкция

Подробное описание изобретения

Хотя настоящее изобретение более подробно описано ниже, следует понимать, что оно не ограничивается конкретными методологиями, протоколами и реагентами, описанными в настоящем документе, поскольку они могут различаться. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем описании, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если иное не определено, все технические и научные термины, использованные в настоящем описании, имеют тот же смысл, который вкладывается в них обычным специалистом в данной области.

Далее элементы настоящего изобретения будут описаны более подробно. Эти элементы перечислены с конкретными вариантами осуществления, однако следует понимать, что они могут объединяться любым способом и в любом количестве с созданием дополнительных вариантов осуществления. По разному описанные примеры и предпочтительные варианты осуществления не следует рассматривать как ограничения настоящего описания, они предназначены исключительно для ясного описания вариантов осуществления. Следует понимать, что описание поддерживает и охватывает варианты осуществления, которые объединяют ясно описанные варианты осуществления с любым количеством раскрытых и/или предпочтительных вариантов осуществления. Кроме того, любые перестановки и комбинации всех описанных элементов в настоящей заявке следует рассматривать как раскрытые описанием настоящей заявки до тех пор, пока из контекста

не следует иное. Например, если в предпочтительном варианте осуществления связывающего агента, используемого в настоящем описании, первая тяжелая цепь содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23 или 29 [IgG1-Fc_FEAR], и в другом предпочтительном варианте осуществления связывающего агента, используемого в настоящем описании, вторая тяжелая цепь содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24 или 30 [IgG1-Fc_FEAL], тогда в следующем предпочтительном варианте осуществления связывающего агента, используемого в настоящем описании, первая тяжелая цепь содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23 или 29 [IgG1-Fc_FEAR], и вторая тяжелая цепь содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24 или 30 [IgG1-Fc_FEAL].

Предпочтительно, термины, используемые в настоящем описании, определены, как описано в «A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)», H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland, (1995).

В практике настоящего изобретения будут использоваться, если не указано иное, традиционные методы химии, биохимии, клеточной биологии, иммунологии и рекомбинантной ДНК, которые объяснены в литературе, относящейся к данной области (см., например, Organikum, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1990; Streitwieser/Heathcook, «Organische Chemie», VCH, 1990; Beyer/Walter, «Lehrbuch der Organischen Chemie», S. Hirzel Verlag Stuttgart, 1988; Carey/Sundberg, «Organische Chemie», VCH, 1995; March, «Advanced Organic Chemistry», John Wiley & Sons, 1985; Römpp Chemie Lexikon, Falbe/Regitz (Hrsg.), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1989; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

Все способы, описанные в настоящем документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в настоящем описании или иным образом не противоречит контексту. Использование любых и всех примеров или иллюстративных формулировок (например, «такой как»), представленных в настоящем описании, предназначено просто для лучшей иллюстрации настоящего изобретения и не накладывает ограничений на объем настоящего описания, которые в противном случае заявлены. Никакие формулировки в описании не должны быть истолкованы как указывающие на какой-либо не заявленный элемент, существенный для практики настоящего изобретения.

Перечисление интервалов в настоящем описании предназначено лишь для того, чтобы служить в качестве метода сокращения индивидуального обозначения для каждого отдельного значения, попадающего в интервал. До тех пор, пока в настоящем описании не указано иное, каждое индивидуальное значение включено в спецификацию, как если бы

оно было индивидуально перечислено в настоящем описании.

Несколько документов цитируется по всему тексту настоящего описания. Каждый из документов, процитированных в настоящем описании (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, спецификации производителя, инструкции и т. д.), будь то выше или ниже, настоящим полностью включен ссылкой. Ничто в настоящем описании не должно быть истолковано как признание того, что изобретение не имеет права предшествовать такому описанию в силу предшествующего изобретения.

Определения

Ниже будут предоставлены определения, которые применимы ко всем аспектам настоящего изобретения. Следующие термины имеют следующие значения, если не указано иное. Любой из неопределенных терминов имеет свое признанное в области значение.

В этом описании и в последующей формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово «содержит» и его варианты, такие как «содержит» и «содержащий», будут пониматься как подразумевающие включение указанного члена, целого числа, стадии или группы элементов, целых чисел или стадий, но не исключение любого другого члена, целого числа или стадии или группы членов, целых чисел или стадий. Термин «состоящий по существу из» означает исключение других членов, целых чисел или стадий, имеющих какое-либо существенное значение. Термин «содержащий» включает в себя термин «состоящий по существу из», который, в свою очередь, включает в себя термин «состоящий из». Таким образом, в каждом случае в настоящей заявке термин «содержащий» может быть заменен термином «состоящий по существу из» или «состоящий из». Аналогично, в каждом случае в настоящей заявке термин «состоящий по существу из» может быть заменен термином «состоящий из».

Термины, указывающие на единственное число, и аналогичные ссылки, используемые в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте формулы изобретения), должны толковаться как охватывающие как единственное, так и множественное число, если в настоящем описании не указано иное или явно не противоречит контексту.

Используемый в настоящем описании термин «и/или» следует понимать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе или без другого. Например, «X и/или Y» следует понимать как конкретное описание каждого из (i) X, (ii) Y и (iii) X и Y, так же, как если бы каждый из них был изложен в настоящем описании индивидуально.

В контексте настоящего описания термин «примерно» обозначает интервал точности, который будет понятен специалисту с обычной квалификацией, для обеспечения технического эффекта рассматриваемого признака. Термин обычно обозначает отклонение от указанного числового значения на $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,9\%$, $\pm 0,8\%$, $\pm 0,7\%$, $\pm 0,6\%$, $\pm 0,5\%$, $\pm 0,4\%$, $\pm 0,3\%$, $\pm 0,2\%$, $\pm 0,1\%$, $\pm 0,05\%$ и, например, $\pm 0,01\%$. Специалисту в данной области будет понятно, что конкретное такое отклонение

числового значения для данного технического эффекта будет зависеть от природы технического эффекта. Например, природный или биологический технический эффект обычно может иметь большее отклонение, чем антропогенный или инженерно-технический эффект.

Термин «связывающий агент» в контексте настоящего описания относится к любому агенту, способному связываться с целевыми антигенами. В некоторых вариантах осуществления настоящего описания связывающий агент представляет собой антитело, фрагмент антитела или его конструкцию. Связывающий агент может также содержать синтетические, модифицированные или неприродные фрагменты, в частности, непептидные фрагменты. Такие фрагменты могут, например, связывать целевые антигенсвязывающие функциональные группы или области, такие как антитела или фрагменты антител. В одном варианте осуществления связывающий агент представляет собой синтетическую конструкцию, содержащую антигенсвязывающие CDR или вариабельные области.

Используемый в настоящем описании термин «иммунная контрольная точка» относится к регуляторам иммунной системы и, в частности, к костимулирующим и ингибирующим сигналам, которые регулируют амплитуду и качество распознавания антигена Т-клеточным рецептором. В некоторых вариантах осуществления иммунная контрольная точка представляет собой ингибирующий сигнал. В некоторых вариантах осуществления ингибирующий сигнал представляет собой взаимодействие между PD-1 и PD-L1 и/или PD-L2. В некоторых вариантах осуществления ингибирующим сигналом является взаимодействие между CTLA-4 и CD80 или CD86 с целью замещения связывания CD28. В некоторых вариантах осуществления ингибирующим сигналом является взаимодействие между молекулами LAG-3 и МНС класса II. В некоторых вариантах осуществления ингибирующим сигналом является взаимодействие между TIM-3 и одним или более его лигандами, такими как галектин 9, PtdSer, HMGB1 и CEACAM1. В некоторых вариантах осуществления ингибирующий сигнал представляет собой взаимодействие между одним или более KIR и их лигандами. В некоторых вариантах осуществления ингибирующий сигнал представляет собой взаимодействие между TIGIT и одним или более его лигандами, PVR, PVRL2 и PVRL3. В некоторых вариантах осуществления ингибирующим сигналом является взаимодействие между CD94/NKG2A и HLA-E. В некоторых вариантах осуществления ингибирующий сигнал представляет собой взаимодействие между VISTA и ее партнером(ами) по связыванию. В некоторых вариантах осуществления ингибирующий сигнал представляет собой взаимодействие между одним или более Siglecs и их лигандами. В некоторых вариантах осуществления ингибирующий сигнал представляет собой взаимодействие между GARP и одним или более его лигандами. В некоторых вариантах осуществления ингибирующим сигналом является взаимодействие между CD47 и SIRP α . В некоторых вариантах осуществления ингибирующим сигналом является взаимодействие между PVRIG и PVRL2. В некоторых вариантах осуществления ингибирующий сигнал представляет собой взаимодействие

между CSF1R и CSF1. В некоторых вариантах осуществления ингибирующим сигналом является взаимодействие между BTLA и HVEM. В некоторых вариантах осуществления ингибирующий сигнал является частью аденозинэргического пути, например, взаимодействия между A2AR и/или A2BR и аденозином, продуцируемым CD39 и CD73. В некоторых вариантах осуществления ингибирующий сигнал представляет собой взаимодействие между B7-H3 и его рецептором и/или B7-H4 и его рецептором. В некоторых вариантах осуществления ингибирующий сигнал опосредован IDO, CD20, NOX или TDO.

Термины «ингибитор контрольной точки» (CPI) и «ингибитор иммунной контрольной точки (ICP)» используются в настоящем описании как синонимы. Термины относятся к молекулам, таким как связывающие агенты, которые полностью или частично уменьшают, ингибируют, препятствуют или отрицательно модулируют один или более белков контрольных точек, или которые полностью или частично уменьшают, ингибируют, препятствуют или отрицательно модулируют экспрессию одного или более белков контрольных точек, подобно молекулам, таким как связывающие агенты, которые ингибируют иммунную контрольную точку, в частности, которые ингибируют ингибирующий сигнал иммунной контрольной точки. В одном варианте осуществления ингибитор иммунной контрольной точки связывается с одним или более белками контрольных точек. В одном варианте осуществления ингибитор иммунной контрольной точки связывается с одной или более молекулами, регулирующими белки контрольных точек. В одном варианте осуществления ингибитор иммунной контрольной точки связывается с предшественниками одного или более белков контрольной точки, например, на уровне ДНК или РНК. Можно использовать любой агент, который действует как ингибитор контрольной точки в соответствии с настоящим описанием. Термин «частично», используемый в настоящем описании, означает по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% уровня, например, уровня ингибирования белка контрольной точки.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки может представлять собой любое соединение, такое как любой связывающий агент, который ингибирует ингибирующий сигнал иммунной контрольной точки, где ингибирующий сигнал выбран из группы, состоящей из: взаимодействия между PD-1 и PD-L1 и /или PD-L2; взаимодействие между CTLA-4 и CD80 или CD86 для замены связывания CD28; взаимодействия между молекулами LAG-3 и МНС класса II; взаимодействия между TIM-3 и одним или более его лигандами, такими как галектин 9, PtdSer, HMGB1 и CEACAM1; взаимодействия одного или более KIR и их лигандов; взаимодействия между TIGIT и одним или более его лигандами, PVR, PVRL2 и PVRL3; взаимодействия между CD94/NKG2A и HLAЕ; взаимодействия между VISTA и его партнером(ами) по связыванию; взаимодействия между одним или более Siglecs и их лигандами; взаимодействия между GARP и одним или более его лигандами; взаимодействия между

CD47 и SIRP α ; взаимодействия между PVRIg и PVRL2; взаимодействия между CSF1R и CSF1; взаимодействия BTLA и HVEM; части аденозинэргического пути, например, взаимодействия между A2AR и/или A2BR и аденозином, продуцируемым CD39 и CD73; взаимодействия между B7-H3 и его рецептором и/или B7-H4 и его рецептором; ингибирующего сигнала, опосредованного IDO, CD20, NOX или TDO. В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из ингибиторов PD-1, ингибиторов PD-L1, ингибиторов PD-L2, ингибиторов CTLA-4, ингибиторов TIM-3, ингибиторов KIR, ингибиторов LAG-3, ингибиторов TIGIT, ингибиторов VISTA и ингибиторов GARP. В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки может представлять собой блокирующее антитело, такое как антитело, блокирующее PD-1, антитело, блокирующее CTLA4, антитело, блокирующее PD-L1, антитело, блокирующее PD-L2, антитело, блокирующее TIM-3, антитело, блокирующее KIR, антитело, блокирующее LAG-3, антитело, блокирующее TIGIT, антитело, блокирующее VISTA, или антитело, блокирующее GARP. Примеры антител, блокирующих PD-1, включают пембролизумаб, ниволумаб, цемиплимаб и спартализумаб. Примеры антител, блокирующих CTLA4, включают ипилимумаб и тремелиумаб. Примеры антител, блокирующих PD-L1, включают атезолизумаб, дурвалумаб и авелумаб.

Термин «иммуноглобулин» относится к белкам суперсемейства иммуноглобулинов, предпочтительно к антигенным рецепторам, таким как антитела или В-клеточный рецептор (BCR). Иммуноглобулины характеризуются структурным доменом, т. е. доменом иммуноглобулина, имеющим характерную для иммуноглобулина (Ig) сборку. Этот термин охватывает мембраносвязанные иммуноглобулины, а также растворимые иммуноглобулины. Мембраносвязанные иммуноглобулины также называют поверхностными иммуноглобулинами или мембранными иммуноглобулинами, которые обычно являются частью BCR. Растворимые иммуноглобулины обычно называют антителами.

Структура иммуноглобулинов хорошо охарактеризована. См., например, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Вкратце, иммуноглобулины обычно содержат несколько цепей, обычно две идентичные тяжелые цепи и две идентичные легкие цепи, которые связаны дисульфидными связями. Эти цепи в основном состоят из доменов или областей иммуноглобулина, таких как домен/область V_L или VL (вариабельная область легкой цепи), домен/область C_L или CL (константная область легкой цепи), домен/область V_H или VH (вариабельная область тяжелой цепи), и домены/области C_H или CH (константная область тяжелой цепи) C_{H1} (CH1), C_{H2} (CH2), C_{H3} (CH3) и C_{H4} (CH4). Константная область тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Шарнирная область представляет собой область между доменами CH1 и CH2 тяжелой цепи и обладает высокой гибкостью. Дисульфидные связи в шарнирной области являются частью взаимодействий между двумя тяжелыми цепями в молекуле IgG. Каждая легкая цепь обычно состоит из VL и CL. Константная область

легкой цепи обычно состоит из одного домена, CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или форме структурно определяемых петель), также их называют областями, отвечающими за комплементарность связывания (CDR), перемежаясь участками, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL обычно состоит из трех CDR и четырех FR, располагающихся от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (см., также Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). Если не указано иное или не противоречит контексту, последовательности CDR в настоящем описании идентифицируются в соответствии с правилами IMGT с использованием DomainGapAlign (Lefranc MP., Nucleic Acids Research 1999; 27:209-212 и Ehrenmann F., Kaas Q. and Lefranc M.-P. Nucleic Acids Res., 38, D301-307 (2010); см. также [http-адрес в Интернете www.imgt.org](http://www.imgt.org). Если иное не указано или не противоречит контексту, ссылки на положения аминокислот в константных областях в настоящем описании соответствуют нумерации EU (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1969 May;63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. 1991 NIH Publication No. 91-3242).

Существует пять типов тяжелых цепей иммуноглобулинов млекопитающих, т. е. α , δ , ϵ , γ , и μ , которые отвечают за различные классы антител, т. е. IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. В отличие от тяжелых цепей растворимых иммуноглобулинов, тяжелые цепи мембранных или поверхностных иммуноглобулинов содержат трансмембранный домен и короткий цитоплазматический домен на C-конце. У млекопитающих есть два типа легких цепей: лямбда и каппа. Цепи иммуноглобулина содержат вариабельную область и константную область. Константная область по существу консервативна в различных изоформах иммуноглобулинов, при этом вариабельная часть сильно различается и отвечает за распознавание антигена.

Термины «аминокислота» и «аминокислотный остаток» могут использоваться в настоящем описании взаимозаменяемо, и их не следует понимать как ограничивающие. Аминокислоты представляют собой органические соединения, содержащие амино- ($-NH_2$) и карбоксильные ($COOH$) функциональные группы, а также боковую цепь (группу R), специфичную для каждой аминокислоты. В контексте настоящего изобретения аминокислоты могут быть классифицированы на основе структуры и химических характеристик. Таким образом, классы аминокислот могут быть отражены в одной или обеих следующих таблицах:

Таблица 2: Основная классификация, основанная на строении и общей химической характеристике группы R.

Класс	Аминокислота
Кислые остатки	D and E
Основные остатки	K, R, and H

Гидрофильные незаряженные остатки	S, T, N, and Q
Алифатические незаряженные остатки	G, A, V, L, and I
Неполярные незаряженные остатки	C, M, and P
Ароматические остатки	F, Y, and W

Таблица 3: Альтернативные физические и функциональные классификации аминокислотных остатков

Класс	Аминокислота
Остатки, содержащие гидроксильную группу	S and T
Алифатические остатки	I, L, V, and M
Циклоалкенил-ассоциированные остатки	F, H, W, and Y
Гидрофобные остатки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, and Y
Отрицательно заряженные остатки	D and E
Полярные остатки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, and T
Положительно заряженные остатки	H, K, and R
Малые остатки	A, C, D, G, N, P, S, T, and V
Остатки очень малого размера	A, G, and S
Остатки, вовлеченные в образование изгиба	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, and T
Гибкие остатки	Q, T, K, S, G, P, D, E, and R

Для целей настоящего описания «варианты» аминокислотной последовательности (пептида, белка или полипептида) включают варианты вставки аминокислот, варианты добавления аминокислот, варианты делеции аминокислот и/или варианты замены аминокислот. Термин «вариант» включает все мутанты, варианты сплайсинга, посттрансляционно модифицированные варианты, конформации, изоформы, аллельные варианты, видовые варианты и видовые гомологи, в частности те, которые встречаются в природе. Термин «вариант» включает, в частности, фрагменты аминокислотной последовательности.

Аминокислотные варианты со вставкой включают вставки одной или двух или более аминокислот в конкретную аминокислотную последовательность. В случае вариантов аминокислотной последовательности, имеющих вставку, один или более аминокислотных остатков вставляются в конкретный участок аминокислотной последовательности, хотя также возможна случайная вставка с соответствующим скринингом полученного продукта.

Варианты добавления аминокислот включают слияния на амино- и/или карбокси-концах одной или более аминокислот, как например 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 или более аминокислот.

Варианты с делецией аминокислот характеризуются удалением одной или более

аминокислот из последовательности, как например, удалением 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 или более аминокислот. Делеции могут находиться в любом положении белка. Делеционные варианты аминокислот, которые включают делецию на N-концевом и/или C-концевом участке белка, также называются N-концевыми и/или C-концевыми укороченными вариантами.

Аминокислотные варианты с заменой характеризуются тем, что, по меньшей мере, один остаток в последовательности удаляется, а другой остаток вставляется на его место. Замену одной аминокислоты на другую можно классифицировать как консервативную или неконсервативную замену. Предпочтение отдается модификациям в положениях аминокислотной последовательности, которые не являются консервативными между гомологичными белками или пептидами, и/или замене аминокислот другими аминокислотами, имеющими сходные свойства. Предпочтительно, аминокислотные замены в вариантах пептидов и белков представляют собой консервативные аминокислотные замены, т. е. замены одинаково заряженных или незаряженных аминокислот. Консервативная замена аминокислот включает замену одной аминокислоты из семейства аминокислот, родственных по боковым цепям. В контексте настоящего изобретения «консервативная замена» представляет собой замену одной аминокислоты на другую аминокислоту, имеющую аналогичные структурные и/или химические характеристики, такую замену одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток того же класса, что и определенные в любой из двух таблиц выше: например, лейцин может быть заменен изолейцином, поскольку они оба являются алифатическими разветвленными гидрофобами. Аналогично, аспарагиновую кислоту можно заменить глутаминовой кислотой, поскольку обе они представляют собой небольшие отрицательно заряженные остатки. Встречающиеся в природе аминокислоты также можно разделить на четыре семейства: кислые (аспартат, глутамат), основные (лизин, аргинин, гистидин), неполярные (аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан) и незаряженные полярные (глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин) аминокислоты. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют совместно как ароматические аминокислоты. В одном варианте осуществления консервативные аминокислотные замены включают замены в следующих группах:

- глицин, аланин;
- валин, изолейцин, лейцин;
- аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота;
- аспарагин, глутамин;
- серин, треонин;
- лизин, аргинин; и
- фенилаланин, тирозин.

Термин «аминокислота, соответствующая положению...» и подобные выражения, используемые в настоящем описании, относятся к номеру положения аминокислоты в

тяжелой цепи IgG1 человека. Соответствующие положения аминокислот в других иммуноглобулинах можно найти путем выравнивания с IgG1 человека. Таким образом, аминокислота или сегмент в одной последовательности, которая «соответствует» аминокислоте или сегменту в другой последовательности, является аминокислотой или сегментом, который выравнивается с другой аминокислотой или сегментом с использованием стандартной программы выравнивания последовательностей, такой как ALIGN, ClustalW или аналогичной, обычно с настройками по умолчанию и имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с тяжелой цепью IgG1 человека. Считается, что в данной области техники хорошо известно, как выровнять последовательность или сегмент в последовательности и тем самым определить положение в последовательности, соответствующее положению аминокислоты, согласно настоящему изобретению.

Термин «антитело» (Ab) в контексте настоящего изобретения относится к молекуле иммуноглобулина, фрагменту молекулы иммуноглобулина или производному любого из них, которое обладает способностью специфически связываться с антигеном (в частности, с эпитопом на антигене) в типичных физиологических условиях, предпочтительно с периодом полужизни, составляющим значительные периоды времени, например, по меньшей мере примерно 30 минут, по меньшей мере примерно 45 минут, по меньшей мере примерно один час, по меньшей мере примерно два часа, по меньшей мере примерно четыре часа, по меньшей мере примерно 8 часов, по меньшей мере примерно 12 часов, примерно 24 часа или более, примерно 48 часов или более, примерно 3, 4, 5, 6, 7 или более дней и т. д., или любые другие соответствующие функционально-определенные периоды (например, время, достаточное для индукции, стимулирования, усиления и/или модуляции физиологического ответа, связанного со связыванием антитела с антигеном, и/или время, достаточное для того, чтобы антитело задействовало эффекторную активность). В частности, термин «антитело» относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Термин «антитело» включает моноклональные антитела, рекомбинантные антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела и комбинации любого из вышеперечисленного. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Переменные области и константные области также называются в настоящем описании переменными доменами и константными доменами, соответственно. Области VH и VL можно далее подразделить на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность, (CDR), перемежающимися более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. CDR VH называются HCDR1, HCDR2 и HCDR3 (или CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3),

CDR VL называются LCDR1, LCDR2 и LCDR3 (или CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L). Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антитела включают константную область тяжелой цепи (CH) и константную область легкой цепи (CL), где CH может быть дополнительно подразделена на константный домен CH1, шарнирную область и константные домены CH2 и CH3 (расположенные от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: CH1, CH2, CH3). Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q. Антитела могут представлять собой интактные иммуноглобулины, полученные из природных источников или из рекомбинантных источников, и могут представлять собой иммуноактивные части интактных иммуноглобулинов. Антитела обычно представляют собой тетрамеры молекул иммуноглобулинов. Антитела могут существовать в различных формах, включая, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, Fv, Fab и F(ab)₂, а также одноцепочечные антитела и гуманизированные антитела.

Вариабельные области тяжелой и легкой цепей молекулы иммуноглобулина содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Термины «связывающая область» и «антигенсвязывающая область» используются в настоящем описании взаимозаменяемо и относятся к области, которая взаимодействует с антигеном и содержит как область VH, так и область VL. Антитело, используемое в настоящем описании, включает не только моноспецифические антитела, но также и полиспецифические антитела, которые содержат множество, например, две или более, например, три или более, различных антигенсвязывающих областей.

Как указано выше, термин «антитело» в настоящем описании, если не указано иное или явно не противоречит контексту, включает фрагменты антитела, которые являются антигенсвязывающими фрагментами, т. е. сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществлена с помощью фрагментов полноразмерного антитела. Примеры антигенсвязывающих фрагментов, охватываемых термином «антитело», включают (i) Fab'- или Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, или моновалентное антитело, как описано в WO 2007/059782 (Genmab); (ii) F(ab')₂-фрагменты, бивалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий по существу из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий по существу из доменов VL и VH одного плеча антитела; (v) фрагмент dAb (Ward et al., Nature 341, 544546 (1989)), который состоит по существу из домена VH и также называется доменным антителом (Holt et al.; Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):484-90); (vi) молекулы верблюдовых или наноантитела (Revets et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5(1):111-24); и (vii) выделенную область, определяющую комплементарность (CDR). Более того, хотя два домена фрагмента Fv, VL

и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединить с помощью рекомбинантных методов синтетическим линкером, который позволяет создавать из них единую белковую цепь, в которой VL- и VH-области спариваются с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), см., например, Bird et al., Science 242, 423426 (1988) и Huston et al., PNAS USA 85, 58795883 (1988)). Такие одноцепочечные антитела охвачены термином антитело до тех пор, пока не определено иначе или явно не указано по контексту. Хотя такие фрагменты обычно включены в понятие «антитело», они вместе и каждый независимо представляют собой уникальные особенности настоящего изобретения, демонстрируя различные биологические свойства и полезность. Эти и другие полезные фрагменты антител в контексте настоящего изобретения, а также биспецифические форматы таких фрагментов обсуждаются далее в настоящем описании. Также следует понимать, что термин антитело, пока не определено иначе, также включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAb), антитело-подобные полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела, и фрагменты антитела, сохраняющие способность специфического связывания с антигеном (антигенсвязывающие фрагменты), полученные с помощью известных методов, таких как ферментативное расщепление, пептидный синтез и рекомбинантные методы.

При генерировании антитело может обладать любым изотипом. В настоящем описании термин «изотип» относится к классу иммуноглобулинов (например, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgD, IgA (например, IgA1, IgA2), IgE, IgM или IgY), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. Когда конкретный изотип, например, IgG1 упоминается в настоящем описании, этот термин не ограничивается конкретной последовательностью изотипа, например определенной последовательностью IgG1, но используется для указания того, что антитело по последовательности ближе к этому изотипу, например IgG1, чем к другим изотипам. Таким образом, например, антитело IgG1, раскрытое в настоящем описании, может представлять собой вариант последовательности встречающегося в природе антитела IgG1, включая вариации константных областей.

Антитела IgG1 могут существовать в нескольких полиморфных вариантах, называемых аллотипами (рассмотрено в Jefferis and Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Issue 4 1-7), любые из которых подходят для использования в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения. Обычными аллотипическими вариантами в человеческих популяциях являются те, которые обозначаются буквами a, f, n, z или их комбинациями. В любом из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело может содержать Fc-область тяжелой цепи, содержащую Fc-область IgG человека. В дополнительных вариантах осуществления Fc-область IgG человека содержит IgG1 человека.

Термин «полиспецифическое антитело» в контексте настоящего описания относится к антителу, имеющему по меньшей мере две разные антигенсвязывающие области, определяемые разными последовательностями антитела. В некоторых вариантах

осуществления указанные разные антигенсвязывающие области связывают разные эпитопы одного и того же антигена. Однако в предпочтительных вариантах осуществления указанные разные антигенсвязывающие области связывают разные целевые антигены. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело представляет собой «биспецифическое антитело» или «bs». Полиспецифическое антитело, такое как биспецифическое антитело, может иметь любой формат, включая любой из форматов биспецифического или полиспецифического антитела, описанных ниже.

Термин «полноразмерный», когда он используется в контексте антитела, указывает, что антитело не является фрагментом, а содержит все домены конкретного изотипа, обычно встречающиеся для этого изотипа в природе, например домены VH, CH1, CH2, CH3, шарнир, VL и CL для антитела IgG1.

Термин «человеческое антитело», используемый в настоящем описании, предназначен для включения антител, имеющих переменные и каркасные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека и константного домена иммуноглобулина человека. Человеческие антитела, раскрытые в настоящем описании, могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими зародышевыми последовательностями иммуноглобулинов (например, мутации, вставки или делеции, введенные неспецифическим или сайтспецифическим мутагенезом *in vitro* или соматическими мутациями *in vivo*). Однако термин «человеческое антитело», используемый в настоящем описании, не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида, отличного от человека, такого как мышь, были трансплантированы на человеческие каркасные последовательности.

Термин «химерное антитело», используемый в настоящем описании, относится к антителу, в котором переменная область получена из вида, отличного от человека (например, получена из грызунов), а константная область получена из другого вида, такого как человек. Химерные антитела могут быть получены с помощью конструирования антител. «Конструирование антител» представляет собой термин, используемый в общем для различных видов модификаций антител, и процессы конструирования антител хорошо известны специалисту. В частности, химерное антитело может быть получено с использованием стандартных методов ДНК, как описано в Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, Ch. 15. Таким образом, химерное антитело может представлять собой рекомбинантное антитело, сконструированное генетически или ферментативно. Специалисту в данной области техники известно, как получить химерное антитело, и, таким образом, создание химерного антитела может быть осуществлено другими способами, отличными от описанных в настоящем документе. Химерные моноклональные антитела для терапевтического применения у человека разрабатываются для снижения ожидаемой иммуногенности антител нечеловеческого происхождения, например антител грызунов. Обычно они могут содержать нечеловеческие (например, мышинные или

кроличьи) переменные области, которые специфичны в отношении интересующего антигена, а также константные домены тяжелой и легкой цепи человеческого антитела. Термины «переменная область» или «переменный домен», используемые в контексте химерных антител, относятся к области, которая включает CDR и каркасные области как тяжелой, так и легкой цепей иммуноглобулина, как описано ниже.

Термин «гуманизованное антитело», используемый в настоящем описании, относится к генетически сконструированному антителу, которое не является человеческим и которое содержит константные домены человеческого антитела и отличные от человеческих переменные домены, модифицированные таким образом, чтобы обеспечить высокий уровень гомологии последовательностей с человеческими переменными доменами. Этого можно достичь путем трансплантации шести определяющих комплементарность областей (CDR) антител, не являющихся человеческими, и которые вместе образуют антигенсвязывающий участок, на гомологичную человеческую акцепторную каркасную область (FR) (см. WO 92/22653 и EP0629240). Чтобы полностью восстановить аффинность связывания и специфичность исходного антитела, может потребоваться замена остатков каркаса исходного антитела (т. е. не являющегося человеческим антителом) человеческими каркасными областями (обратные мутации). Моделирование структурной гомологии может помочь идентифицировать аминокислотные остатки в каркасных областях, которые важны для связывающих свойств антитела. Таким образом, гуманизованное антитело может содержать последовательности CDR, не являющиеся человеческими, прежде всего, человеческие каркасные области, необязательно содержащие одну или более обратных мутаций аминокислот в аминокислотной последовательности, не являющейся человеческой, и полностью человеческие константные области. Необязательно, для получения гуманизованного антитела с предпочтительными характеристиками, такими как аффинность и биохимические свойства, могут быть применены дополнительные аминокислотные модификации, которые необязательно являются обратными мутациями.

В настоящем описании белок, который «происходит из» другого белка, например, родительского белка, означает, что одна или более аминокислотных последовательностей белка идентичны или сходны с одной или более аминокислотными последовательностями в другом или родительском белке. Например, в антителе, связывающем плече, антигенсвязывающей области, константной области или т. п., которое получено из другого или родительского антитела, связывающего плеча, антигенсвязывающей области или константной области, одна или более аминокислотных последовательностей являются идентичными или сходными с таковыми другого или родительского антитела, связывающего плеча, антигенсвязывающей области или константной области. Примеры таких одной или более аминокислотных последовательностей включают, помимо прочего, последовательности CDR VH и VL и/или одну или более или все каркасные области, области VH, VL, CL, шарнир или CH. Например, гуманизованное антитело может быть описано в настоящем документе как «полученное из» родительского антитела, не

являющегося человеческим, что означает, что по меньшей мере последовательности CDR VL и VH идентичны или сходны с последовательностями CDR VH и VL указанного родительского антитела, не являющегося человеческим. Химерное антитело может быть описано в настоящем документе как «полученное из» родительского антитела, не являющегося человеческим, что означает, что обычно последовательности VH и VL могут быть идентичными или сходными с последовательностями родительского антитела, не являющегося человеческим. Другим примером является связывающее плечо или антигенсвязывающая область, которые могут быть описаны в настоящем документе как «полученные из» конкретного родительского антитела, что означает, что указанное связывающее плечо или антигенсвязывающая область обычно содержит идентичные или сходные CDR VH и/или VL, или последовательности VH и/или VL со связывающим плечом или антигенсвязывающей областью указанного родительского антитела. Однако, как описано где-либо в настоящем документе, модификации аминокислот, такие как мутации, могут быть выполнены в CDR, константных областях или где-либо еще в антителе, связывающем плече, антигенсвязывающей области и т. п. для придания целевых характеристик. При использовании в контексте одной или более последовательностей, полученных из первого или родительского белка, «похожая» аминокислотная последовательность предпочтительно имеет идентичность последовательности по меньшей мере примерно 50%, например, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95% или по меньшей мере примерно 97%, 98% или 99%.

Антитела нечеловеческого происхождения могут вырабатываться у ряда различных видов, таких как мышь, кролик, курица, морская свинка, лама и коза.

Моноклональные антитела можно получать различными методами, включая общепринятую методику получения моноклональных антител, например, стандартную методику гибридизации соматических клеток Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Могут быть использованы и другие методы получения моноклональных антител, например, вирусная или онкогенная трансформация В-лимфоцитов или методы фагового дисплея с использованием библиотек генов антител, и такие методы хорошо известны специалисту в данной области.

Производство гибридом у таких видов, отличных от человека, является хорошо отработанной процедурой. Протоколы иммунизации и способы выделения спленоцитов иммунизированных животных/видов, отличных от человека, для слияния известны в данной области техники. Также известны партнеры по слиянию (например, клетки мышинной миеломы) и процедуры слияния.

Используемый в настоящем описании термин «Fab-плечо» или «плечо», если это не противоречит контексту, относится к одной паре тяжелая цепь-легкая цепь и используется в настоящем описании взаимозаменяемо с «полумолекулами».

Термин «связывающее плечо, содержащее антигенсвязывающую область» означает молекулу или фрагмент антитела, которая содержит антигенсвязывающую область. Таким

образом, связывающее плечо может содержать, например, шесть последовательностей CDR VH и VL, последовательности VH и VL, Fab или Fab'-фрагмент или Fab-плечо.

Используемый в настоящем описании термин «область Fc», если это не противоречит контексту, относится к области антитела, состоящей из двух последовательностей Fc тяжелых цепей иммуноглобулина, причем указанные последовательности Fc содержат по меньшей мере шарнирную область, домен CH2 и домен CH3. В одном варианте осуществления термин «область Fc», используемый в настоящем описании, относится к области, содержащей в направлении от N-конца антитела к C-концу, по меньшей мере, шарнирную область, область CH2 и область CH3. Fc-область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента.

В контексте настоящего описания термин «индуцировать Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени», используемый в отношении антитела, включая полиспецифическое антитело, означает, что антитело индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию, причем такая функция, в частности, выбрана из списка связывания Fc-рецептора IgG (FcγR), связывания C1q, ADCC или CDC, в меньшей степени по сравнению с человеческим антителом IgG1, содержащим (i) те же самые последовательности CDR, в частности, содержащим ту же первую и вторую антигенсвязывающие области, как указанное антитело, и (ii) две тяжелые цепи, содержащие шарнирные области IgG1 человека, области CH2 и CH3.

Fc-опосредованную эффекторную функцию можно измерить путем связывания с FcγR, связывания с C1q или индукции Fc-опосредованной перекрестной сшивки через FcγR.

Термин «шарнирная область», используемый в настоящем описании, относится к шарнирной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, шарнирная область человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 216-230 согласно нумерации EU, как указано Kabat (Kabat, E.A. et al., Sequences of protein of immunological interest. (91) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 3242-1991). Однако шарнирная область также может относиться к любому из других подтипов, описанных в настоящем документе.

Термин «область CH1» или «домен CH1», используемый в настоящем описании, относится к области CH1 тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, область CH1 человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 118-215 в соответствии с нумерацией EU, как указано у Kabat (там же). Однако область CH1 также может относиться к любому из других подтипов, как описано в настоящем документе.

Термин «область CH2» или «домен CH2», используемый в настоящем описании, относится к области CH2 тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, область CH2 человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 231-340 согласно нумерации EU, изложенной у Kabat (там же). Однако область CH2 также может представлять собой

любую из других подтипов, как описано в настоящем документе.

Термин «область СНЗ» или «домен СНЗ», используемый в настоящем описании, относится к области СНЗ тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, область СНЗ человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 341-447 в соответствии с нумерацией EU, изложенной Kabat (там же). Однако область СНЗ также может представлять собой любую из других подтипов, как описано в настоящем документе.

Термин «моновалентное антитело» в контексте настоящего описания означает, что молекула антитела способна связывать одну молекулу антигена и, таким образом, не способна к перекрестному сшиванию антигена.

«Антитело CD137» или «антитело против CD137» представляет собой описанное выше антитело, которое специфически связывается с антигеном CD137.

«Антитело CD137xPD-L1» или «антитело против CD137xPD-L1» представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит две разные антигенсвязывающие области, одна из которых специфически связывается с антигеном CD137, а другая специфически связывается с антигеном PD-L1.

Термин «биоподобный» (например, одобренного эталонного продукта/биологического препарата), используемый в настоящем описании, относится к биологическому продукту, который аналогичен эталонному продукту на основании данных (a) аналитических исследований, демонстрирующих, что биологический продукт очень похож на эталонный продукт, несмотря на незначительные различия в клинически неактивных компонентах; (b) исследований на животных (включая оценку токсичности); и/или (c) клинического исследования или исследований (включая оценку иммуногенности и фармакокинетики или фармакодинамики), достаточных для демонстрации безопасности, чистоты и эффективности в одном или более подходящих условиях использования, для которых эталонный продукт одобрен и предназначен для использования и для чего требуется одобрение (например, отсутствие клинически значимых различий между биологическим продуктом и эталонным продуктом с точки зрения безопасности, чистоты и эффективности продукта). В некоторых вариантах осуществления биоподобный биологический продукт и эталонный продукт используют один и тот же механизм или механизмы действия для условий или условий применения, предписанных, рекомендованных или предложенных в предлагаемой инструкции по применению, но только в той степени, в которой механизм или механизмы действия известны для эталонного продукта. В некоторых вариантах осуществления условия или условия использования, предписанные, рекомендованные или предложенные в инструкции по применению биологического продукта, были ранее одобрены для эталонного продукта. В некоторых вариантах осуществления способ введения, лекарственная форма и/или дозировка биологического продукта такие же, как у эталонного продукта. Биоаналог может представлять собой, например, известное в настоящее время антитело, имеющее ту же первичную аминокислотную последовательность, что и коммерческие антитела, но может быть получено из разных типов клеток или с использованием других методов

производства, очистки или приготовления состава.

Используемые в настоящем описании термины «связывание» или «связывающая способность» в контексте связывания антитела с заданным антигеном или эпитопом обычно означают связывание с аффинностью, соответствующей K_D примерно 10^{-7} М или меньше, например примерно 10^{-8} М или меньше, например, примерно 10^{-9} М или меньше, примерно 10^{-10} М или меньше или примерно 10^{-11} М или даже меньше, при определении с помощью биослойной интерферометрии (BLI) или, например, при определении с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIAcore 3000 с использованием антигена в качестве лиганда и антитела в качестве аналита. Антитело связывается с заранее определенным антигеном с аффинностью, соответствующей K_D , которая по меньшей мере в десять раз ниже, например, по меньшей мере в 100 раз ниже, например, по меньшей мере в 1000 раз ниже, например, по меньшей мере в 10000 раз ниже, например, по меньшей мере в 100000 раз ниже, чем его K_D для связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от заданного антигена или близкородственного антигена. Величина, при которой аффинность выше, зависит от K_D антитела, так что, когда K_D антитела очень низка (т. е. антитело высокоспецифично), тогда степень, до которой аффинность к антигену снижается ниже, чем аффинность к неспецифическому антигену, может быть по меньшей мере 10000-кратной.

Термин « k_D » (сек^{-1}), используемый в настоящем описании, относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Указанное значение также называется значением k_{off} .

Термин « K_D » (М), используемый в настоящем описании, относится к константе равновесия диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Два антитела имеют «одинаковую специфичность», если они связываются с одним и тем же антигеном и одним и тем же эпитопом. Распознает ли тестируемое антитело тот же эпитоп, что и определенное антигенсвязывающее антитело, т. е. связываются ли антитела с одним и тем же эпитопом, можно проверить различными методами, хорошо известными специалисту в данной области.

Конкуренцию между антителами можно обнаружить с помощью анализа перекрестного блокирования. Например, конкурентный анализ ИФА можно использовать в качестве анализа перекрестного блокирования. Например, целевой антиген может быть нанесен в лунки микропланшета и могут быть добавлены антигенсвязывающее антитело и кандидатное конкурирующее тестируемое антитело. Количество антигенсвязывающего антитела, связанного с антигеном в лунке, косвенно коррелирует со способностью связывания конкурирующего тестируемого кандидатного антитела, которое конкурирует с ним за связывание с тем же эпитопом. В частности, чем выше аффинность конкурирующего тестируемого кандидатного антитела к одному и тому же эпитопу, тем меньше количество антигенсвязывающего антитела, связанного с лункой, покрытой антигеном. Количество антигенсвязывающего антитела, связанного с лункой, можно измерить путем мечения антитела детектируемыми или измеримыми мечеными

веществами.

Антитело, конкурирующее за связывание антигена с другим антителом, например, антителом, содержащим переменные области тяжелой и легкой цепи, как описано в настоящем документе, или антителом, обладающим специфичностью к антигену другого антитела, например, антителом, содержащим переменные области тяжелой и легкой цепи, как описано в настоящем документе, может представлять собой антитело, содержащее варианты указанных переменных областей тяжелой и/или легкой цепи, как описано в настоящем документе, например модификации CDR и/или определенную степень идентичности, как описано в настоящем документе.

Термин «выделенное полиспецифическое антитело», используемый в настоящем описании, предназначен для обозначения полиспецифического антитела, которое по существу не содержит других антител, имеющих другую антигенную специфичность (например, выделенное биспецифическое антитело, которое специфически связывается с CD137 и PD-L1, по существу не содержит моноспецифических антител, которые специфически связываются с CD137 или PD-L1).

Термин «моноклональное антитело», используемый в настоящем описании, относится к препарату молекул антител одномолекулярного состава. Композиция моноклонального антитела демонстрирует уникальную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу.

Используемый в настоящем описании термин «гетеродимерное взаимодействие между первой и второй областями СНЗ» относится к взаимодействию между первой областью СНЗ и второй областью СНЗ в гетеродимерном антителе первая-СНЗ/вторая-СНЗ.

Используемый в настоящем описании термин «гомодимерные взаимодействия первой и второй областей СНЗ» относится к взаимодействию между первой областью СНЗ и другой первой областью СНЗ в гомодимерном антителе первая-СНЗ/первая-СНЗ и взаимодействию между второй областью СНЗ и еще одной второй областью СНЗ в гомодимерном антителе вторая-СНЗ/вторая-СНЗ.

Используемый в настоящем описании термин «гомодимерное антитело» относится к антителу, содержащему два первых Fab-плеча или полумолекулы, где аминокислотная последовательность указанных Fab-плеч или полумолекул является одинаковой.

Используемый в настоящем описании термин «гетеродимерное антитело» относится к антителу, содержащему первое и второе Fab-плеча или полумолекулу, где аминокислотные последовательности указанных первого и второго Fab-плеч или полумолекулы различны. В частности, область СНЗ, или антигенсвязывающая область, или область СНЗ и антигенсвязывающая область указанных первого и второго Fab-плечей/полумолекул различны.

Термин «восстанавливающие условия» или «восстанавливающая среда» относится к состоянию или среде, в которой субстрат, такой как остаток цистеина в шарнирной области антитела, с большей вероятностью станет восстановленным, чем окисленным.

Настоящее описание также относится к полиспецифическим антителам, таким как биспецифические антитела, содержащие функциональные варианты областей VL, областей VH или одной или более CDR биспецифических антител примеров. Функциональный вариант VL, VH или CDR, используемый в контексте биспецифического антитела, по-прежнему позволяет каждой антигенсвязывающей области биспецифического антитела сохранять по меньшей мере значительную часть (по меньшей мере примерно 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более) аффинности и/или специфичности/селективности родительского биспецифического антитела, и в некоторых случаях такое биспецифическое антитело может быть связано с большей аффинностью, селективностью и/или специфичностью, чем родительское биспецифическое антитело.

Такие функциональные варианты обычно сохраняют значительную идентичность последовательности родительского биспецифического антитела. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией числа идентичных положений совместно с последовательностями (т. е. % гомологии=числу идентичных положений/общее число положений x100), принимая во внимание число делеций и длину каждой делеции, которые должны появляться для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями, может быть определен, например, с помощью алгоритма E. Meyers and W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11-17 (1988), который включен в программу «ALIGN» (версия 2.0) с использованием таблицы масс остатков PAM120, штрафом за длину делеции равным 12 и штрафом за внесение делеции равным 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с помощью алгоритма Нидлмана и Вунша *J. Mol. Biol.* 48, 444-453 (1970).

В контексте настоящего изобретения, если не указано иное, для описания мутации используются следующие обозначения: i) замена аминокислоты в заданном положении записывается, например, K409R, что означает замену лизина в положении 409 белка на аргинин; и ii) для конкретных вариантов используются конкретные трех- или однобуквенные коды, включая коды Хаа и X для обозначения любого аминокислотного остатка. Так, замена лизина на аргинин в положении 409 обозначается как: K409R, а замена лизина на любой аминокислотный остаток в положении 409 обозначается как K409X. В случае удаления лизина в положении 409 это обозначается K409*.

Типичные варианты включают те, которые отличаются от VH, и/или VL, и/или CDR родительских последовательностей главным образом консервативными заменами; например, 12 замен, как например, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замена в варианте представляют собой консервативные замены аминокислотных остатков.

В контексте настоящего изобретения консервативные замены могут определяться заменами внутри классов аминокислот, как определено в таблицах 2 и 3.

Термин «CD137», используемый в настоящем описании, относится к CD137 (4-1BB), также называемому членом 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли

(TNFRSF9), который является рецептором для лиганда TNFSF9/4-1BBL. Считается, что CD137 (4-1BB) участвует в активации Т-клеток. Другие синонимы CD137 включают, помимо прочего, рецептор лиганда 4-1BB, CDw137, гомолог Т-клеточного антигена 4-1BB и Т-клеточный антиген IIA. В одном варианте осуществления CD137 (4-1BB) представляет собой CD137 человека (4-1BB), имеющий номер доступа UniProt Q07011. Последовательность CD137 человека также показана в SEQ ID NO: 37. Аминокислоты 1-23 SEQ ID NO: 37 соответствуют сигнальному пептиду CD137 человека; тогда как аминокислоты 24-186 SEQ ID NO: 37 соответствуют внеклеточному домену CD137 человека; а остальная часть белка, т. е. аминокислоты 187-213 и 214-255 SEQ ID NO: 37, представляет собой трансмембранный и цитоплазматический домен, соответственно.

Рецептор «белка программируемой клеточной смерти-1 (PD-1)» относится к иммуноингибирующему рецептору, принадлежащему семейству CD28. PD-1 (также известный как CD279) экспрессируется преимущественно на ранее активированных Т-клетках *in vivo* и связывается с двумя лигандами: PD-L1 (также известным как B7-H1 или CD274) и PD-L2 (также известным как B7-DC или CD273). Используемый в настоящем описании термин «PD-1» включает PD-1 человека (hPD-1), варианты, изоформы и видовые гомологи hPD-1, а также аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с hPD-1. Последовательность PD-1 человека также показана в SEQ ID NO: 39. «Лиганд белка программируемой клеточной смерти-1 (PD-L1)» представляет собой один из двух гликопротеиновых лигандов клеточной поверхности для PD-1 (вторым является PD-L2), который подавляет активацию Т-клеток и секрецию цитокинов при связывании с PD-1.

Термин «PD-L1», используемый в настоящем описании, включает PD-L1 человека (hPD-L1), варианты, изоформы и видовые гомологи hPD-L1, такие как PD-L1 макака (яванского макака), африканского слона, дикого кабана и PD-L1 мыши (см., например, номер доступа Genbank. NP_054862.1, XP_005581836, XP_003413533, XP_005665023 и NP_068693, соответственно) и аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с hPD-L1. Последовательность PD-L1 человека также показана в SEQ ID NO: 40, где предполагается, что аминокислоты 1-18 являются сигнальным пептидом. Термин «PD-L2», используемый в настоящем описании, включает PD-L2 человека (hPD-L2), варианты, изоформы и видовые гомологи hPD-L2, а также аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с hPD-L2. Лиганды PD-1 (PD-L1 и PD-L2) экспрессируются на поверхности антигенпрезентирующих клеток, таких как дендритные клетки или макрофаги, и других иммунных клеток. Связывание PD-1 с PD-L1 или PD-L2 приводит к подавлению активации Т-клеток. Опухолевые клетки, экспрессирующие PD-L1 и/или PD-L2, способны отключать Т-клетки, экспрессирующие PD-1, что приводит к подавлению противоопухолевого иммунного ответа. Взаимодействие между PD-1 и его лигандами приводит к уменьшению количества инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, уменьшению пролиферации, опосредованной рецептором Т-клеток, и уклонению опухолевых клеток от иммунитета. Иммуносупрессию можно обратить вспять, ингибируя локальное взаимодействие PD-1 с PD-L1, и эффект является аддитивным, когда

взаимодействие PD-1 с PD-L2 также блокируется.

Термин «дисфункциональный», используемый в настоящем описании, относится к иммунной клетке, которая находится в состоянии пониженной иммунной реакции на стимуляцию антигеном. Дисфункциональный включает отсутствие ответа на распознавание антигена и нарушение способности транслировать распознавание антигена в последующие эффекторные функции Т-клеток, такие как пролиферация, выработка цитокинов (например, IL-2) и/или уничтожение клеток-мишеней.

Термин «анергия», используемый в настоящем описании, относится к состоянию невосприимчивости к антигенной стимуляции, возникающему в результате неполных или недостаточных сигналов, доставляемых через Т-клеточный рецептор (TCR). Т-клеточная анергия также может возникнуть при стимуляции антигеном в отсутствие костимуляции, в результате чего клетка становится невосприимчивой к последующей активации антигеном даже в контексте костимуляции. Состояние отсутствия ответа часто может быть преодолено присутствием IL-2. Анергические Т-клетки не подвергаются клональной экспансии и/или не приобретают эффекторных функций.

Термин «истощение», используемый в настоящем описании, относится к истощению иммунных клеток, например истощению Т-клеток как состоянию дисфункции Т-клеток, которое возникает в результате устойчивой передачи сигналов TCR, которое возникает во время многих хронических инфекций и злокачественного новообразования. Она отличается от анергии тем, что возникает не из-за неполной или недостаточной передачи сигналов, а из-за устойчивой передачи сигналов. Истощение определяется плохой эффекторной функцией, устойчивой экспрессией ингибирующих рецепторов и состоянием транскрипции, отличным от состояния функциональных эффекторных Т-клеток или Т-клеток памяти. Истощение препятствует оптимальному контролю заболеваний (например, инфекций и опухолей). Истощение может быть результатом как внешних путей отрицательной регуляции (например, иммунорегуляторных цитокинов), так и внутренних путей отрицательной регуляции клетки (путей ингибирующих иммунных контрольных точек, таких как описанные в настоящем документе).

«Усиление функции Т-клеток» означает индукцию, вызов или стимуляцию Т-клетки для обеспечения устойчивой или усиленной биологической функции или обновления или реактивации истощенных или неактивных Т-клеток. Примеры усиления функции Т-клеток включают повышенную секрецию γ -интерферона CD8⁺ Т-клетками, повышенную пролиферацию, повышенную чувствительность к антигену (например, клиренс опухоли) по сравнению с такими уровнями до вмешательства. В одном варианте осуществления уровень усиления составляет по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200% или более. Способы измерения этого усиления известны обычному специалисту в данной области техники.

Термин «ингибирующая нуклеиновая кислота» или «ингибирующая молекула нуклеиновой кислоты», используемый в настоящем описании, относится к молекуле

нуклеиновой кислоты, например, ДНК или РНК, которая полностью или частично снижает, ингибирует, препятствует или отрицательно модулирует один или более белков PD-1. Ингибирующие молекулы нуклеиновой кислоты включают, помимо прочего, олигонуклеотиды, миРНК, кшРНК, антисмысловые молекулы ДНК или РНК и аптамеры (например, аптамеры ДНК или РНК).

Термин «олигонуклеотид», используемый в настоящем описании, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая способна снижать экспрессию белка, в частности, экспрессию белка PD-1, как например, белков PD-1, описанных в настоящем документе. Олигонуклеотиды представляют собой короткие молекулы ДНК или РНК, обычно содержащие от 2 до 50 нуклеотидов. Олигонуклеотиды могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. Олигонуклеотид-ингибитор PD-1 может представлять собой антисмысловой олигонуклеотид.

Антисмысловые олигонуклеотиды представляют собой одноцепочечные молекулы ДНК или РНК, которые комплементарны данной последовательности, в частности, последовательности нуклеиновой кислоты (или ее фрагменту) белка PD-1. Антисмысловую РНК обычно используют для предотвращения белковой трансляции мРНК, например, мРНК, кодирующей белок PD-1, путем связывания с указанной мРНК. Антисмысловая ДНК обычно используется для нацеливания на специфическую комплементарную (кодирующую или некодирующую) РНК. Если связывание имеет место, такой гибрид ДНК/РНК может быть разрушен ферментом РНКазой H. Более того, морфолин-содержащие антисмысловые олигонуклеотиды могут быть использованы для нокдауна генов у позвоночных. Например, Kruczek et al., 2006 (J Exp Med, 203:871-81) разработали морфолино, специфичные для V7-N4, которые специфически блокируют экспрессию V7-N4 в макрофагах, что приводит к усилению пролиферации Т-клеток и уменьшению объемов опухоли у мышей с Т-клетками, специфичными для опухолеассоциированного антигена (ТАА).

Термины «миРНК», или «малая интерферирующая РНК», или «малая ингибирующая РНК» используются в настоящем описании взаимозаменяемо и относятся к молекуле двухцепочечной РНК с типичной длиной 20-25 пар оснований, которая препятствует экспрессии конкретного гена, такого как ген, кодирующий белок PD-1, с комплементарной нуклеотидной последовательностью. В одном варианте осуществления миРНК препятствует мРНК, тем самым блокируя трансляцию, например, трансляцию белка PD-1. Трансфекцию экзогенной миРНК можно использовать для нокдауна гена, однако эффект может быть лишь транзитным, особенно в быстро делящихся клетках. Стабильная трансфекция может быть достигнута, например, путем модификации РНК или использования экспрессирующего вектора. В данной области известны полезные модификации и векторы для стабильной трансфекции клеток миРНК. Последовательности миРНК также могут быть модифицированы для введения короткой петли между двумя цепями, что приводит к образованию «короткой шпильки РНК» или «кшРНК». кшРНК может быть преобразована в функциональную киРНК с помощью Dicer. кшРНК имеет

относительно низкую скорость деградации и обновления. Соответственно, ингибитор PD-1 может представлять собой кшРНК.

Термин «аптамер», используемый в настоящем описании, относится к одноцепочечной молекуле нуклеиновой кислоты, такой как ДНК или РНК, обычно длиной 25-70 нуклеотидов, которая способна связываться с молекулой-мишенью, такой как полипептид. В одном варианте осуществления аптамер связывается с белком PD-1, таким как белки PD-1, описанные в настоящем документе. Например, аптамер согласно настоящему описанию может специфически связываться с белком или полипептидом PD-1 или с молекулой сигнального пути, который модулирует экспрессию белка или полипептида PD-1. Получение и терапевтическое применение аптамеров хорошо известно в данной области (см., например, патент США 5475096).

Термины «низкомолекулярный ингибитор» или «низкомолекулярное соединение» используются в настоящем описании взаимозаменяемо и относятся к низкомолекулярному органическому соединению, обычно до 1000 дальтон, которое полностью или частично снижает, ингибирует, препятствует или отрицательно модулирует один или более белков PD-1, как описано выше. Такие низкомолекулярные ингибиторы обычно синтезируются методами органической химии, но их также можно выделить из природных источников, таких как растения, грибы и микробы. Низкая молекулярная масса позволяет низкомолекулярному ингибитору быстро диффундировать через клеточные мембраны. Например, различные антагонисты A2AR, известные в данной области, представляют собой органические соединения, имеющие молекулярную массу ниже 500 дальтон.

Термин «клеточная терапия» относится к трансплантации клеток (например, Т-лимфоцитов, дендритных клеток или стволовых клеток), экспрессирующих ингибитор PD-1, пациенту с целью лечения заболевания или расстройства (например, злокачественного новообразования).

Термин «онколитический вирус», используемый в настоящем описании, относится к вирусу, способному избирательно реплицироваться и замедлять рост или вызывать гибель опухолевых или гиперпролиферативных клеток, как *in vitro*, так и *in vivo*, при этом не оказывая никакого или минимальное воздействие на нормальные клетки. Онколитический вирус для доставки ингибитора PD-1 содержит экспрессирующую кассету, которая может кодировать ингибитор PD-1, который представляет собой ингибирующую молекулу нуклеиновой кислоты, такую как миРНК, кшРНК, олигонуклеотид, антисмысловая ДНК или РНК, аптамер, антитело или его фрагмент, или растворимый белок PD-1 или его гибрид. Онколитический вирус предпочтительно является компетентным в отношении репликации, и экспрессирующая кассета находится под контролем вирусного промотора, например, синтетического раннего/позднего промотора поксвируса. Типичные онколитические вирусы включают вирус везикулярного стоматита (VSV), рабдовирусы (например, пикорнавирусы, такие как вирус долины Сенека; SVV-001), вирус Коксаки, парвовирус, вирус болезни Ньюкасла (NDV), вирус

простого герпеса (HSV; OncoVEX GMCSF), ретровирусы (например, вирусы гриппа), вирус кори, реовирус, вирус Синбис, вирус коровьей оспы, как описано в качестве примера в WO 2017/209053 (включая штаммы Copenhagen, Western Reserve, Wyeth) и аденовирус (например, Delta-24, Delta-24-RGD, ICOVIR-5, ICOVIR-7, Onyx-015, ColoAd1, H101, AD5/3-D24-GMCSF). Получение рекомбинантных онколитических вирусов, содержащих растворимую форму ингибитора PD-1, и способы их применения раскрыты в WO 2018/022831, включенном в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. В качестве аттенуированных вирусов можно использовать онколитические вирусы.

«Курс лечения» в настоящем описании определяется как период времени, в пределах которого эффекты отдельных доз связывающего агента добавляются вследствие фармакодинамики связывающего агента, или, другими словами, период времени после того, как организм пациента по существу очищается от введенного связывающего агента. Несколько небольших доз в небольшом временном окне, например, в течение 2-24 часов, например, 2-12 часов или в тот же день, могут быть эквивалентны более крупной разовой дозе.

В настоящем контексте термин «лечение» или «терапевтическое вмешательство» относится к ведению и уходу за пациентом с целью борьбы с таким состоянием, как заболевание или расстройство. Термин предназначен для включения полного спектра лечения данного состояния, от которого страдает пациент, где лечение включает введение терапевтически эффективного соединения для смягчения симптомов или осложнений, для задержки прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, для смягчения или облегчения симптомов и осложнений и/или для излечения или устранения заболевания, расстройства или состояния, а также предотвращения состояния, где предотвращение следует понимать как ведение и уход за индивидуумом с целью борьбы с заболеванием, состоянием или расстройством и включает введение активных соединений для предотвращения появления симптомов или осложнений. В одном варианте осуществления «лечение» относится к введению эффективного количества терапевтически активного связывающего агента, такого как терапевтически активное антитело по настоящему изобретению, с целью ослабления, улучшения, купирования или искоренения (излечения) симптомов или болезненных состояний.

Ответ на лечение, а также устойчивость, отсутствие ответа и/или рецидив вследствие лечения связывающим агентом по настоящему изобретению можно определить в соответствии с критериями оценки ответа при солидных опухолях; версия 1.1 (Критерии RECIST v1.1). Критерии RECIST изложены в таблице ниже (LD: самый длинный список категорий).

Таблица 4: Определение ответа (критерии RECIST v1.1)

	Категория	Критерии
--	-----------	----------

На основе целевых поражений	Полный ответ (CR)	Исчезновение всех целевых поражений. Любые патологические лимфатические узлы должны иметь уменьшение по короткой оси до <10 мм.
	Частичный ответ (PR)	Снижение суммы LD целевых поражений на $\geq 30\%$, принимая в качестве эталона исходную сумму LD.
	Стабильное заболевание (SD)	Ни достаточного сокращения, чтобы квалифицировать PR, ни достаточного увеличения, чтобы квалифицировать PD, принимая в качестве эталона наименьшую сумму LD с момента начала лечения.
	Прогрессирующее заболевание (PD)	Увеличение суммы LD целевых поражений на $\geq 20\%$, принимая в качестве эталона наименьшую сумму LD, зарегистрированную с момента начала лечения или появления одного или более новых поражений.
На основе нецелевых поражений	CR	Исчезновение всех нецелевых поражений и нормализация уровня онкомаркеров. Все лимфатические узлы должны быть непатологическими по размеру (короткая ось < 10 мм).
	SD	Сохранение одного или более нецелевых поражений или/и поддержание уровня опухолевых маркеров выше нормальных пределов.
	PD	Появление одного или более новых поражений и/или явное прогрессирование существующих нецелевых поражений.

«Наилучший общий ответ» - это лучший ответ, зарегистрированный с начала лечения до прогрессирования/рецидива заболевания (наименьшие измерения, зарегистрированные с момента начала лечения, будут использоваться в качестве эталона для PD). Пациенты с CR или PR считаются объективными ответами. Пациенты с CR, PR или SD считаются контролирующими заболевание. Пациенты с NE считаются не ответившими. «Наилучший общий ответ» - это лучший ответ, зарегистрированный с начала лечения до прогрессирования/рецидива заболевания (наименьшие измерения, зарегистрированные с момента начала лечения, будут использоваться в качестве эталона

для PD). Пациенты с CR, PR или SD считаются контролирующими заболеванием. Пациенты с NE считаются не ответившими.

«Продолжительность ответа (DOR)» применяется только к пациентам, у которых подтвержденный наилучший общий ответ представляет собой CR или PR, и определяется как время от первого документирования объективного ответа опухоли (CR или PR) до даты первого PD или смерти из-за злокачественного новообразования как первоосновы.

«Выживаемость без прогрессирования (PFS)» определяется как количество дней от 1-го дня Курса 1 до первого документально подтвержденного прогрессирования или смерти по любой причине.

«Общая выживаемость (OS)» определяется как количество дней от 1-го дня курса 1 до смерти по любой причине. Если неизвестно, что пациент умер, то OS будет цензурирована в последнюю дату, когда стало известно, что пациент жив (на дату окончания или до нее).

В контексте настоящего изобретения термин «схема лечения» относится к структурированному плану лечения, предназначенному для улучшения и поддержания здоровья.

Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество связывающего агента, такого как антитело, такое как полиспецифическое антитело или моноклональное антитело, может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и вес индивидуума, а также способность связывающего агента вызвать у индивидуума желаемую реакцию. Терапевтически эффективным количеством является также такое количество, в котором любые токсические или вредные эффекты связывающего агента или его фрагмента перевешиваются терапевтически полезными эффектами. В случае, если реакция у пациента недостаточна при начальной дозе, можно использовать более высокие дозы (или, по сути, более высокие дозы, достигаемые другим, более локализованным путем введения). В случае возникновения нежелательных побочных эффектов у пациента при применении определенной дозы можно использовать более низкие дозы (или фактически более низкие дозы, достигаемые другим, более локализованным путем введения).

Используемый в настоящем описании термин «злокачественное новообразование» включает заболевание, характеризующееся aberrантно регулируемым клеточным ростом, пролиферацией, дифференцировкой, адгезией и/или миграцией. С помощью термина «опухолевая клетка» обозначают аномальную клетку, которая растет с помощью быстрой неконтролируемой клеточной пролиферации и продолжает расти после стимулов, которые инициировали прекращение нового роста.

Термин «злокачественное новообразование» согласно настоящему изобретению также включает метастазы рака. Под «метастазированием» понимают распространение

опухолевых клеток из места своего происхождения в другую часть организма. Образование метастаз представляет собой очень сложный процесс и зависит от отделения злокачественных клеток от первичной опухоли, инвазии внеклеточного матрикса, проникновения через эндотелиальную базальную мембрану для входа в брюшную полость и в сосуды, и затем при транспортировке с помощью кровотока от инфильтрации органов-мишеней. Наконец, рост новой опухоли, т. е. вторичной опухоли или метастатической опухоли в месте-мишени зависит от ангиогенеза. Опухолевое метастазирование часто происходит даже после удаления первичной опухоли, так как опухолевые клетки или компоненты могут оставаться и развивать метастатический потенциал. В одном варианте осуществления, термин «метастазирование» согласно настоящему описанию относится к «отдаленному метастазированию», которое относится к метастазированию, которое отдалено от первичной опухоли и региональной системы лимфатических узлов.

Такие термины, как «снижать», «ингибировать», «вмешиваться» и «отрицательно модулировать», используемые в настоящем документе, означают способность вызывать общее снижение, например, примерно на 5% или более, примерно на 10% или более, примерно на 15% или более, примерно на 20% или более, примерно на 25% или более, примерно на 30% или более, примерно на 40% или более, примерно на 50% или более, или примерно на 75% или более по уровню. Термин «ингибирует» или ему подобные выражения включает полное или по существу полное ингибирование, т. е. снижение до нуля или по существу до нуля.

Такие термины, как «увеличение» или «улучшение», в одном варианте осуществления относятся к увеличению или улучшению по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50% и по меньшей мере примерно на 80% или по меньшей мере примерно на 100%.

«Физиологическое рН» в контексте настоящего документа относится к рН 7,5 или примерно 7,5.

В настоящем описании «% по массе» относится к массовым процентам, которые представляют собой единицу концентрации, измеряющую количество вещества в граммах (г), выраженное в процентах от общей массы всей композиции в граммах (г).

Термин «TPS» или «показатель доли опухоли» относится к проценту опухолевых клеток, экспрессирующих PD-L1 на клеточной мембране. TPS обычно включает процент неопластических клеток, экспрессирующих PD-L1 с любой интенсивностью (слабой, умеренной или сильной), которую можно определить с помощью иммуногистохимического анализа с использованием диагностического мАт против PD-L1 человека, например антитело 20C3 и антитело 22C3, описанные в WO 2014/100079. Считается, что клетки экспрессируют PD-L1, если присутствует окрашивание мембран, включая клетки с частичным окрашиванием мембран.

Термин «замораживание» относится к затвердеванию жидкости, обычно с отводом тепла.

Термин «лиофилизация» относится к лиофилизации вещества путем его замораживания и последующего снижения окружающего давления (например, ниже 15 Па, например, ниже 10 Па, ниже 5 Па или 1 Па или меньше) для обеспечения возможности сублимации замороженной среды в веществе непосредственно из твердой фазы в газовую фазу. Таким образом, термин «лиофилизация» и «замораживание-высушивание» используются в настоящем описании взаимозаменяемо.

Термин «рекомбинантный» в контексте настоящего описания означает «полученный посредством генетического конструирования». В одном варианте осуществления «рекомбинантный объект» в контексте настоящего описания не встречается в природе.

Термин «природный», используемый в настоящем описании, обозначает тот факт, что объект может быть обнаружен в естественной среде. Например, пептид или нуклеиновая кислота, которая присутствует в организме (включая вирусы) и может быть выделена из источника в естественной среде, и которая не была специально модифицирована человеком в лаборатории, является природной. Термин «обнаруженный в природе» означает «присутствующий в природе» и включает в себя известные объекты, а также объекты, которые еще не были обнаружены и/или выделены из природного источника, но могут быть обнаружены и/или выделены в будущем из природного источника.

Согласно настоящему описанию термин «пептид» включает олиго- и полипептиды и относится к веществам, которые содержат примерно два или более, примерно 3 или более, примерно 4 или более, примерно 6 или более, примерно 8 или более, примерно 10 или более, примерно 13 или более, примерно 16 или более, примерно 20 или более и вплоть до примерно 50, примерно 100 или примерно 150 последовательных аминокислот, связанных друг с другом посредством пептидных связей. Термин «белок» относится к крупным пептидам, в частности пептидам, содержащим по меньшей мере примерно 151 аминокислоту, но термины «пептид» и «белок» используются здесь обычно как синонимы.

«Терапевтический белок» оказывает положительное или благоприятное воздействие на состояние или болезненное состояние пациента, когда он предоставляется пациенту в терапевтически эффективном количестве. В одном варианте осуществления терапевтический белок обладает лечебными или паллиативными свойствами и может вводиться для улучшения, смягчения, облегчения, обращения вспять, задержки начала или уменьшения тяжести одного или более симптомов заболевания или расстройства. Терапевтический белок может обладать профилактическими свойствами и может использоваться для задержки начала заболевания или для уменьшения тяжести такого заболевания или патологического состояния. Термин «терапевтический белок» включает цельные белки или пептиды и может также относиться к их терапевтически активным фрагментам. Он также может включать терапевтически активные варианты белка. Примеры терапевтически активных белков включают, помимо прочего, антигены для

вакцинации и иммуностимуляторы, такие как цитокины.

Термин «участок» относится к части. По отношению к конкретной структуре, такой как аминокислотная последовательность или белок термин его «участок» может означать непрерывную или дискретную часть указанной структуры.

Термины «часть» и «фрагмент» используются в настоящем описании взаимозаменяемо и относятся к непрерывному элементу. Например, часть структуры, такой как аминокислотная последовательность или белок, относится к непрерывному элементу указанной структуры. При использовании в контексте композиции термин «часть» означает часть композиции. Например, часть композиции может составлять любую часть от 0,1% до 99,9% (например, 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 50%, 90% или 99%) указанной композиции.

«Фрагмент» в отношении аминокислотной последовательности (пептида или белка) относится к части аминокислотной последовательности, т. е. к последовательности, которая представляет собой аминокислотную последовательность, укороченную на N-конце и/или C-конце. Фрагмент, укороченный на C-конце (N-концевой фрагмент), можно получить, например, путем трансляции укороченной открытой рамки считывания, в которой отсутствует 3'-конец открытой рамки считывания. Фрагмент, укороченный на N-конце (C-концевой фрагмент), можно получить, например, путем трансляции укороченной открытой рамки считывания, в которой отсутствует 5'-конец открытой рамки считывания, при условии, что укороченная открытая рамка считывания содержит старт-кодон, который служит для инициации трансляции. Фрагмент аминокислотной последовательности содержит, например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% аминокислотных остатков из аминокислотной последовательности. Фрагмент аминокислотной последовательности предпочтительно содержит по меньшей мере 6, в частности, по меньшей мере 8, по меньшей мере 12, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 50 или по меньшей мере 100 последовательных аминокислот из аминокислотной последовательности.

Согласно настоящему описанию часть или фрагмент пептида или белка предпочтительно обладает по меньшей мере одним функциональным свойством пептида или белка, из которого она получена. Такие функциональные свойства включают фармакологическую активность, взаимодействие с другими пептидами или белками, ферментативную активность, взаимодействие с антителами и селективное связывание нуклеиновых кислот. Например, фармакологически активный фрагмент пептида или белка обладает по меньшей мере одной из фармакологических активностей пептида или белка, из которого получен этот фрагмент. Часть или фрагмент пептида или белка предпочтительно содержит последовательность из по меньшей мере 6, в частности, по меньшей мере 8, по меньшей мере 10, по меньшей мере 12, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30 или по меньшей мере 50 последовательных аминокислот пептида или белка. Часть или фрагмент пептида или белка предпочтительно

содержит последовательность, содержащую до 8, в частности до 10, до 12, до 15, до 20, до 30 или до 55 последовательных аминокислот пептида или белка.

Под «вариантом» в настоящем описании подразумевается аминокислотная последовательность, которая отличается от родительской аминокислотной последовательности по меньшей мере одной аминокислотной модификацией. Исходная аминокислотная последовательность может представлять собой аминокислотную последовательность природного происхождения или дикого типа (WT) или может представлять собой модифицированную версию аминокислотной последовательности дикого типа. Предпочтительно вариант аминокислотной последовательности имеет по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с исходной аминокислотной последовательностью, например, от 1 до примерно 20 аминокислотных модификаций и предпочтительно от 1 до примерно 10 или от 1 до примерно 5 аминокислотных модификаций по сравнению с родительской.

Под «диким типом», или «WT», или «нативной» в настоящем описании подразумевается аминокислотная последовательность, которая встречается в природе, включая аллельные вариации. Аминокислотная последовательность, пептид или белок дикого типа имеет аминокислотную последовательность, которая не была преднамеренно модифицирована.

Предпочтительно степень сходства, предпочтительно идентичности между данной аминокислотной последовательностью и аминокислотной последовательностью, которая является вариантом указанной данной аминокислотной последовательности, будет составлять по меньшей мере примерно 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. Степень сходства или идентичности предпочтительно указывается для аминокислотной области, которая составляет по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90% или примерно 100% от всей длины эталонной аминокислотной последовательности. Например, если эталонная аминокислотная последовательность состоит из 200 аминокислот, то степень сходства или идентичности указывается предпочтительно для по меньшей мере примерно 20, по меньшей мере примерно 40, по меньшей мере примерно 60, по меньшей мере примерно 80, по меньшей мере примерно 100 по меньшей мере примерно 120, по меньшей мере примерно 140, по меньшей мере примерно 160, по меньшей мере примерно 180 или примерно 200 аминокислот, в некоторых вариантах осуществления непрерывно расположенных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления степень сходства или идентичности указана для всей длины эталонной аминокислотной последовательности. Выравнивание для определения сходства последовательностей, предпочтительно идентичности последовательностей, может быть выполнено с помощью известных в данной области инструментов, предпочтительно с использованием

наилучшего выравнивания последовательностей, например, с использованием Align, с использованием стандартных настроек, предпочтительно EMBOSS::needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5.

«Сходство последовательностей» означает процент аминокислот, которые либо идентичны, либо представляют собой консервативные аминокислотные замены. «Идентичность последовательностей» между двумя аминокислотными последовательностями указывает процент аминокислот, которые идентичны между последовательностями. «Идентичность последовательностей» между двумя последовательностями нуклеиновой кислоты указывает процент нуклеотидов, которые идентичны между последовательностями.

Термины «% идентичных» и «% идентичности» или подобные термины относятся, в частности, к проценту нуклеотидов или аминокислот, которые идентичны при оптимальном выравнивании между сравниваемыми последовательностями. Указанный процент является чисто статистическим, и различия между двумя последовательностями могут быть, но не обязательно, случайным образом распределены по всей длине сравниваемых последовательностей. Сравнение двух последовательностей обычно проводят путем сравнения последовательностей после оптимального выравнивания относительно сегмента или «окна сравнения» с целью идентификации локальных областей соответствующих последовательностей. Оптимальное выравнивание для сравнения может быть выполнено вручную или с помощью алгоритма локальной гомологии Смита и Уотермана, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482, с помощью алгоритма локальной гомологии Нидлмана и Вунша, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, с помощью алгоритма поиска сходства Пирсона и Липмана, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 2444, или с помощью компьютерных программ, использующих указанные алгоритмы (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, Висконсин). В некоторых вариантах осуществления процент идентичности двух последовательностей определяют с использованием алгоритма BLASTN или BLASTP, доступного на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) (например, по адресу blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). В некоторых вариантах осуществления параметры алгоритма, используемые для алгоритма BLASTN на веб-сайте NCBI, включают в себя: (i) Ожидаемый порог, установленный на 10; (ii) Размер слова установлен на 28; (iii) Максимальное количество совпадений в диапазоне запроса установлено равным 0; (iv) Баллы совпадения/несоответствия установлены на 1, -2; (v) Затраты на пробел установлены на Линейную величину; и (vi) используемый фильтр для областей низкой сложности. В некоторых вариантах осуществления параметры алгоритма, используемые для алгоритма BLASTP на веб-сайте NCBI, включают в себя: (i) Ожидаемый порог, установленный на 10; (ii) Размер слова установлен на 3; (iii) Максимальное количество совпадений в диапазоне запроса установлено равным 0; (iv) Матрица установлена на BLOSUM62; (v) Затраты на пробел установлены на «Существование»: 11 «Продление»: 1;

и (vi) корректировка условной композиционной матрицы оценок.

Процентную идентичность получают путем определения количества идентичных положений, которым соответствуют сравниваемые последовательности, деления этого числа на количество сравниваемых положений (например, количества положений в эталонной последовательности) и умножения этого результата на 100.

В некоторых вариантах осуществления степень сходства или идентичности указана для области, которая составляет по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90% или примерно 100% всей длины эталонной последовательности. Например, если эталонная аминокислотная последовательность состоит из 200 аминокислотных остатков, то степень идентичности указывается для по меньшей мере примерно 100, по меньшей мере примерно 120, по меньшей мере примерно 140, по меньшей мере примерно 160, по меньшей мере примерно 180 или примерно 200 аминокислотных остатков, в некоторых вариантах осуществления непрерывно расположенных аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления степень сходства или идентичности указана для всей длины эталонной последовательности.

Гомологичные аминокислотные последовательности согласно настоящему изобретению имеют по меньшей мере 40%, в частности по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% и предпочтительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотных остатков.

Варианты аминокислотной последовательности, описанные в настоящем документе, могут быть легко получены специалистом, например, путем манипуляций с рекомбинантной ДНК. Манипуляции с последовательностями ДНК для получения пептидов или белков, имеющих замены, добавления, вставки или делеции, подробно описаны, например, в Sambrook et al. (1989). Кроме того, описанные в настоящем документе пептиды и варианты аминокислот могут быть легко получены с помощью известных методов синтеза пептидов, таких как, например, твердофазный синтез и подобные методы.

В одном варианте осуществления фрагмент или вариант аминокислотной последовательности (пептида или белка) предпочтительно представляет собой «функциональный фрагмент» или «функциональный вариант». Термин «функциональный фрагмент» или «функциональный вариант» аминокислотной последовательности относится к любому фрагменту или варианту, проявляющему одно или более функциональных свойств, идентичных или сходных со свойствами аминокислотной последовательности, из которой он получен, т. е. он функционально эквивалентен. Что касается антигенов или антигенных последовательностей, одна конкретная функция представляет собой одну или более иммуногенных активностей, проявляемых аминокислотной последовательностью, из которой получен фрагмент или вариант.

Термин «функциональный фрагмент» или «функциональный вариант», используемый в настоящем описании, в частности, относится к варианту молекулы или последовательности, которая содержит аминокислотную последовательность, измененную одной или более аминокислотами по сравнению с аминокислотной последовательностью родительской молекулы или последовательности, и которая все еще способна выполнять одну или более функций родительской молекулы или последовательности, например, индуцировать иммунный ответ. В одном варианте осуществления модификации аминокислотной последовательности родительской молекулы или последовательности существенно не влияют и не изменяют характеристики молекулы или последовательности. В различных вариантах осуществления функция функционального фрагмента или функционального варианта может быть снижена, но все же присутствовать в значительной степени, например, иммуногенность функционального варианта может составлять по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90% родительской молекулы или последовательности. Однако в других вариантах осуществления иммуногенность функционального фрагмента или функционального варианта может быть повышена по сравнению с родительской молекулой или последовательностью.

Аминокислотная последовательность (пептид, белок или полипептид), «происходящая из» обозначенной аминокислотной последовательности (пептида, белка или полипептида), относится к происхождению первой аминокислотной последовательности. Предпочтительно, аминокислотная последовательность, полученная из конкретной аминокислотной последовательности, имеет аминокислотную последовательность, которая идентична, по существу идентична или гомологична этой конкретной последовательности или ее фрагменту. Аминокислотные последовательности, полученные из конкретной аминокислотной последовательности, могут быть вариантами этой конкретной последовательности или ее фрагмента. Например, специалисту в данной области техники будет понятно, что антигены, подходящие для использования в настоящем описании, могут быть изменены таким образом, что их последовательность будет отличаться от встречающихся в природе или нативных последовательностей, из которых они были получены, сохраняя при этом желаемую активность нативных последовательностей.

«Выделенный» означает измененный или удаленный из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественно присутствующие в живом животном, не являются «выделенными», но та же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сосуществующих материалов в своем естественном состоянии, являются «выделенными». Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать по существу в очищенной форме или могут существовать в ненативной среде, такой как, например, клетка-хозяин. В предпочтительном варианте осуществления связывающий агент, используемый в настоящем описании, находится по существу в очищенной форме.

Термин «генетическая модификация» или просто «модификация» включает трансфекцию клеток нуклеиновой кислотой. Термин «трансфекция» относится к введению нуклеиновых кислот, в частности, РНК, в клетку. Для целей настоящего изобретения термин «трансфекция» также включает введение нуклеиновой кислоты в клетку или поглощение нуклеиновой кислоты такой клеткой, где клетка может присутствовать у объекта, например, пациента. Таким образом, согласно настоящему изобретению клетка для трансфекции нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе, может присутствовать *in vitro* или *in vivo*, например, клетка может составлять часть органа, ткани и/или организма пациента. Согласно настоящему изобретению трансфекция может быть транзиторной или стабильной. Для некоторых применений трансфекции достаточно, чтобы трансфецированный генетический материал экспрессировался лишь транзиторно. РНК можно трансфецировать в клетки для транзиторной экспрессии закодированного ею белка. Поскольку нуклеиновая кислота, введенная в процессе трансфекции, обычно не интегрируется в ядерный геном, чужеродная нуклеиновая кислота будет разбавлена в результате митоза или деградирована. Клетки, позволяющие эпизодическую амплификацию нуклеиновых кислот, значительно снижают скорость разведения. Если желательно, чтобы трансфецированная нуклеиновая кислота действительно оставалась в геноме клетки и ее дочерних клеток, должна произойти стабильная трансфекция. Такая стабильная трансфекция может быть достигнута путем использования для трансфекции систем на основе вирусов или систем на основе транспозонов. Обычно нуклеиновая кислота, кодирующая антиген, транзиторно трансфецируется в клетки. РНК можно трансфецировать в клетки для транзиторной экспрессии закодированного ею белка.

Согласно настоящему описанию аналог пептида или белка представляет собой модифицированную форму указанного пептида или белка, из которой он получен, и обладает по меньшей мере одним функциональным свойством указанного пептида или белка. Например, фармакологически активный аналог пептида или белка обладает по меньшей мере одной из фармакологических активностей пептида или белка, из которого получен аналог. Такие модификации включают любую химическую модификацию и включают одиночные или множественные замены, делеции и/или добавления любых молекул, связанных с белком или пептидом, таких как углеводы, липиды и/или белки или пептиды. В одном варианте осуществления «аналоги» белков или пептидов включают модифицированные формы, возникающие в результате гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования, амидирования, пальмитоилирования, миристоилирования, изопренилирования, липидирования, алкилирования, дериватизации, введения защитных/блокирующих групп, протеолитического расщепления или связывания с антителом или с другим клеточным лигандом. Термин «аналог» также распространяется на все функциональные химические эквиваленты указанных белков и пептидов.

«Активация» или «стимуляция» в настоящем описании относится к состоянию

иммунной эффекторной клетки, такой как Т-клетка, которая была достаточно стимулирована для индукции детектируемой клеточной пролиферации. Активация также может быть связана с инициацией сигнальных путей, индуцированной выработкой цитокинов и детектируемыми эффекторными функциями. Термин «активированные иммунные эффекторные клетки» относится, среди прочего, к иммунным эффекторным клеткам, которые подвергаются клеточному делению.

Термин «праймирование» относится к процессу, при котором иммунная эффекторная клетка, такая как Т-клетка, вступает в первый контакт со своим специфическим антигеном и вызывает дифференцировку в эффекторные клетки, такие как эффекторные Т-клетки.

Термин «клональная экспансия» или «наращивание» относится к процессу, в котором размножается конкретный объект. В контексте настоящего описания этот термин предпочтительно используется в контексте иммунологического ответа, при котором иммунные эффекторные клетки стимулируются антигеном, пролиферируют, и специфическая иммунная эффекторная клетка, распознающая указанный антиген, амплифицируется. Предпочтительно клональная экспансия приводит к дифференцировке иммунных эффекторных клеток.

«Антиген» согласно настоящему изобретению охватывает любое вещество, которое вызывает иммунный ответ, и/или любое вещество, против которого направлен иммунный ответ или иммунный механизм, такой как клеточный ответ. Это также включает ситуации, когда антиген процессируется в антигенные пептиды, а иммунный ответ или иммунный механизм направлен против одного или более антигенных пептидов, в частности, если они представлены в контексте молекул МНС. В частности, «антиген» относится к любому веществу, предпочтительно пептиду или белку, которое специфически реагирует с антителами или Т-лимфоцитами (Т-клетками). Согласно настоящему описанию термин «антиген» включает любую молекулу, которая содержит по меньшей мере один эпитоп, такой как эпитоп Т-клеток. Предпочтительно антиген в контексте настоящего описания представляет собой молекулу, которая, необязательно после процессинга, индуцирует иммунную реакцию, которая предпочтительно является специфичной для антигена (включая клетки, экспрессирующие антиген). В одном варианте осуществления антиген представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолевый антиген, вирусный антиген или бактериальный антиген, или эпитоп, полученный из такого антигена.

Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте в молекуле, такой как антиген, т. е. к части или фрагменту молекулы, которая распознается иммунной системой, например, которая распознается антителами Т-клетками или В-клетками, в частности, когда они представлены в контексте молекул МНС. В одном варианте осуществления «эпитоп» означает белковую детерминанту, способную специфически связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и обычно имеют определенные трехмерные

структурные характеристики, а также определенные характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различают тем, что связывание с первыми, но не со вторыми, теряется в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании, и другие аминокислотные остатки, которые не участвуют непосредственно в связывании, например аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются или покрываются специфически антигенсвязывающим пептидом (другими словами, аминокислотный остаток находится в зоне действия специфически антигенсвязывающего пептида).

Эпитоп белка предпочтительно включает непрерывную или прерывистую часть указанного белка и предпочтительно составляет от примерно 5 до примерно 100 аминокислот, предпочтительно от примерно 5 до примерно 50, более предпочтительно от примерно 8 до примерно 10, наиболее предпочтительно от примерно 10 до примерно 25 аминокислот по длине, например, эпитоп может предпочтительно состоять из 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот по длине. Особенно предпочтительно, чтобы эпитоп в контексте настоящего описания представлял собой Т-клеточный эпитоп.

Термин «необязательный» или «необязательно», используемый в настоящем описании, означает, что описанное далее событие, обстоятельство или условие может произойти, а может и не произойти, и что описание включает случаи, когда указанное событие, обстоятельство или условие происходит, и случаи, в которых оно не происходит.

В настоящем описании термины «связанный», «слитый» или «слияние» используются взаимозаменяемо. Эти термины относятся к объединению двух или более элементов, компонентов или доменов.

Термин «заболевание» (также называемый в настоящем описании «расстройством») относится к аномальному состоянию, которое влияет на организм индивидуума. Заболевание часто истолковывается как медицинское состояние, связанное с конкретными симптомами и признаками. Заболевание может быть вызвано факторами, исходящими из внешнего источника, такими как инфекционное заболевание, или оно может быть вызвано внутренними дисфункциями, такими как аутоиммунные заболевания. У человека термин «болезнь» часто используется в более широком смысле для обозначения любого состояния, которое вызывает боль, дисфункцию, дистресс, социальные проблемы или смерть пострадавшего индивидуума или аналогичные проблемы для тех, кто находится в контакте с этим индивидуумом. В более широком смысле это иногда включает травмы, инвалидность, расстройства, синдромы, инфекции, изолированные симптомы, девиантное поведение и атипичные изменения структуры и функции, тогда как в других контекстах и для других целей их можно считать отдельными категориями. Заболевания обычно поражают людей не только физически, но и эмоционально, поскольку заражение многими заболеваниями и жизнь с ними могут изменить взгляд на жизнь и личность.

Термин «терапевтическое лечение» относится к любому лечению, которое улучшает состояние здоровья и/или продлевает (увеличивает) продолжительность жизни индивидуума. Указанное лечение может устранить заболевание у индивидуума, остановить или замедлить развитие заболевания у индивидуума, ингибировать или замедлить развитие заболевания у индивидуума, уменьшить частоту или тяжесть симптомов у индивидуума и/или уменьшить вероятность рецидива у индивидуума, который в настоящее время страдает или ранее перенес заболевание.

Термины «профилактическое лечение» или «превентивное лечение» относятся к любому лечению, которое предназначено для предотвращения возникновения заболевания у индивидуума. Термины «профилактическое лечение» или «превентивное лечение» используются в настоящем описании взаимозаменяемо. Подобным образом, термин «способ предотвращения» в контексте прогрессирования заболевания, такого как прогрессирование опухоли или злокачественного новообразования, относится к любому способу, который предназначен для предотвращения прогрессирования заболевания у индивидуума.

Термины «индивидуум» и «объект» используются в настоящем описании взаимозаменяемо. Они относятся к человеку или другому млекопитающему (например, мыши, крысе, кролику, собаке, кошке, крупному рогатому скоту, свинье, овце, лошади или примату) или любому другому животному, не являющемуся млекопитающим, включая птиц (курицу), рыб или любых других животных, которые могут быть поражены или восприимчивы к заболеванию или расстройству (например, злокачественному новообразованию). Если не указано иное, термины «индивидуум» и «объект» не обозначают конкретный возраст и, таким образом, охватывают взрослых, пожилых людей, детей и новорожденных. В вариантах осуществления настоящего описания «индивидуум» или «объект» является «пациентом».

Термин «пациент» означает индивидуума или объекта, подлежащего лечению, в частности больного индивидуума или объекта.

Аспекты и варианты осуществления настоящего описания

В первом аспекте настоящее описание относится к связывающему агенту для использования в способе уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли или лечения злокачественного новообразования у пациента, причем указанный способ включает введение указанному пациенту связывающего агента до, одновременно или после введения антитела, связывающегося с белком программируемой клеточной смерти-1 (PD-1), или его антигенсвязывающего фрагмента, где связывающий агент содержит первую связывающую область, связывающуюся с CD137, и вторую связывающую область, связывающуюся с PD-L1,

а) причем первая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 6,

7 и 8, соответственно,

и

б) вторая антигенсвязывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно,

и

антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 43, 44 и 45, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно, или антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно.

Связывающий агент, связывающийся с CD137 и PD-L1

В одном варианте осуществления CD137 представляет собой CD137 человека, в частности, CD137 человека, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38. В одном варианте осуществления PD-L1 представляет собой PD-L1 человека, в частности, PD-L1 человека, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40. В одном варианте осуществления CD137 представляет собой CD137 человека, а PD-L1 представляет собой PD-L1 человека. В одном варианте осуществления CD137 представляет собой CD137 человека, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, а PD-L1 представляет собой PD-L1 человека, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40.

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту первая связывающая область, связывающаяся с CD137 человека, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% , по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или 9, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% , по меньшей мере, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 или 10.

В дополнительном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту вторая связывающая область, связывающаяся с PD-L1 человека, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей

мере 97%, по меньшей мере 99% или 25 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% , по меньшей мере, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15.

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту,

а) первая связывающая область, связывающаяся с CD137 человека, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или 9, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 или 10; и

б) вторая связывающая область, связывающаяся с PD-L1 человека, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15.

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту первая связывающая область, связывающаяся с CD137 человека, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или 9, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 10.

В дополнительном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту вторая связывающая область, связывающаяся с PD-L1 человека, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту,

а) первая связывающая область, связывающаяся с CD137 человека, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или 9, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 10;

и

б) вторая связывающая область, связывающаяся с PD-L1 человека, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту,

а) первая связывающая область, связывающаяся с CD137 человека, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5;

и

б) вторая связывающая область, связывающаяся с PD-L1 человека, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

Связывающий агент может, в частности, представлять собой антитело, такое как полиспецифическое антитело, например, биспецифическое антитело. Кроме того, связывающий агент может быть в формате полноразмерного антитела или фрагмента антитела.

Кроме того, предпочтительно, чтобы связывающий агент представлял собой человеческое антитело или гуманизированное антитело.

Каждая переменная область может содержать три области, определяющие комплементарность (CDR1, CDR2 и CDR3) и четыре каркасных области (FR1, FR2, FR3 и FR4).

Области, определяющие комплементарность (CDR), и каркасные области (FR) могут быть расположены от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

В одном варианте осуществления первого аспекта связывающий агент содержит

i) полипептид, содержащий указанную переменную область первой тяжелой цепи (VH) и константную область первой тяжелой цепи (CH), и

ii) полипептид, содержащий указанную переменную область второй тяжелой цепи (VH) и константную область второй тяжелой цепи (CH).

В одном варианте осуществления первого аспекта связывающий агент содержит

i) полипептид, содержащий указанную переменную область первой легкой цепи (VL) и дополнительно содержащий константную область первой легкой цепи (CL), и

ii) полипептид, содержащий указанную переменную область второй легкой цепи (VL) и дополнительно содержащий константную область второй легкой цепи (CL).

В одном варианте осуществления первого аспекта связывающий агент представляет собой антитело, содержащее первое связывающее плечо и второе связывающее плечо, причем первое связывающее плечо содержит

i) полипептид, содержащий указанную вариабельную область первой тяжелой цепи (VH) и константную область первой тяжелой цепи (CH), и

ii) полипептид, содержащий указанную вариабельную область первой легкой цепи (VL) и указанную константную область первой легкой цепи (CL);

и второе связывающее плечо содержит

iii) полипептид, содержащий указанную вариабельную область второй тяжелой цепи (VH) и указанную константную область второй тяжелой цепи (CH), и

iv) полипептид, содержащий указанную вариабельную область второй легкой цепи (VL) и указанную константную область второй легкой цепи (CL).

В одном варианте осуществления первого аспекта связывающий агент содержит i) первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную связываться с CD137, причем первая тяжелая цепь содержит константную область первой тяжелой цепи, а первая легкая цепь содержит константную область первой легкой цепи; и ii) вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную связывать PD-L1, причем вторая тяжелая цепь содержит константную область второй тяжелой цепи, а вторая легкая цепь содержит константную область второй легкой цепи.

Каждая из константных областей первой и второй тяжелой цепи (CH) может содержать одну или более из константной области тяжелой цепи 1 (CH1), шарнирной области, константной области 2 тяжелой цепи (CH2) и константной области 3 тяжелой цепи (CH3), предпочтительно, по меньшей мере, шарнирную область, область CH2 и область CH3.

Каждая из константных областей первой и второй тяжелой цепи (CH) может содержать область CH3, причем две области CH3 содержат асимметричные мутации. Асимметричные мутации означают, что последовательности указанных первой и второй областей CH3 содержат аминокислотные замены в неидентичных положениях. Например, одна из указанных первой и второй областей CH3 содержит мутацию в положении, соответствующем положению 405 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU, а другая из указанных первой и второй областей CH3 содержит мутацию в положении, соответствующем положению 409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU.

В указанной константной области первой тяжелой цепи (CH) по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU, могла быть заменена, и в указанной константной области второй тяжелой цепи (CH) по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU, могла быть заменена. В

конкретных вариантах осуществления первая и вторая тяжелые цепи не замещены в одних и тех же положениях (т. е. первая и вторая тяжелые цепи содержат асимметричные мутации).

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту (i) аминокислота в положении, соответствующем F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляет собой L в указанной константной области первой тяжелой цепи (CH), и аминокислота в положении, соответствующем K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляет собой R в указанной константной области второй тяжелой цепи (CH), или (ii) аминокислота в положении, соответствующем K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляет собой R в указанной первой тяжелой цепи, а аминокислота в положении, соответствующем F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляет собой L в указанной второй тяжелой цепи.

В одном варианте осуществления первого аспекта связывающий агент индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с другим антителом, содержащим те же первую и вторую антигенсвязывающие области и две константные области тяжелой цепи (CH), содержащие шарнир, области CH2 и CH3 IgG1 человека.

В одном конкретном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту указанные константные области первой и второй тяжелой цепи (CH) модифицированы так, что антитело индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с антителом, которое идентично, за исключением содержания немодифицированных константных областей первой и второй тяжелой цепи (CH). В частности, каждая или обе из указанных немодифицированных константных областей первой и второй тяжелой цепи (CH) могут содержать, состоять из или по существу состоять из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19 или 25.

Fc-опосредованную эффекторную функцию можно определить путем измерения связывания связывающего агента с Fcγ-рецепторами, связывания с C1q или индукции Fc-опосредованного перекрестного связывания Fcγ-рецепторов. В частности, Fc-опосредованную эффекторную функцию можно определить путем измерения связывания связывающего агента с C1q.

Первая и вторая константные области тяжелой цепи связывающего агента могут быть модифицированы таким образом, чтобы связывание C1q с указанным антителом было снижено по сравнению с антителом дикого типа, предпочтительно снижено по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100%, где связывание C1q предпочтительно определяют с помощью ИФА.

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту, по меньшей мере, в одной из указанных константных областей первой и второй тяжелой

цепи (CH), одна или более аминокислот в положениях, соответствующих положениям L234, L235, D265, N297 и P331, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU не являются L, L, D, N и P, соответственно.

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту положения, соответствующие положениям L234 и L235, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU могут быть F и E, соответственно, в указанных первой и второй тяжелых цепях.

В частности, положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU могут быть F, E и A, соответственно, в указанных константных областях первой и второй тяжелой цепи (HC).

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту положения, соответствующие положениям L234 и L235, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU в обеих константных областях первой и второй тяжелой цепи, представляют собой F и E, соответственно, где (i) положение, соответствующее F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU константной области первой тяжелой цепи, представляет собой L, а положение, соответствующее K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU второй тяжелой цепи, представляет собой R или (ii) положение, соответствующее K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU константной области первой тяжелой цепи, представляет собой R, а положение, соответствующее F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU второй тяжелой цепи, представляет собой L.

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU обеих константных областей первой и второй тяжелой цепи, представляют собой F, E и A, соответственно, где (i) положение, соответствующее F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU константной области первой тяжелой цепи, представляет собой L, а положение, соответствующее K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU константной области второй тяжелой цепи представляет собой R, или (ii) положение, соответствующее K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU первой тяжелой цепи представляет собой R, и положение, соответствующее F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU второй тяжелой цепи представляет собой L.

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

a) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 25 [IgG1-FC];

b) подпоследовательности последовательности в a), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности,

определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 10 замен, например, по большей мере 9 замен, по большей мере 8, по большей мере 7, по большей мере 6, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 или по большей мере 1 замену по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту константная область указанной первой или второй тяжелой цепи, как например, второй тяжелой цепи, содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 26 [IgG1-F405L];

б) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 9 замен, как например по большей мере 8, по большей мере 7, по большей мере 6, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту константная область указанной первой или второй тяжелой цепи, как например, первой тяжелой цепи, содержит или состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21 или 27 [IgG1-F409R];

б) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 10 замен, как например, по большей мере 9 замен, по большей мере 8, по большей мере 7, по большей мере 6, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 или по большей мере 1 замену по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 28 [IgG1-Fc_FEA];

б) подпоследовательности последовательности в а), такой как

подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 7 замен, как например, по большей мере 6 замен, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи, как например, второй тяжелой цепи, содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 30 [IgG1-Fc_FEAL];

б) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 6 замен, как например, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи, как например, первой тяжелой цепи, содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 29 [IgG1-Fc_FEAR];

б) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 6 замен, как например, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

В одном варианте осуществления первого аспекта связывающий агент содержит константную область легкой цепи каппа (κ).

В одном варианте осуществления первого аспекта связывающий агент содержит константную область легкой цепи лямбда (λ).

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту

константная область первой легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа (κ) или константную область легкой цепи лямбда (λ).

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту константная область второй легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи лямбда (λ) или константную область легкой цепи каппа (κ).

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту константная область первой легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа (κ), а константная область второй легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи лямбда (λ) или константная область первой легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи лямбда (λ), а константная область второй легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа (κ).

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту легкая цепь каппа (κ) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 35;

б) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 10 замен, как например, по большей мере 9 замен, по большей мере 8, по большей мере 7, по большей мере 6, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 или по большей мере 1 замену по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

В одном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту легкая цепь лямбда (λ) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36;

б) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 10 замен, как например, по большей мере 9 замен, по большей мере 8, по большей мере 7, по большей мере 6, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 или по большей мере 1 замену по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

Связывающий агент (в частности, антитело) согласно первому аспекту имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В частности, связывающий агент может представлять собой полноразмерное антитело IgG1. В

предпочтительных вариантах осуществления первого аспекта связывающий агент (в частности, антитело) относится к аллотипу IgG1m(f).

В предпочтительном варианте осуществления связывающего агента согласно первому аспекту связывающий агент содержит

i) первую тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную связываться с CD137, где первая тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 31, и первая легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 32;

ii) вторую тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную связываться с PD-L1, где вторая тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 33, и вторая легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 34.

Связывающий агент для применения согласно первому аспекту может, в частности, представлять собой акасунлимаб или его биоаналог.

В предпочтительных на данный момент вариантах осуществления количество связывающего агента, вводимое в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, составляет

a) примерно 0,3-5 мг/кг массы тела или примерно 25-400 мг в целом; и/или

b) примерно $2,1 \times 10^{-9}$ - $3,4 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или примерно $1,7 \times 10^{-7}$ - $2,7 \times 10^{-6}$ моль в целом.

Согласно этим вариантам осуществления доза, определенная в мг/кг, может быть преобразована в фиксированную дозу и наоборот, исходя из средней массы тела пациентов, которым вводят связывающий агент, равной 80 кг.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять примерно 0,3-4 мг/кг массы тела или примерно 25-320 мг в целом; и/или

примерно $2,1 \times 10^{-9}$ - $2,7 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или примерно $1,7 \times 10^{-7}$ - $2,2 \times 10^{-6}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять примерно 0,38-4,0 мг/кг массы тела или примерно 30-320 мг в целом; и/или

примерно $2,6 \times 10^{-9}$ - $2,7 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или примерно $2,4 \times 10^{-7}$ - $2,2 \times 10^{-6}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять примерно 0,5-3,3 мг/кг массы тела или примерно 40-260 мг в целом; и/или

примерно $3,4 \times 10^{-9}$ - $2,2 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или примерно $2,7 \times 10^{-7}$ - $1,8 \times 10^{-6}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять примерно 0,6-2,5 мг/кг массы тела или примерно 50-200 мг в целом; и/или

примерно $4,3 \times 10^{-9}$ - $1,7 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или примерно $3,4 \times 10^{-7}$ - $1,4 \times 10^{-6}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять примерно 0,8-1,8 мг/кг массы тела или примерно 60-140 мг в целом; и/или

примерно $5,1 \times 10^{-9}$ - $1,2 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или примерно $4,1 \times 10^{-7}$ - $9,5 \times 10^{-7}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять примерно 0,9-1,8 мг/кг массы тела или примерно 70-140 мг в целом; и/или

примерно $6,0 \times 10^{-9}$ - $1,2 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или примерно $4,8 \times 10^{-7}$ - $9,5 \times 10^{-7}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять примерно 1-1,5 мг/кг массы тела или примерно 80-120 мг в целом; и/или

примерно $6,8 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или примерно $5,5 \times 10^{-7}$ - $8,2 \times 10^{-7}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять примерно 1,1-1,4 мг/кг массы тела или примерно 90-110 мг в целом; и/или

примерно $7,7 \times 10^{-9}$ - $9,4 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или примерно $6,1 \times 10^{-7}$ - $7,5 \times 10^{-7}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять примерно 1,2-1,3 мг/кг массы тела или примерно 95-105 мг в целом; и/или

примерно $6,8 \times 10^{-9}$ - $8,9 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или примерно $6,5 \times 10^{-7}$ - $7,2 \times 10^{-7}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять примерно 0,8-1,5 мг/кг массы тела или примерно 65-120 мг в целом; и/или

примерно $5,5 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или примерно $4,4 \times 10^{-7}$ - $8,2 \times 10^{-7}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять примерно 0,9-1,3 мг/кг массы тела или примерно 70-100 мг в целом; и/или

примерно $6,0 \times 10^{-9}$ - $8,5 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или примерно $4,8 \times 10^{-7}$ - $6,8 \times 10^{-7}$ моль в целом.

примерно 0,9-1,1 мг/кг массы тела или примерно 75-90 мг в целом; и/или

примерно $6,4 \times 10^{-9}$ - $7,7 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или примерно $5,1 \times 10^{-7}$ - $6,1 \times 10^{-7}$ моль в целом.

Кроме того, количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять 0,3-4,0 мг/кг массы тела или всего 25-320 мг; и/или

$2,1 \times 10^{-9}$ - $2,7 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или $1,7 \times 10^{-7}$ - $2,2 \times 10^{-6}$ моль в целом.

Кроме того, количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять 0,3-4,0 мг/кг массы тела или всего 25-320 мг; и/или

$2,6 \times 10^{-9}$ - $2,7 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или $2,4 \times 10^{-7}$ - $2,2 \times 10^{-6}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять 0,5-3,3 мг/кг массы тела или в целом 40-260 мг; и/или

$3,4 \times 10^{-9}$ - $2,2 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или $2,7 \times 10^{-7}$ - $1,8 \times 10^{-6}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять 0,6-2,5 мг/кг массы тела или в целом 50-200 мг; и/или

$4,3 \times 10^{-9}$ - $1,7 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или $3,4 \times 10^{-7}$ - $1,4 \times 10^{-6}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять 0,8-1,8 мг/кг массы тела или в целом 60-140 мг; и/или

$5,1 \times 10^{-9}$ - $1,2 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или $4,1 \times 10^{-7}$ - $9,5 \times 10^{-7}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять 0,9-1,8 мг/кг массы тела или в целом 70-140 мг; и/или

$6,0 \times 10^{-9}$ - $1,2 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или $4,8 \times 10^{-7}$ - $9,5 \times 10^{-7}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять 1-1,5 мг/кг массы тела или в целом 80-120 мг; и/или

$6,8 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или $5,5 \times 10^{-7}$ - $8,2 \times 10^{-7}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять 1,1-1,4 мг/кг массы тела или в целом 90-110 мг; и/или

$7,7 \times 10^{-9}$ - $9,4 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или $6,1 \times 10^{-7}$ - $7,5 \times 10^{-7}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять 1,2-1,3 мг/кг массы тела или в целом 95-105 мг; и/или

$6,8 \times 10^{-9}$ - $8,9 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или $6,5 \times 10^{-7}$ - $7,2 \times 10^{-7}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять 0,8-1,5 мг/кг массы тела или всего 65-120 мг; и/или

$5,5 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или $4,4 \times 10^{-7}$ - $8,2 \times 10^{-7}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять 0,9-1,3 мг/кг массы тела или в целом 70-100 мг; и/или

$6,0 \times 10^{-9}$ - $8,5 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или $4,8 \times 10^{-7}$ - $6,8 \times 10^{-7}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может, в частности, составлять 0,9-1,1 мг/кг массы тела или всего 75-90 мг; и/или $6,4 \times 10^{-9}$ - $7,7 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или $5,1 \times 10^{-7}$ - $6,1 \times 10^{-7}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может составлять

a) примерно 1,1 мг/кг массы тела или примерно 80 мг в целом; и/или

b) примерно $6,8 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или примерно $5,5 \times 10^{-7}$ моль в целом.

Количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, может составлять

a) 1,1 мг/кг массы тела или всего 80 мг; и/или

b) $6,8 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или $5,5 \times 10^{-7}$ моль в целом.

В настоящее время предпочтительно, чтобы количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, составляло

a) примерно 1,25 мг/кг массы тела или примерно 100 мг в целом; и/или

b) примерно $8,5 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или примерно $6,8 \times 10^{-7}$ моль в целом.

В равной степени предпочтительно, чтобы количество связывающего агента, вводимого в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, составляло

a) 1,25 мг/кг массы тела или 100 мг в целом; и/или

b) $8,5 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или $6,8 \times 10^{-7}$ моль в целом.

Связывающий агент можно вводить любым способом и любым путем, известным в данной области техники. В предпочтительном варианте осуществления связывающий агент вводят системно, например парентерально, в частности внутривенно.

Связывающий агент можно вводить в форме любой подходящей фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В предпочтительном варианте осуществления связывающий агент вводят посредством инфузии.

Связывающий агент для применения согласно изобретению можно вводить с помощью внутривенной (IV) инфузии, например, путем внутривенной инфузии в течение минимум 30 минут, например, в течение минимум 60 минут, например, с помощью внутривенной инфузии в течение от 30 до 120 минут. Предпочтительно связывающий агент для применения согласно изобретению вводят посредством внутривенной (IV) инфузии в течение 30 минут.

Связывающий агент можно вводить до, одновременно или после введения ингибитора PD-1.

В одном варианте осуществления связывающий агент вводят до введения ингибитора PD-1. Например, промежуток между окончанием введения связывающего агента и началом введения ингибитора PD-1 может составлять по меньшей мере примерно

10 минут, например, по меньшей мере примерно 15 минут, по меньшей мере примерно 20 минут, при по меньшей мере примерно 25 мин, по меньшей мере примерно 30 мин, по меньшей мере примерно 35 мин, по меньшей мере примерно 40 мин, по меньшей мере примерно 45 мин, по меньшей мере примерно 50 мин, по меньшей мере примерно 55 мин, по меньшей мере примерно 60 мин, по меньшей мере примерно 90 минут или по меньшей мере примерно 120 минут и примерно до 14 дней (до примерно 2 недель), например, примерно до 13 дней, примерно до 12 дней, примерно до 11 дней, примерно до 10 дней, примерно до 9 дней, примерно до 8 дней, примерно до 7 дней (до примерно 1 недели), примерно до 6 дней, примерно до 5 дней, примерно до 4 дней, примерно до 3 дней, до примерно до 2 дней, примерно до 1 дня (до примерно 24 часов), примерно до 18 часов, примерно до 12 часов, примерно до 6 часов, примерно до 5 часов, примерно до 4 часов, примерно до 3 часов, примерно до 2,5 часов или примерно до 2 часов.

В одном варианте осуществления связывающий агент вводят после введения ингибитора PD-1. Например, интервал между окончанием введения ингибитора PD-1 и началом введения связывающего агента может составлять по меньшей мере примерно 10 минут, например, по меньшей мере примерно 15 минут, по меньшей мере примерно 20 минут, при по меньшей мере примерно 25 мин, по меньшей мере примерно 30 мин, по меньшей мере примерно 35 мин, по меньшей мере примерно 40 мин, по меньшей мере примерно 45 мин, по меньшей мере примерно 50 мин, по меньшей мере примерно 55 мин, по меньшей мере примерно 60 мин, по меньшей мере примерно 90 минут или по меньшей мере примерно 120 минут и примерно до 14 дней (до примерно 2 недель), например, примерно до 13 дней, примерно до 12 дней, примерно до 11 дней, примерно до 10 дней, примерно до 9 дней, примерно до 8 дней, примерно до 7 дней (до примерно 1 недели), примерно до 6 дней, примерно до 5 дней, примерно до 4 дней, примерно до 3 дней, до примерно до 2 дней, примерно до 1 дня (до примерно 24 часов), примерно до 18 часов, примерно до 12 часов, примерно до 6 часов, примерно до 5 часов, примерно до 4 часов, примерно до 3 часа, примерно до 2,5 часов или примерно до 2 часов.

В одном варианте осуществления связывающий агент вводят одновременно с ингибитором PD-1. Например, связывающий агент и ингибитор PD-1 можно вводить с использованием композиции, содержащей оба лекарственных средства. Альтернативно, связывающий агент можно вводить в одну конечность пациента, а ингибитор PD-1 можно вводить в другую конечность пациента.

Антитела, связывающиеся с PD-1

Антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности, например, по меньшей мере 90% идентичности последовательности, 95% идентичности последовательности, 98% идентичности последовательности или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 49, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную

последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности, например, по меньшей мере 90% идентичности последовательности, 95% идентичности последовательности, 98% идентичности последовательности или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 50.

В наиболее предпочтительных на данный момент вариантах осуществления антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую, состоящую из или по существу состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 49, и переменную область легкой цепи, содержащую, состоящую из или по существу состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50.

Антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать тяжелую цепь, содержащую, состоящую из или по существу состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51, и легкую цепь, содержащую, состоящую из или по существу состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 52.

Антитело, связывающееся с PD-1, используемое согласно настоящему изобретению, предпочтительно предотвращает ингибирующие сигналы, ассоциированные с PD-1. Связывание антитела с PD-1 предпочтительно нарушает или ингибирует передачу ингибирующих сигналов, ассоциированных с PD-1.

Ингибирование или блокирование передачи сигналов PD-1, как описано в настоящем документе, приводит к предотвращению или обращению вспять иммуносупрессии и установлению или усилению Т-клеточного иммунитета против опухолевых клеток. В одном варианте осуществления ингибирование передачи сигнала PD-1, как описано в настоящем документе, снижает или ингибирует дисфункцию иммунной системы. В одном варианте осуществления ингибирование передачи сигналов PD-1, как описано в настоящем документе, делает дисфункциональные иммунные клетки менее дисфункциональными. В одном варианте осуществления ингибирование передачи сигналов PD-1, как описано в настоящем документе, делает дисфункциональные Т-клетки менее дисфункциональными.

В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 предотвращает взаимодействие между PD-1 и PD-L1. В другом варианте осуществления ингибитор PD-1 предотвращает взаимодействие между PD-1 и PD-L2.

В частности, антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой химеризованное, гуманизованное или человеческое антитело.

В предпочтительном варианте осуществления антитело, связывающееся с PD-1, представляет собой выделенное антитело.

Безотносительно к теории считается, что комбинация связывающего агента, содержащего первую связывающую область, связывающуюся с CD137, и вторую связывающую область, связывающуюся с PD-L1, как определено выше, с антителом,

связывающимся с PD-1, как определено выше, увеличивает степень ответа и приводит к увеличению продолжительности ответа у пациентов, получающих комбинированную терапию, поскольку комбинированная терапия приводит к полной блокаде пути PD-1 с одновременной условной активацией 4-1BB. Антитело, блокирующее PD-1, блокирует взаимодействие как с PD-L1, так и с PD-L2. Кроме того, полагают, что комбинированная терапия антителом, связывающимся с PD-1, делает доступными для связывания связывающим агентом повышенные количества PD-L1.

Ингибитор PD-1 может, в частности, представлять собой пембролизумаб или его биоаналог.

В дополнительном варианте осуществления ингибитор PD-1 представляет собой антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую или состоящую из или по существу состоящую из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 49, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую, состоящую из или по существу состоящую из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 50. Ингибитор PD-1 может, в частности, представлять собой антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую, состоящую из или по существу состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 51, и легкую цепь, содержащую, состоящую из или по существу состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 52.

Антитела против PD-1 по настоящему изобретению предпочтительно являются моноклональными и могут представлять собой полиспецифические человеческие, гуманизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, фрагменты, продуцируемые Fab-экспрессирующей библиотекой, и PD-1-связывающие фрагменты любого из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1, описанное в настоящем документе, специфически связывается с PD-1 (например, PD-1 человека). Молекулы иммуноглобулина согласно настоящему описанию могут относиться к любому изотипу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу молекул иммуноглобулина.

Антигенсвязывающие фрагменты (например, человеческие антигенсвязывающие фрагменты), как описано в настоящем документе, и включают, помимо прочего, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, дисульфидно-связанные Fv (sdFv) и фрагменты, содержащие домен VL или VH. Антигенсвязывающие фрагменты, в том числе одноцепочечные антитела, могут содержать вариабельную(ые) область(и) отдельно или в комбинации с полностью или частично из следующего: шарнирная область, домены CH1, CH2, CH3 и CL. Также в настоящее описание включены антигенсвязывающие фрагменты, содержащие любую комбинацию вариабельной(ых) области(ей) с шарнирной областью, доменами CH1, CH2, CH3 и CL. В некоторых вариантах осуществления антитела против PD-1 или их антигенсвязывающие фрагменты принадлежат человеку, мыши (например, мыши и крысе), ослу, овце, кролику, козе,

морской свинке, верблюду, лошади или курице.

В некоторых вариантах осуществления нумерация аминокислотных остатков в последовательностях CDR антител против PD-1 или их антигенсвязывающих фрагментов, представленных в настоящем документе, соответствует схеме нумерации IMGT, как описано Lefranc, M.P. et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 2003, 27, 55-77.

Антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент также включает производные и конструкции, которые модифицированы, т. е. путем ковалентного присоединения любого типа молекулы к антителу, так что ковалентное присоединение не препятствует связыванию антитела с PD-1. Например, но не в качестве ограничения, производные антител включают антитела, которые были модифицированы, например, гликозилированием, ацетилизацией, ПЭГилированием, фосфилированием, амидированием, дериватизацией известными защитными/блокирующими группами, протеолитическим расщеплением, связыванием с клеточным лигандом или другим белком и т. д. Любая из многочисленных химических модификаций может быть проведена известными методами, включая, помимо прочего, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т. д. Кроме того, производное или конструкция может содержать одну или более из неклассических аминокислот.

Предпочтительно антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в подходящем количестве. Количество антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, вводимого в каждой дозе и/или курсе лечения, может, в частности, находиться в диапазоне, в котором более 5%, предпочтительно более 10%, более предпочтительно более 15%, еще более предпочтительно более 20%, еще более предпочтительно более 25%, еще более предпочтительно более 30%, еще более предпочтительно более 35%, еще более предпочтительно более 40%, еще более предпочтительно более 45%, наиболее предпочтительно более 50% указанных ингибиторов PD-1 связываются с PD-1.

В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающееся с PD-1, представляет собой пембролизумаб или его биоаналог, и количество вводимого ингибитора PD-1, например, в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, составляет в целом примерно 10 - примерно 1000 мг, например, примерно 100 - примерно 600 мг в целом, например, примерно 150 - примерно 600 мг в целом, примерно 150 - примерно 500 мг в целом, примерно 175 - примерно 500 мг в целом, примерно 175 - примерно 450 мг в целом, примерно 200 - примерно 450 мг в целом или, например, примерно 200 - примерно 400 мг в целом.

В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающееся с PD-1, представляет собой пембролизумаб или его биоаналог, а количество вводимого ингибитора PD-1, например, в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, составляет в целом 10-1000 мг, например 100-600 мг в целом, например, 150-600 мг в целом, 150-500 мг в целом, 175-500 мг в целом, 175-450 мг в целом, 200-450 мг в целом или например

200-400 мг в целом.

В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающееся с PD-1, представляет собой пембролизумаб или его биоаналог, а количество антитела, связывающегося с PD-1, которое вводят, например, в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, составляет

примерно 100-600 мг в целом; и/или
примерно $6,84 \times 10^{-7}$ - $4,11 \times 10^{-7}$ моль в целом.

В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающееся с PD-1, представляет собой пембролизумаб или его биоаналог, а количество антитела, связывающегося с PD-1, которое вводят, например, в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, составляет в целом примерно 100-400 мг; и/или примерно $6,84 \times 10^{-7}$ - $2,73 \times 10^{-6}$ моль в целом, например 100-400 мг в целом; и/или $6,84 \times 10^{-7}$ - $2,73 \times 10^{-6}$ моль в целом.

В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающееся с PD-1, представляет собой пембролизумаб или его биоаналог, а количество антитела, связывающегося с PD-1, которое вводят, например, в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, составляет в целом примерно 200-400 мг; и/или примерно $6,84 \times 10^{-7}$ - $2,73 \times 10^{-6}$ моль в целом, например, 200-400 мг в целом; и/или $6,84 \times 10^{-7}$ - $2,73 \times 10^{-6}$ моль в целом.

В некоторых вариантах осуществления количество введенного антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, например, в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, составляет примерно 200 мг или примерно $1,37 \times 10^{-6}$ моль в целом, например, 200 мг или $1,37 \times 10^{-6}$ моль в целом.

В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающееся с PD-1, представляет собой пембролизумаб или его биоаналог, и количество антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, вводимого, например, в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, составляет примерно 200 мг или примерно $1,37 \times 10^{-6}$ моль в целом, например, 200 мг или $1,37 \times 10^{-6}$ моль в целом.

В некоторых вариантах осуществления количество введенного антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, например, в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, составляет примерно 400 мг в целом или примерно $2,73 \times 10^{-6}$ в целом, например, 400 мг в целом или $2,73 \times 10^{-6}$ в целом.

В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающееся с PD-1, представляет собой пембролизумаб или его биоаналог, и количество антитела, связывающегося с PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента, вводимого, например, в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, составляет примерно 400 мг в целом или примерно $2,73 \times 10^{-6}$ в целом, например, 400 мг в целом или $2,73 \times 10^{-6}$ в целом.

Антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить любым способом и любым путем, известным в данной области техники. Способ и путь введения будут зависеть от типа используемого антитела. В предпочтительном варианте осуществления антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент вводят системно, например парентерально, в частности, внутривенно.

Антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в форме любой подходящей фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В предпочтительном варианте осуществления антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в форме инфузии, такой как внутривенная инфузия.

Пациент и опухоль или злокачественное новообразование, подлежащие лечению

Пациентом, подлежащим лечению согласно настоящему изобретению, предпочтительно является человек.

В одном предпочтительном варианте осуществления опухоль или злокачественное новообразование, подлежащие лечению, представляют собой солидные опухоль или злокачественное новообразование. Опухоль или злокачественное новообразование могут представлять собой метастатические опухоль или злокачественное новообразование.

Предпочтительно опухоль или злокачественное новообразование могут быть выбраны из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака легких (например, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC)), колоректального рака, рака головы и шеи, рака желудка, рака молочной железы, рака почек, уротелиального рака, рака мочевого пузыря, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака печени, тимомы и карциномы тимуса, рака головного мозга, глиомы, аденокарциномы, рака щитовидной железы, других видов рака кожи, саркомы, множественной миеломы, лейкоза, лимфомы, миелодиспластических синдромов, рака эндометрия, рака предстательной железы, рака полового члена, рака шейки матки, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, карциномы клеток Меркеля и мезотелиомы. Более предпочтительно опухоль или злокачественное новообразование выбирают из группы, состоящей из меланомы, рака легких, колоректального рака, рака поджелудочной железы и рака головы и шеи.

В конкретных вариантах осуществления опухоль или злокачественное новообразование выбирают из группы, состоящей из рака легких (например, немелкоклеточного рака легких (NSCLC), уротелиального рака (рак мочевого пузыря, мочеточника, уретры или почечной лоханки), рака эндометрия (EC), рака молочной железы (например, трижды негативного рака молочной железы (TNBC)), плоскоклеточного рака головы и шеи (SCCHN) (например, рака полости рта, глотки или гортани) и рака шейки матки.

Предпочтительно опухоль представляет собой PD-L1-положительную опухоль. В некоторых вариантах осуществления предпочтительно, чтобы PD-L1 экспрессировался в $\geq 1\%$ клеток злокачественного новообразования или опухолевых клетках. Экспрессию PD-L1 можно определить с использованием методов, известных специалисту в данной области, и можно, например, оценить с помощью иммуногистохимии (ИГХ).

Опухоль или злокачественное новообразование может, в частности, представлять собой рак легких. Рак легких может представлять собой немелкоклеточный рак легких (NSCLC), такой как плоскоклеточный или неплоскоклеточный NSCLC. Рак легких является вторым наиболее распространенным злокачественным новообразованием с

оценкой стандартизированного по возрасту уровня заболеваемости 22,4 на 100000 человек и является основной причиной смертности от злокачественного новообразования как среди мужчин, так и среди женщин (Kantar, 2021). По оценкам, в 2020 году во всем мире будет зарегистрировано примерно 2206771 новых случаев рака легких и 1796144 случаев смерти (GLOBOCAN, 2020). На немелкоклеточный рак легких (NSCLC) приходится от 85% до 90% всех случаев, с 5-летней выживаемостью примерно 18% на всех стадиях заболевания и только 3,5% для метастатического заболевания (Jemal et al., 2011) (Kantar, 2021; SEER, 2018). В случае терапии первой линии лечение обычно состоит из химиотерапии на основе платины в комбинации с иммунотерапией или таргетной терапии, в зависимости от молекулярного и биомаркерного анализа, а также гистологии опухоли (NCCN, 2021d). Совсем недавно появление ингибиторов PD-1 и лиганда белка программируемой клеточной смерти 1 (PD-L1) улучшило результаты лечения пациентов без драйверных мутаций (примерно 62% неплоскоклеточной популяции и 77% плоскоклеточной популяции (Kantar, 2021). Требуется больше альтернатив лечения для пациентов, чьи опухоли не несут определенных онкогенных мутаций или не экспрессируют биомаркер вариантов ингибитора контрольной точки (CPI). Новые комбинации с дополнительными подходами для усиления мер реагирования могут способствовать дальнейшему удовлетворению неудовлетворенных потребностей этой популяции. Для пациентов терапии второй линии SOC ограничивается химиотерапией на основе платины, монотерапией CPI или доцетакселом с рамуцирумабом или без него в зависимости от полученной ранее терапии. Для пациентов третьей линии (3L) стандартом является монотерапия химиотерапией. Необходимы новые методы лечения, чтобы ограничить токсичность и потенциально повысить эффективность в этой популяции (NCCN, 2021d).

В одном варианте осуществления, где опухоль или злокачественное новообразование представляет собой рак легких, эта опухоль или злокачественное новообразование представляет собой немелкоклеточный рак легких (NSCLC), такой как плоскоклеточный или неплоскоклеточный NSCLC. Опухоль или злокачественное новообразование могут, в частности, представлять собой метастатический рак, такой как метастатический NSCLC.

В одном варианте осуществления, где опухоль или злокачественное новообразование представляет собой рак легких, в частности NSCLC, опухоль или злокачественное новообразование не имеют мутации, сенсibiliзирующей эпидермальный фактор роста (EGFR), и/или транслокации/реарранжировки ROS1 в анапластической лимфоме (ALK). Мутации, сенсibiliзирующие EGFR, - это мутации, которые поддаются лечению одобренным ингибитором тирозинкиназы (TKI).

В одном варианте осуществления, где опухоль или злокачественное новообразование представляет собой рак легких, в частности NSCLC, опухоль или злокачественное новообразование включает опухолевые клетки, и PD-L1 экспрессируется в $\geq 1\%$ опухолевых клеток. Такую экспрессию можно определить любыми способами и

способами, известными специалисту в данной области, например, с помощью иммуногистохимии (ИГХ), например, с помощью местного SOC-теста (предпочтительно теста, одобренного FDA) или в центральной лаборатории.

В одном варианте осуществления, где опухоль или злокачественное новообразование представляет собой рак легких, в частности, NSCLC, опухоль или злокачественное новообразование включает опухолевые клетки, и PD-L1 экспрессируется в 1% - 49% опухолевых клеток. Такую экспрессию можно определить любыми способами и способами, известными специалисту в данной области, например, с помощью иммуногистохимии (ИГХ), например, с помощью местного SOC-теста (предпочтительно теста, одобренного FDA) или в центральной лаборатории.

В одном варианте осуществления, где опухоль или злокачественное новообразование представляет собой рак легких, в частности NSCLC, опухоль или злокачественное новообразование включает опухолевые клетки, и PD-L1 экспрессируется в $\geq 50\%$ опухолевых клеток. Такую экспрессию можно определить любыми способами и способами, известными специалисту в данной области, например, с помощью иммуногистохимии (ИГХ), например, с помощью местного SOC-теста (предпочтительно теста, одобренного FDA) или в центральной лаборатории.

В одном варианте осуществления пациент не получал предшествующего системного лечения метастатического заболевания, т. е. пациент не получал никакого системного лечения метастатического заболевания до получения лечения согласно изобретению. Согласно этому варианту осуществления опухоль или злокачественное новообразование предпочтительно представляет собой рак легких, такой как NSCLC.

В одном варианте осуществления изобретения пациент не получал ранее лечения ингибитором контрольной точки/ингибитором иммунной контрольной точки (ICP), т. е. до лечения согласно первому аспекту пациент не получал лечения ингибитором ICP. В дополнительных вариантах осуществления пациент не получал ранее лечения ингибитором PD-1 или ингибитором PD-L1, таким как антитело против PD-1 или антитело против PD-L1. В этих вариантах осуществления опухоль или злокачественное новообразование предпочтительно представляет собой рак легких, такой как NSCLC.

В дополнительном варианте осуществления пациент не получал предшествующего лечения агентом, нацеленным на 4-1BB (CD137), противоопухолевой вакциной или иммунотерапией аутологичных клеток. В одном варианте осуществления пациент не получал ранее лечения антителом против 4-1BB (CD137). В этих вариантах осуществления опухоль или злокачественное новообразование предпочтительно представляет собой рак легких, такой как NSCLC.

В других вариантах осуществления опухоль или злокачественное новообразование рецидивируют и/или являются резистентными после лечения, такого как системное лечение ингибитором контрольной точки.

Пациент мог получить по меньшей мере одну предшествующую линию системной терапии, такой как системная терапия, включающая ингибитор PD-1 или ингибитор PD-

L1, такой как антитело против PD-1 или антитело против PD-L1. Злокачественное новообразование или опухоль, в частности, могут рецидивировать и/или быть рефрактерными, или у пациента наблюдается прогрессирование после лечения ингибитором PD-1 или ингибитором PD-L1, таким как антитело против PD-1 или антитело против PD-L1, причем ингибитор PD-1 или ингибитор PD-L1 вводят в виде монотерапии или как часть комбинированной терапии.

В конкретных вариантах осуществления лечение согласно изобретению предоставляется пациенту, ранее получившему лечение; например как определено выше, где последнее предшествующее лечение проводилось ингибитором PD1 или ингибитором PD-L1, таким как антитело против PD-1 или антитело против PD-L1, причем ингибитор PD-1 или ингибитор PD-L1 вводили в виде монотерапии или как часть комбинированной терапии. Последнее предшествующее лечение может проводиться с использованием ингибитора PD1 или ингибитора PD-L1, определенного выше.

Предпочтительно, терапию согласно изобретению назначают пациенту, когда время от прогрессирования заболевания у этого пациента при последнем лечении ингибитором PD1 или ингибитором PD-L1, таким как антитело против PD-1 или антитело против PD-L1, составляет 8 месяцев или меньше, например, 7 месяцев или меньше, 6 месяцев или меньше, 5 месяцев или меньше, 4 месяца или меньше, 3 месяца или меньше, 2 месяца или меньше, 1 месяц или меньше, 3 недели или меньше или например 2 недели или меньше.

По аналогии, может быть предпочтительным предлагать терапию согласно настоящему изобретению пациентам, когда время от последней дозы ингибитора PD1 или ингибитора PD-L1, такого как антитело против PD-1 или антитело против PD-L1 в рамках последнего предшествующего лечения составляет 8 месяцев или меньше, например, 7 месяцев или меньше, 6 месяцев или меньше, 5 месяцев или меньше, 4 месяца или меньше, 3 месяца или меньше, 2 месяца или меньше, 1 месяц или меньше, 3 недели или меньше или например 2 недели или меньше.

В дополнительных вариантах осуществления злокачественное новообразование или опухоль рецидивируют и/или являются рефрактерными, или у пациента наблюдается прогрессирование во время или после

i) химиотерапии с платиновым дублетом после лечения антителом против PD-1 или антителом против PD-L1, или

ii) лечения антителом против PD-1 или антителом против PD-L1 после химиотерапии с платиновым дублетом.

Кроме того, в этих вариантах осуществления опухоль или злокачественное новообразование предпочтительно представляет собой рак легких, такой как NSCLC.

Пациент, получающий лечение согласно изобретению, может, в частности, быть пациентом, который ранее не получал лечения химиотерапевтическим препаратом на основе таксана; например, доцетакселом или паклитакселом, например, предшествующее лечение NSCLC химиотерапевтическим препаратом на основе таксана, например,

доцетакселом.

Схема лечения

Связывающий агент и ингибитор PD-1 можно вводить любым подходящим способом, например, внутривенно, внутриартериально, подкожно, внутривожно, внутримышечно, интранодально или внутрь опухоли.

В одном варианте осуществления первого аспекта указанный выше связывающий агент вводят пациенту путем системного введения. Предпочтительно связывающий агент вводят пациенту посредством внутривенной инъекции или инфузии. В одном варианте осуществления связывающий агент вводят по меньшей мере в одном курсе лечения.

В одном варианте осуществления антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, в частности, вводят пациенту системным введением. Предпочтительно антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент вводят пациенту посредством внутривенной инъекции или инфузии. В одном варианте осуществления антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент вводят по меньшей мере в одном курсе лечения.

В одном варианте осуществления связывающий агент, определенный выше, и антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, в частности, вводят пациенту путем системного введения. Предпочтительно связывающий агент и антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, вводят пациенту посредством внутривенной инъекции или инфузии. В одном варианте осуществления связывающий агент и антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, вводят по меньшей мере в одном курсе лечения.

В одном варианте осуществления каждый курс лечения составляет примерно две недели (14 дней), три недели (21 день) или четыре недели (28 дней), пять недель (35 дней) или 6 недель (48 дней). В предпочтительных вариантах осуществления каждый курс лечения составляет три недели (21 день). В других предпочтительных вариантах осуществления каждый курс лечения составляет 6 недель (48 дней).

В конкретных вариантах осуществления одну дозу связывающего агента, определенного выше, и одну дозу антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, вводят или вливают каждую вторую неделю (1Q2W), каждую третью неделю (1Q3W) или каждую четвертую неделю (1Q4W), каждую пятую неделю (1Q5W), предпочтительно каждую третью неделю (1Q3W). В других вариантах осуществления одну дозу связывающего агента, определенного выше, и одну дозу антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, вводят каждые шесть недель (1Q6W). Количество связывающего агента и количество антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, предпочтительно такие, как определено выше.

В некоторых вариантах осуществления одну дозу или каждую дозу вводят или вливают в первый день каждого курса лечения. Например, одну дозу связывающего агента, определенного выше, и одну дозу антитела, связывающегося с PD-1, или его

антигенсвязывающего фрагмента, можно вводить в первый день каждого курса лечения.

В некоторых вариантах осуществления дозу 100 мг связывающего агента, определенного выше, и дозу 200 мг антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, вводят каждые три недели (1Q3W).

В других вариантах осуществления дозу 100 мг связывающего агента, определенного выше, и дозу 400 мг антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, вводят каждые шесть недель (1Q6W).

В конкретных вариантах осуществления дозу 100 мг связывающего агента, которым является акасунлимаб или его биоаналог, и дозу 200 мг антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, которым является пембролизумаб или его биоаналог, вводят каждые три недели (1Q3W), например, в первый день каждого трехнедельного курса лечения.

В конкретных вариантах осуществления опухоль или злокачественное новообразование представляет собой NSCLC; и дозу 100 мг связывающего агента, которым является акасунлимаб или его биоаналог, и дозу 200 мг антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, которым является пембролизумаб или его биоаналог, вводят каждые три недели (1Q3W), например, в первый день каждого трехнедельного курса лечения.

В других вариантах осуществления дозу 100 мг связывающего агента, которым является акасунлимаб или его биоаналог, и дозу 400 мг антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, которым является пембролизумаб или его биоаналог, вводят каждые шесть недель (1Q6W), например, в первый день каждого шестинедельного курса лечения.

В других вариантах осуществления опухоль или злокачественное новообразование представляет собой NSCLC; и где дозу 100 мг связывающего агента, которым является акасунлимаб или его биоаналог, и дозу 400 мг антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, которым является пембролизумаб, вводят каждые шесть недель (1Q6W), например, в первый день каждого шестинедельного курса лечения.

Сначала можно вводить антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, а затем связывающий агент. Альтернативно, сначала вводят связывающий агент, а затем антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент.

Каждую дозу можно вводить или вливать в течение минимум 30 минут, например, в течение минимум 60 минут, минимум 90 минут, минимум 120 минут или минимум 240 минут.

Связывающий агент, в частности, можно вводить с помощью внутривенной (IV) инфузии в течение 30 минут, например, в течение минимум 40 минут, минимум 50 минут или, например, в течение минимум 60 минут.

Антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент можно, в частности, вводить в виде внутривенной инфузии в течение 30 минут, например, в течение

минимум 40 минут, минимум 50 минут или, например, в течение минимум 60 минут.

Определенный выше связывающий агент и антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, можно вводить одновременно. В альтернативном предпочтительном варианте осуществления связывающий агент и ингибитор PD-1 вводят отдельно.

Определенный выше связывающий агент и антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в любой подходящей форме (например, в чистом виде как есть). Однако предпочтительно, чтобы связывающий агент и ингибитор PD-1 вводились в форме любой подходящей фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления по меньшей мере связывающий агент и антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в форме отдельных фармацевтических композиций (т. е. одной фармацевтической композиции для связывающего агента и одной фармацевтической композиции для антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента), предпочтительно связывающий агент и антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно вводят в форме отдельных фармацевтических композиций (т. е. одной фармацевтической композиции для связывающего агента и одной фармацевтической композиции для антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента).

Композиция или фармацевтическая композиция может быть приготовлена с носителем, вспомогательным веществом и/или разбавителем, а также с любыми другими компонентами, подходящими для фармацевтических композиций, включая известные адъюванты, в соответствии с традиционными методами, такими как те, которые раскрыты в Remington: The Science and Practice of Pharmacy. , 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Фармацевтически приемлемые носители или разбавители, а также любые известные адъюванты и вспомогательные вещества должны подходить для связывания связывающего агента и/или антитела, связывающегося с PD-1, или антигенсвязывающего фрагмента и выбранного способа введения. Пригодность носителей и других компонентов фармацевтических композиций определяется на основании отсутствия значительного негативного воздействия на желаемые биологические свойства выбранного соединения или фармацевтической композиции (например, менее чем существенное воздействие [10% или менее относительное ингибирование, 5% или менее относительное ингибирование и т. д.] при связывании антигена).

Композиция, в частности, фармацевтическая композиция связывающего агента, определенного выше, фармацевтическая композиция антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, может включать разбавители, наполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионогенный детергент, такой как Tween-20 или Tween-80), стабилизаторы (например, сахара или безбелковые аминокислоты), консерванты, солюбилизаторы и/или другие материалы, подходящие для включения в фармацевтическую композицию.

Фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или разбавители для терапевтического применения хорошо известны в фармацевтической области и описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R Gennaro edit. 1985).

Фармацевтические носители, вспомогательные вещества или разбавители можно выбирать с учетом предполагаемого пути введения и стандартной фармацевтической практики.

Фармацевтически приемлемые носители включают любые и все подходящие растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, агенты изотоничности, антиоксиданты и агенты, замедляющие абсорбцию, и т. п., которые физиологически совместимы с активным соединением, в частности, связывающим агентом, определенным выше, и антителом, связывающимся с PD-1, или его антигенсвязывающим фрагментом.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в (фармацевтических) композициях, включают воду, физиологический раствор, физиологический раствор с фосфатным буфером, этанол, декстрозу, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т. п.) и подходящие их смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, кукурузное масло, арахисовое масло, хлопковое масло и кунжутное масло, коллоидные растворы карбоксиметилцеллюлозы, трагакантовая камедь и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат, и/или различные буферы. Другие носители хорошо известны в фармацевтической области.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных растворов для инъекций или дисперсий для немедленного приема. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области. За исключением случаев, когда какие-либо традиционные среды или агенты несовместимы с активным соединением, предполагается их использование в (фармацевтических) композициях.

Термин «вспомогательное вещество», используемый в настоящем описании, относится к веществу, которое может присутствовать в (фармацевтической) композиции по настоящему изобретению, но не является активным ингредиентом. Примеры вспомогательных веществ включают, помимо прочего, носители, связующие, разбавители, смазывающие вещества, загустители, поверхностно-активные вещества, консерванты, стабилизаторы, эмульгаторы, буферы, ароматизаторы или красители.

Термин «разбавитель» относится к разбавляющему и/или разжижающему агенту. Более того, термин «разбавитель» включает любую одну или более жидких, жидких или твердых суспензий и/или смешивающих сред. Примеры подходящих разбавителей включают этанол, глицерин и воду.

(Фармацевтическая) композиция может также содержать фармацевтически приемлемые антиоксиданты, например (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как

аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т. п.; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т. п.; и (3) агенты, хелатирующие металлы, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т. п.

(Фармацевтическая) композиция может также содержать в композиции агенты изотоничности, такие как сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, глицерин или хлорид натрия.

(Фармацевтическая) композиция может также содержать один или более адъювантов, подходящих для выбранного пути введения, таких как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы, диспергирующие агенты, консерванты или буферы, которые могут увеличить срок хранения или эффективность композиции. Композиция, используемая в настоящем описании, может быть приготовлена с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, например, в составе препаратов с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Такие носители могут включать желатин, моностеарат глицерина, дистеарат глицерина, биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота отдельно или с воском, или другие материалы, хорошо известные в области техники. Способы приготовления таких составов обычно известны специалистам в данной области техники, см., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

«Фармацевтически приемлемые соли» включают, например, соли присоединения кислот, которые могут быть образованы, например, с использованием фармацевтически приемлемой кислоты, такой как соляная кислота, серная кислота, фумаровая кислота, малеиновая кислота, янтарная кислота, уксусная кислота, бензойная кислота, лимонная кислота, винная кислота, угольная кислота или фосфорная кислота. Кроме того, подходящие фармацевтически приемлемые соли могут включать соли щелочных металлов (например, соли натрия или калия); соли щелочноземельных металлов (например, соли кальция или магния); аммония (NH_4^+); и соли, образованные с подходящими органическими лигандами (например, катионами четвертичного аммония и амина, образованными с использованием противоанионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, алкилсульфонат и арилсульфонат). Иллюстративные примеры фармацевтически приемлемых солей включают, помимо прочего, ацетат, адипат, альгинат, аргинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бикарбонат, бисульфат, битартрат, борат, бромид, бутират, эдетат кальция, камфорат, камфорсульфонат, камзилат, карбонат, хлорид, цитрат, клавуланат, циклопентанпропионат, диглюконат, дигидрохлорид, додецилсульфат, эдетат, эдисилат,

эстолат, эсилат, этансульфонат, формиат, fumarат, галактат, галактуронат, глюцепт, глюкогептонат, глюконат, глутамат, глицерофосфат, гликолиларсанилат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гексилрезорцинат, гидрабамин, гидробромид, гидрохлорид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, гидроксинафтоат, йодид, изобутират, изотионат, лактат, лактобионат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, манделат, мезилат, метансульфонат, метилсульфат, мукат, 2-нафталинсульфонат, напсилат, никотинат, нитрат, аммонийная соль N-метилглюкамина, олеат, оксалат, памоат (эмбонат), пальмитат, пантотенат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат/дифосфат, фталат, пикрат, пивалат, полигалактуронат, пропионат, салицилат, стеарат, сульфат, суберат, сукцинат, таннат, тартрат, теоклат, тозилат, триэтиодид, ундеканоат, валерат и т. п. (см., например, S.M. Berge et al., «Pharmaceutical Salts», J. Pharm . Sci., 66, pp. 1-19 (1977)). Соли, которые не являются фармацевтически приемлемыми, могут быть использованы для получения фармацевтически приемлемых солей и включены в настоящее изобретение.

В одном варианте осуществления связывающий агент и ингибитор PD-1, используемые в настоящем описании, могут быть приготовлены таким образом, чтобы гарантировать правильное распределение *in vivo*. Фармацевтически приемлемые носители для парентерального введения включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области. За исключением случаев, когда какие-либо традиционные среды или агенты несовместимы с активным соединением, предполагается их использование в композициях. В композиции также можно включать другие активные или терапевтические соединения.

Фармацевтические композиции для инъекций обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть приготовлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высоких концентраций лекарственного средства. Носителем может быть водный или неводный растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т. п.) и подходящие их смеси, растительные масла, такие как оливковое масло и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, с помощью покрытия, такого как лецитин, поддерживая требуемый размер частиц в случае диспергирования и используя поверхностно-активные вещества. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как глицерин, маннит, сорбит или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекцируемых композиций может быть вызвана в том числе включением в композицию средства для замедления абсорбции, например, солей моностеарата и желатина. Стерильные инъекцируемые растворы могут быть приготовлены путем включения активного соединения в необходимом количестве в

соответствующий растворитель вместе с одним или в комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией микрофльтрацией. Как правило, дисперсии готовят путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсную среду и другие требуемые ингредиенты из тех, что перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъеклируемых растворов, примерами способов приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента вместе с любым дополнительным требуемым ингредиентом из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активных соединений в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией микрофльтрацией. В общем, дисперсии готовят путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсную среду и другие требуемые ингредиенты из тех, что перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъеклируемых растворов, примерами способов приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента вместе с любым дополнительным требуемым ингредиентом из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

В некоторых вариантах осуществления связывающий агент для применения согласно изобретению приготовлен в виде композиции или состава, содержащих гистидин, сахарозу и полисорбат-80 и имеющих рН от примерно 5 до примерно 6, например от 5 до 6. В частности, связывающий агент для применения согласно изобретению может находиться в композиции или составе, содержащих примерно 20 мМ гистидина, примерно 250 мМ сахарозы, примерно 0,02% полисорбата-80 и имеющих рН примерно 5,5, как например композиция или состав, содержащие 20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 0,02% полисорбата-80 и имеющие рН 5,5. В конкретных вариантах осуществления состав может содержать от примерно 10 до примерно 30 мг связывающего агента/мл, например, 10-30 мг связывающего агента/мл, в частности, примерно 20 мг связывающего агента/мл, например, 20 мг связывающего агента/мл.

Связывающий агент для применения согласно изобретению может быть представлен в композиции, как определено выше, а затем может быть разбавлен в 0,9% NaCl (физраствор) перед введением.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему

(i) связывающий агент, содержащий первую связывающую область, связывающуюся с CD137, и вторую связывающую область, связывающуюся с PD-L1

а) причем первая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL),

содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно,

и

b) вторая антигенсвязывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL) содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно, и

(ii) антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело ингибирует активность PD-1 и содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 43, 44 и 45? соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно, или антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно.

Варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании в отношении первого аспекта (в частности, в отношении связывающего агента и антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, также применимы к набору по второму аспекту. В одном варианте осуществления набор включает по меньшей мере два контейнера, где один из них содержит связывающий агент (как таковой или в форме (фармацевтической) композиции), а второй контейнер содержит антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент (как таковой или в форме (фармацевтической) композиции).

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к набору второго аспекта для использования в способе уменьшения или предотвращения прогрессирующей опухоли или лечения злокачественного новообразования у пациента. Варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании в отношении первого аспекта (в частности, в отношении связывающего агента, ингибитора PD-1, схемы лечения, конкретной опухоли/злокачественного новообразования и пациента) и/или второго аспекта также применимы к набору для использования третьего аспекта.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к способу уменьшения или предотвращения прогрессирующей опухоли или лечения злокачественного новообразования у пациента, причем указанный способ включает введение указанному пациенту связывающего агента до, одновременно или после введения антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, где связывающий агент содержит первую связывающую область, связывающуюся с CD137, и вторую связывающую область, связывающуюся с PD-L1;

а) причем первая связывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно,

и

б) вторая антигенсвязывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно,

и где антитело ингибирует активность PD-1 и содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 43, 44 и 45, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно, или антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно.

Варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании в отношении первого аспекта (в частности, в отношении связывающего агента, ингибитора PD-1, схемы лечения, конкретной опухоли/злокачественного новообразования и пациента), также применимы к способу четвертого аспекта.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, связывающемуся с PD-1, или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в способе уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли или лечения злокачественного новообразования у пациента, причем указанный способ включает введение указанному пациенту ингибитора PD-1 до, одновременно или после введения антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента,

где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 43, 44 и 45, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и последовательности CDR3, представленные в SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно, или антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно, и

где связывающий агент содержит первую связывающую область, связывающуюся с

CD137, и вторую связывающая область, связывающуюся с PD-L1.

а) причем первая связывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно,

и

б) вторая антигенсвязывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL) содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно.

Варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании в отношении первого аспекта (в частности, в отношении связывающего агента, ингибитора PD-1, необязательно одного или более дополнительных терапевтических агентов, схемы лечения, конкретной опухоли/злокачественного новообразования и пациента) также применимы к ингибитору PD-1 для применения в этом дополнительном аспекте.

Цитирование документов и исследований, упомянутых в настоящем описании, не означает признания того, что что-либо из вышеизложенного относится к уровню техники. Все утверждения относительно содержания этих документов основаны на информации, доступной заявителям, и не являются признанием правильности содержания этих документов.

Описание (включая следующие примеры) представлено для того, чтобы дать возможность специалисту в данной области техники создать и использовать различные варианты осуществления. Описания конкретных устройств, методов и приложений приведены только в качестве примеров. Различные модификации описанных здесь примеров будут очевидны специалистам в данной области техники, и общие принципы, определенные в настоящем описании, могут быть применены к другим примерам и применениям, не выходя за пределы сущности и объема различных вариантов осуществления. Таким образом, различные варианты осуществления не ограничиваются примерами, описанными и показанными в настоящем описании, но они должны согласовываться с объемом, соответствующим формуле изобретения.

Объекты настоящего описания

1. Связывающий агент для применения в способе уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли или лечения злокачественного новообразования у пациента, причем указанный способ включает введение указанному пациенту связывающего агента до, одновременно или после введения антитела, связывающегося с белком программируемой клеточной смерти-1 (PD-1), или его антигенсвязывающего фрагмента,

где

связывающий агент содержит первую связывающую область, связывающуюся с

CD137, и вторую связывающую область, связывающуюся с PD-L1;

а) причем первая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно,

и

б) вторая антигенсвязывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL) содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно,

и

антитело, связывающееся с PD-1, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 43, 44 и 45, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно, или антитело, связывающееся с PD-1, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно.

2. Связывающий агент для применения по п. 1, где антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 49, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 50.

3. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50.

4. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

5. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где антитело, связывающееся с PD-1, представляет собой пембролизумаб или его биоаналог.

6. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где PD-L1 представляет собой PD-L1 человека, в частности, PD-L1 человека, содержащий последовательность SEQ ID NO: 40, и/или CD137 представляет собой CD137 человека, в частности, CD137 человека, содержащий последовательность SEQ ID NO: 38.

7. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где первая связывающая область связывающего агента содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или 9, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ. ID NO: 5 или 10.

8. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где вторая связывающая область связывающего агента содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15.

9. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где первая связывающая область связывающего агента содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или 9, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 10.

10. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где вторая связывающая область связывающего агента содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

11. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где

а) первая связывающая область связывающего агента содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5;

и

б) вторая связывающая область связывающего агента содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

12. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент представляет собой полиспецифическое антитело, такое как биспецифическое антитело.

13. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент представлен в форме полноразмерного антитела или фрагмента антитела.

14. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где каждая вариабельная область содержит три области, определяющие комплементарность, (CDR1, CDR2 и CDR3), и четыре каркасные области (FR1, FR2, FR3 и FR4).

15. Связывающий агент для применения по п. 13, где указанные области, определяющие комплементарность, и указанные каркасные области расположены от аминоконца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

16. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент содержит

i) полипептид, содержащий, состоящий из или по существу состоящий из указанной вариабельной области первой тяжелой цепи (VH) и константной области первой тяжелой цепи (CH), и

ii) полипептид, содержащий, состоящий из или по существу состоящий из указанной вариабельной области второй тяжелой цепи (VH) и константной области второй тяжелой цепи (CH).

17. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент содержит

i) полипептид, содержащий указанную вариабельную область первой легкой цепи (VL) и дополнительно содержащий константную область первой легкой цепи (CL), и

ii) полипептид, содержащий указанную вариабельную область второй легкой цепи (VL) и дополнительно содержащий константную область второй легкой цепи (CL).

18. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент представляет собой антитело, содержащее первое связывающее плечо и второе связывающее плечо, где

первое связывающее плечо содержит

i) полипептид, содержащий указанную вариабельную область первой тяжелой цепи (VH) и константную область первой тяжелой цепи (CH), и

ii) полипептид, содержащий указанную вариабельную область первой легкой цепи (VL) и константную область первой легкой цепи (CL);

и второе связывающее плечо содержит

iii) полипептид, содержащий указанную вариабельную область второй тяжелой цепи (VH) и константную область второй тяжелой цепи (CH), и

iv) полипептид, содержащий указанную вариабельную область второй легкой цепи (VL) и константную область второй легкой цепи (CL).

19. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент содержит

i) первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную связываться с CD137, и

ii) вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную связываться с PD-L1.

20. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где указанный связывающий агент содержит

i) первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную связываться с CD137, причем первая тяжелая цепь содержит константную область первой тяжелой цепи, а первая легкая цепь содержит константную область первой легкой цепи; и

ii) вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, содержащую указанную антигенсвязывающую область, способную связываться с PD-L1, причем вторая тяжелая цепь содержит константную область второй тяжелой цепи, и вторая легкая цепь содержит константную область второй легкой цепи.

21. Связывающий агент для применения по любому из пп. 16-20, где каждая из константных областей первой и второй тяжелой цепи (CH) содержит одну или более из константной области тяжелой цепи 1 (CH1), шарнирной области, константной области тяжелой цепи 2 (CH2) и константной области тяжелой цепи 3 (CH3), предпочтительно, по меньшей мере, шарнирную область, область CH2 и область CH3.

22. Связывающий агент для применения по любому из пп. 16-21, где каждая из константных областей первой и второй тяжелой цепи (CH) содержит область CH3, и где две области CH3 содержат асимметричные мутации.

23. Связывающий агент для применения по любому из пп. 16-21, где в указанной константной области первой тяжелой цепи (CH) по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU была заменена, и в указанной константной области второй тяжелой цепи (CH) по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU была заменена, и где указанная первая и указанная вторая тяжелые цепи не заменены в одних и тех же положениях.

24. Связывающий агент для применения по п. 23, где (i) аминокислота в положении, соответствующем F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляет собой L в указанной константной области первой тяжелой цепи (CH), а аминокислота в положении, соответствующем K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляет собой R в указанной константной области второй

тяжелой цепи (СН), или (ii) аминокислота в положении, соответствующем К409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляет собой R в указанной первой тяжелой цепи, а аминокислота в положении, соответствующем F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляет собой L в указанной второй тяжелой цепи.

25. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где указанный связывающий агент индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с другим антителом, содержащим такие же первую и вторую антигенсвязывающие области и две константные области тяжелой цепи (СН), содержащие шарнирную область, области СН2 и СН3 IgG1 человека.

26. Связывающий агент для применения по п. 25, где указанные константные области первой и второй тяжелой цепи (СН) модифицированы так, что антитело индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с антителом, которое идентично, за исключением того, что оно содержит немодифицированные константные области первой и второй тяжелой цепи (СН).

27. Связывающий агент для применения по п. 26, где каждая из указанных немодифицированных константных областей первой и второй тяжелой цепи (СН) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19 или 25.

28. Связывающий агент для применения по п. 26 или 27, где указанную Fc-опосредованную эффекторную функцию измеряют путем связывания с Fcγ-рецепторами, связывания с C1q или индукции Fc-опосредованной перекрестной сшивки Fcγ-рецепторов.

29. Связывающий агент для применения по п. 28, где указанную Fc-опосредованную эффекторную функцию измеряют путем связывания с C1q.

30. Связывающий агент для применения по любому из пп. 25-29, где указанные константные области первой и второй тяжелой цепи модифицированы так, что связывание C1q с указанным антителом снижено по сравнению с антителом дикого типа, предпочтительно снижено по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100%, причем связывание C1q предпочтительно определяют с помощью ИФА.

31. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где по меньшей мере в одной из указанных константных областей первой и второй тяжелой цепи (СН) одна или более аминокислот в положениях, соответствующих положениям L234, L235, D265, N297, и P331, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU не являются L, L, D, N и P, соответственно.

32. Связывающий агент для применения по п. 31, где положения, соответствующие положениям L234 и L235, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляют собой F и E, соответственно, в указанных первой и второй тяжелых цепях.

33. Связывающий агент для применения по п. 31 или 32, где положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляют собой F, E и A, соответственно, в указанных константных

областях первой и второй тяжелой цепи (НС).

34. Связывающий агент для применения по любому из пп. 31-33, где положения, соответствующие положениям L234 и L235, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU обеих константных областей первой и второй тяжелой цепи представляют собой F и E, соответственно, и где (i) положение, соответствующее F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU константной области первой тяжелой цепи представляет собой L, а положение, соответствующее K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU второй тяжелой цепи представляет собой R, или (ii) положение, соответствующее K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU константной области первой тяжелой цепи представляет собой R, и положение, соответствующее F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU второй тяжелой цепи представляет собой L.

35. Связывающий агент для применения по любому из пп. 31-34, где положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU обеих константных областей первой и второй тяжелой цепи представляют собой F, E и A, соответственно, и где (i) положение, соответствующее F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU константной области первой тяжелой цепи представляет собой L, и положение, соответствующее K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU константной области второй тяжелой цепи представляет собой R, или (ii) положение, соответствующее K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU первой тяжелой цепи представляет собой R, и положение, соответствующее F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU второй тяжелой цепи представляет собой L.

36. Связывающий агент для применения по любому из пп. 16-35, где константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности SEQ ID NO: 19 или 25 [IgG1-FC];

б) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 10 замен, как например, по большей мере 9 замен, по большей мере 8, по большей мере 7, по большей мере 6, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

37. Связывающий агент для применения по любому из пп. 16-36, где константная область указанной первой или второй тяжелой цепи, как например второй тяжелой цепи содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной

последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности SEQ ID NO: 20 или 26 [IgG1-F405L];

б) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или С -конца последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 9 замен, как например, по большей мере 8, по большей мере 7, по большей мере 6, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

38. Связывающий агент для применения по любому из пп. 16-36, где константная область указанной первой или второй тяжелой цепи, как например, первой тяжелой цепи, содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности SEQ ID NO: 21 или 27 [IgG1-K409R];

б) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или С -конца последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 10 замен, как например, по большей мере 9 замен, по большей мере 8, по большей мере 7, по большей мере 6, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

39. Связывающий агент для применения по любому из пп. 16-15, где константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности SEQ ID NO: 22 или 28 [IgG1-Fc_FEA];

б) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или С -конца последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 7 замен, как например, по большей мере 6 замен, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

40. Связывающий агент для применения по любому из пп. 16-39, где константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи, как например второй тяжелой цепи, содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной

последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности SEQ ID NO: 24 или 30 [IgG1-Fc_FEAL];

б) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 6 замен, как например, по большей мере 5 замен, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

41. Связывающий агент для применения по любому из пп. 16-40, где константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи, как например, первой тяжелой цепи, содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности SEQ ID NO: 23 или 29 [IgG1-Fc_FEAR];

б) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 6 замен, как например, по большей мере 5 замен, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

42. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где указанный связывающий агент содержит константную область легкой цепи каппа (κ).

43. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где указанный связывающий агент содержит константную область легкой цепи лямбда (λ).

44. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где указанная константная область первой легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа (κ) или константную область легкой цепи лямбда (λ).

45. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где указанная константная область второй легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи лямбда (λ) или константную область легкой цепи каппа (κ).

46. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где указанная константная область первой легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа (κ), а указанная константная область второй легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи лямбда (λ), или указанная константная область первой легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи лямбда (λ), а указанная константная область второй легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа (κ).

47. Связывающий агент для применения по любому из пп. 42-46, где легкая цепь каппа (κ) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

a) последовательности SEQ ID NO:35,

b) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в а); и

c) последовательности, имеющей по большей мере 10 замен, например по большей мере 9 замен, по большей мере 8, по большей мере 7, по большей мере 6, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или b).

48. Связывающий агент для применения по любому из пп. 43-47, где легкая цепь лямбда (λ) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

a) последовательности SEQ ID NO: 36,

b) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в а); и

c) последовательности, имеющей по большей мере 10 замен, например по большей мере 9 замен, по большей мере 8, по большей мере 7, по большей мере 6, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или b).

49. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

50. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент представляет собой полноразмерное антитело IgG1.

51. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент представляет собой антитело аллотипа IgG1m(f).

52. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент содержит

i) первую тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную связываться с CD137, где первая тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 31, и первая легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 32;

ii) вторую тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие указанную

антигенсвязывающую область, способную связываться с PD-L1, где вторая тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 33, и вторая легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 34.

53. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент представляет собой акасунлимаб или его биоаналог.

54. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент находится в композиции или составе, содержащем гистидин, сахарозу и полисорбат-80, и имеет рН от 5 до 6.

55. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент находится в композиции или составе, содержащем примерно 20 мМ гистидина, примерно 250 мМ сахарозы, примерно 0,02% полисорбата-80, и имеет рН примерно 5,5.

56. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент находится в композиции или составе, содержащем 10-30 мг связывающего агента/мл, как например 20 мг связывающего агента/мл.

57. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент находится в композиции, как определено по любому из пп. 54-56, и перед введением его разбавляют в 0,9% NaCl (в физрастворе).

58. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где пациентом является человек.

59. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где опухоль или злокачественное новообразование представляет собой солидную опухоль или злокачественное новообразование.

60. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где указанная опухоль представляет собой PD-L1-положительную опухоль.

61. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где опухоль или злокачественное новообразование выбраны из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака легких (например, немелкоклеточного рака легких (NSCLC)), колоректального рака, рака головы и шеи, рака желудка, рака молочной железы, рака почки, уротелиального рака, рака мочевого пузыря, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака печени, тимомы и карциномы тимуса, рака головного мозга, глиомы, аденокарциномы, рака щитовидной железы, других видов рака кожи, саркомы, множественной миеломы, лейкоза, лимфомы, миелодиспластических синдромов, рака эндометрия, рака предстательной железы, рака полового члена, рак шейки матки, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, карциномы клеток Меркеля и мезотелиомы.

62. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где опухоль или злокачественное новообразование выбраны из группы, состоящей из рака легких (например, немелкоклеточного рака легких (NSCLC)), уротелиального рака (рак мочевого пузыря, мочеточника, уретры или почечной лоханки), рака эндометрия (EC),

рака молочной железы (например, трижды негативного рака молочной железы (TNBC)) и плоскоклеточного рака головы и шеи (SCCHN) (например, рака полости рта, глотки или гортани).

63. Связывающий агент для применения по п. 61 или 62, где опухоль или злокачественное новообразование представляет собой рак легких, в частности немелкоклеточный рак легких (NSCLC), такой как плоскоклеточный или неплоскоклеточный NSCLC.

64. Связывающий агент для применения по любому из пп. 61-63, где опухоль или злокачественное новообразование являются метастатическими, как например, метастатический NSCLC.

65. Связывающий агент для применения по пп. 61-64, где рак легких, в частности NSCLC, не имеет мутации, сенсibiliзирующей эпидермальный фактор роста (EGFR), и/или транслокации/реарранжировки ROS1 анапластической лимфомы (ALK).

66. Связывающий агент для применения по любому из пп. 61-65, где рак легких, в частности NSCLC, включает клетки злокачественного новообразования, и PD-L1 экспрессируется в $\geq 1\%$ клеток злокачественного новообразования или опухоли, например по оценке иммуногистохимии (ИГХ).

67. Связывающий агент для применения по п. 66, где рак легких, в частности NSCLC, включает клетки злокачественного новообразования, и PD-L1 экспрессируется в 1% - 49% клеток злокачественного новообразования или опухолевых клеток, например по оценке иммуногистохимии (ИГХ).

68. Связывающий агент для применения по п. 66, где рак легких, в частности NSCLC, включает клетки злокачественного новообразования, и PD-L1 экспрессируется в $\geq 50\%$ клеток злокачественного новообразования или опухолевых клеток, например по оценке иммуногистохимии (ИГХ).

69. Связывающий агент для применения по предыдущим пп., где пациент ранее не получал системного лечения метастатического заболевания.

70. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где пациент ранее не получал лечения ингибитором контрольной точки; например, ингибитором PD-1 или ингибитором PD-L1, таким как антитело против PD-1 или антитело против PD-L1.

71. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где пациент ранее не получал лечение с использованием агента, нацеленного на 4-1BB (CD137), такого как антитело против 4-1BB (CD137), с использованием противоопухолевой вакцины, или с использованием аутологичной клеточной иммунотерапии.

72. Связывающий агент для применения по любому из пп. 1-68, где опухоль или злокачественное новообразование рецидивируют и/или являются резистентными после лечения, такого как системное лечение с использованием ингибитора контрольной точки.

73. Связывающий агент для применения по любому из пп. 1-68 и 72, где пациент

получал по меньшей мере 1 предшествующую линию системной терапии, такой как системная терапия, включающая ингибитор PD-1 или ингибитор PD-L1, такой как антитело против PD-1 или антитело против PD-L1.

74. Связывающий агент для применения по любому из пп. 1-68, 72 и 73, где злокачественное новообразование или опухоль рецидивируют и/или являются резистентными, или у пациента наблюдается прогрессирование после лечения ингибитором PD-1 или ингибитором PD-L1, таким как антитело против PD-1 или антитело против PD-L1, причем ингибитор PD-1 или ингибитор PD-L1 вводят в виде монотерапии или как часть комбинированной терапии.

75. Связывающий агент для применения по любому из пп. 1-68 и 72-74, где последнее предшествующее лечение проводили ингибитором PD1 или ингибитором PD-L1, таким как антитело против PD-1 или антитело против PD-L1, причем ингибитор PD-1 или ингибитор PD-L1 вводят в виде монотерапии или как часть комбинированной терапии.

76. Связывающий агент для применения по любому из пп. 1-68 и 72-74, где время с момента прогрессирования при последнем лечении ингибитором PD1 или ингибитором PD-L1, таким как антитело против PD-1 или антитело против PD- L1, составляет 8 месяцев или меньше, например 7 месяцев или меньше, 6 месяцев или меньше, 5 месяцев или меньше, 4 месяца или меньше, 3 месяца или меньше, 2 месяца или меньше, 1 месяц или меньше, 3 недели или меньше или например, 2 недели или меньше.

77. Связывающий агент для применения по любому из пп. 1-68 и 72-74, где время с момента последнего введения ингибитора PD1 или ингибитора PD-L1, такого как антитело против PD-1 или антитело против PD-L1, как части последнего предшествующего лечения составляет 8 месяцев или меньше, например, 7 месяцев или меньше, 6 месяцев или меньше, 5 месяцев или меньше, 4 месяца или меньше, 3 месяца или меньше, 2 месяца или меньше, 1 месяц или меньше, 3 недели или меньше или например 2 недели или меньше.

78. Связывающий агент для применения по любому из пп. 1-68 и 72-74, где злокачественное новообразование или опухоль рецидивируют и/или являются резистентными, или у пациента наблюдается прогрессирование во время или после

i) химиотерапии с платиновым дублетом после лечения антителом против PD-1 или антителом против PD-L1, или

ii) лечения антителом против PD-1 или антителом против PD-L1 после химиотерапии с платиновым дублетом.

79. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где пациент не получал предшествующего лечения таксановым химиотерапевтическим агентом, например, доцетакселом, как например, предшествующего лечения NSCLC таксановым химиотерапевтическим агентом, например, доцетакселом.

80. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент и антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий

фрагмент вводят по меньшей мере в одном курсе лечения, причем каждый курс лечения составляет три недели (21 дней) или шесть недель (42 дня).

81. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где одну дозу связывающего агента и одну дозу антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента вводят каждые три недели (1Q3W).

82. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где одну дозу связывающего агента и одну дозу антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента вводят каждые шесть недель (1Q6W).

83. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где одну дозу связывающего агента и одну дозу антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, вводят в первый день каждого курса лечения.

84. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где количество указанного связывающего агента, вводимое в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, составляет 100 мг.

85. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где количество указанного антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, вводимое в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, составляет 200 мг.

86. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где количество указанного антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, вводимое в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, составляет 400 мг.

87. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где дозу 100 мг связывающего агента и дозу 200 мг антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента вводят каждые три недели (1Q3W).

88. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где дозу 100 мг связывающего агента и дозу 400 мг антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента вводят каждые шесть недель (1Q6W).

89. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где опухоль или злокачественное новообразование представляет собой NSCLC; и где дозу 100 мг связывающего агента, которым является акасунлимаб или его биоаналог, и дозу 200 мг антитела, связывающегося с PD-1, которое представляет собой пемболизумаб, вводят каждые три недели (1Q3W), например, в первый день каждого трехнедельного курса лечения.

90. Связывающий агент для применения по любому из пп. 1-88, где опухоль или злокачественное новообразование представляет собой NSCLC; и где дозу 100 мг связывающего агента, которым является аказунлимаб или его биоаналог, и дозу 400 мг антитела, связывающегося с PD-1, которым является пемболизумаб, вводят каждые шесть недель (1Q6W), например, в первый день каждого шестинедельного курса лечения.

91. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где сначала вводят антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, а затем связывающий агент.

92. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент вводят посредством внутривенной (IV) инфузии в течение минимум 30 минут, например, в течение минимум 60 минут.

93. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент вводят посредством внутривенной (IV) инфузии в течение 30 минут.

94. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где ингибитор PD-1 вводят в виде внутривенной инфузии в течение 30 минут.

95. Набор, содержащий

(i) связывающий агент, содержащий первую связывающую область, связывающуюся с CD137, и вторую связывающую область, связывающуюся с PD-L1

а) причем первая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно,

б) вторая антигенсвязывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно,

и

(ii) антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 43, 44 и 45, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно, или антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно.

96. Набор по п. 95, где связывающий агент и/или антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент является таким, как определено по любому из пп. 1-94.

97. Набор по п. 95 или 96, где связывающий агент и антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент предназначены для системного введения, в частности, для инъекции или инфузии, такой как внутривенная инъекция или инфузия.

98. Набор по любому из пп. 95-97 для применения в способе уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли или лечения злокачественного новообразования у пациента.

99. Набор для применения по п. 98, где опухоль или злокачественное новообразование, и/или пациент, и/или способ такие, как определено по любому из пп. 1-94.

100. Способ уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли или лечения злокачественного новообразования у пациента, причем указанный способ включает введение указанному пациенту связывающего агента до, одновременно или после введения антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента,

где связывающий агент содержит первую связывающую область, связывающуюся с CD137, и вторую связывающую область, связывающуюся с PD-L1.

с) причем первая связывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно,

и

d) вторая антигенсвязывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно,

и

где антитело, связывающееся с PD-1, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 43, 44 и 45, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно, или антитело, связывающееся с PD-1, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно.

101. Способ по п. 100, где опухоль или злокачественное новообразование, и/или пациент, и/или способ, и/или связывающий агент, и/или ингибитор PD-1 соответствует/соответствуют любому из пп. 1-94.

Дополнительные аспекты настоящего изобретения раскрыты в настоящем описании.

Примеры

Пример 1: Секреция цитокинов в совместных культурах очищенных CD8⁺ Т-клеток и аллогенных зрелых дендритных клеток (mDC)

Методы

Моноциты и Т-клетки здоровых доноров

CD14⁺ моноциты и очищенные CD8⁺ Т-клетки были получены от Precision Medicine или BioIVT. Пары аллогенных доноров использовали для реакции аллогенных смешанных лимфоцитов (анализ MLR).

Дифференцировка моноцитов в незрелые дендритные клетки

Моноциты CD14⁺ человека были получены от здоровых доноров (см. выше). Для дифференцировки в незрелые дендритные клетки (iDC) $1-1,5 \times 10^6$ моноцитов/мл культивировали в течение шести дней в полной среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (формула модификации ATCC; ThermoFisher, кат. № A1049101) с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (FBS; Gibco, кат. № 16140071), 100 нг/мл гранулоцит-макрофагколониестимулирующего фактора (GM-CSF; BioLegend, кат. № 766106) и 300 нг/мл интерлейкина-4 (IL-4; BioLegend, кат. № № 766206) в культуральных колбах T25 (Falcon, кат. № 353108) при 37°C. Один раз в течение этих шести дней среду заменяли свежей средой с добавками.

Созревание iDC

Для созревания iDC клетки собирали путем сбора неприкрепившихся клеток, подсчитывали, инкубировали при концентрации $1-1,5 \times 10^6$ клеток/мл в полной среде RPMI 1640, дополненной 10% FBS, 100 нг/мл GM-CSF, 300 нг/мл IL-4 и 1×10^6 с липополисахаридом (LPS; ThermoFisher, кат. № 00-4976-93) в течение 24 часов до начала анализа MLR при 37°C.

Реакция смешанных лимфоцитов (MLR)

За день до начала анализа MLR очищенные CD8⁺ Т-клетки, полученные от аллогенных здоровых доноров, размораживали. Клетки ресуспендировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в полной среде RPMI 1640, дополненной 10% FBS и 10 нг/мл IL-2 (BioLegend, кат. № 589106) и инкубировали O/N при 37°C.

На следующий день LPS-созревшие дендритные клетки (mDC, см. «Созревание iDC») и аллогенные очищенные CD8⁺ Т-клетки собирали и ресуспендировали в среде AIM-V (ThermoFisher, кат. № 12055091) при 4×10^5 клеток/мл и 4×10^6 клеток/мл, соответственно.

В совместных культурах 20000 mDC инкубировали с 200000 аллогенных очищенных CD8⁺ Т-клеток (соотношение DC:Т-клетки 1:10) в присутствии GEN1046 (0,001-30 мкг/мл) либо отдельно, либо в комбинации с пембролизумабом лабораторного класса (0,1-30 мкг/мл или 0,1-100 мкг/мл), bsIgG1-PD-L1×ctrl (30 мкг/мл), bsIgG1-ctrl×4-1BB (30 мкг/мл), с антителами изотипического контроля IgG4 (100 мкг/мл) или IgG1-ctrl-FEAL (30 мкг/мл; таблица 5) в среде AIM-V в 96-луночном круглодонном планшете (Falcon, кат. № 353227) при 37°C. Через 5 дней планшеты центрифугировали при $500 \times g$ в течение 5 мин и супернатант осторожно переносили из каждой лунки в новый 96-луночный круглодонный планшет.

Собранные супернатанты из анализа MLR анализировали на уровне интерферона (IFN) γ с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора Alpha

Lisa IFN γ (Perkin Elmer, кат. № AL217) на приборе Envision в соответствии с инструкциями производителя. TNF α и IL-2 измеряли в рамках панели Milliplex MAP-Человеческие цитокины/TH17 (Millipore Sigma, кат. № SPR1526) на приборе Luminex FLEXMAP 3D.

Таблица 5:

Тестируемое соединение	Поставщик, кат. по.	включающее SEQ ID NO
GEN1046	N/A	CD137-связывающее плечо: SEQ ID NO: 1, 5, 35, 29 PD-L1-связывающее плечо: SEQ ID NO: 11, 15, 36, 30
bsIgG1-PD-L1xctrl ¹	N/A	SEQ ID NO: 11, 15, 53, 54, 35, 36, 29, 30
bsIgG1-ctrlx4-1BB ¹	N/A	SEQ ID NO: 35, 36, 1, 5, 35, 36, 29, 30
IgG1-ctrl-FEAL ²	N/A	SEQ ID NO: 53, 54, 30
Пембролизумаб	Selleckchem, кат. по. A2005 (вариант не клинического/лабораторного класса клинического продукта Пембролизумаб; Лот по. A200504)	N/A
IgG4	Biologend, кат. по. 403702 (антитело изотипического контроля для Пембролизумаб)	N/A

¹Контрольная связывающая группа на основе IgG1-b12-антитела против HIV gp120 (Barbas et al., J Mol Biol 230: 812-823)

Результаты

GEN1046 индуцировал секрецию IL-2 в совместных культурах очищенных CD8⁺ Т-клеток и аллогенных mDC по сравнению с IgG1-ctrl-FEAL в трех парах доноров (см. Фигуру 2). Напротив, пембролизумаб вызывал лишь ограниченное увеличение уровня IL-2 (<50 пг/мл) по сравнению с антителом изотипического контроля IgG4. Одновременное воздействие GEN1046 и пембролизумаба вызывало мощное увеличение уровня IL-2 по сравнению с GEN1046 или одним пембролизумабом, повышая максимальную концентрацию IL-2 примерно в 2-3 раза по сравнению с одним GEN1046.

Кроме того, GEN1046 индуцировал секрецию IFN γ в совместных культурах очищенных CD8⁺ Т-клеток и аллогенных mDC по сравнению с IgG1-ctrl-FEAL в трех парах доноров (см. Фигуру 3). Аналогично, пембролизумаб усиливал секрецию IFN γ у всех трех пар доноров, хотя и в более ограниченной степени по сравнению с GEN1046. Одновременное воздействие GEN1046 и пембролизумаба вызывало дальнейшее повышение уровня IFN γ по сравнению с GEN1046 или пембролизумабом в отдельности, особенно при более низких дозах GEN1046 (<1 мкг/мл).

Кроме того, GEN1046 индуцировал секрецию TNF α в совместных культурах очищенных CD8⁺ Т-клеток и аллогенных mDC по сравнению с IgG1-ctrl-FEAL в трех парах доноров (см. Фигуру 4). Напротив, пембролизумаб индуцировал лишь ограниченное количество TNF α по сравнению с GEN1046. Одновременное воздействие GEN1046 и пембролизумаба вызывало небольшое увеличение TNF α по сравнению с одним GEN1046, особенно в дозе 0,1 мкг/мл GEN1046 со всеми протестированными концентрациями пембролизумаба, что указывает на сдвиг активности влево.

В совокупности эти результаты показывают, что комбинация GEN1046 с пембролизумабом усиливает секрецию IFN γ , IL-2 и TNF α по сравнению с каждым антителом индивидуально в анализе MLR mDC/CD8⁺ Т-клеток. В то время как усиление IFN γ наблюдалось в основном при низких концентрациях GEN1046, комбинация GEN1046 с пембролизумабом продемонстрировала усиление IL-2 при нескольких концентрациях.

Пример 2: Рост опухоли рака толстой кишки MC38 мыши

Методы

Клетки рака толстой кишки мыши MC38 культивировали в модифицированной среде Игла Дульбекко с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки при 37°C, 5% CO₂. Клетки MC38 собирали из культуры клеток, растущих в логарифмической фазе, и оценивали количественно.

Клетки MC38 (1×10^6 опухолевых клеток в 100 мкл PBS) вводили подкожно в правый нижний бок самкам мышей C57BL/6 (полученных от Vital River Laboratories Research Models and Services; возраст 6-8 недель на начало эксперимента).

Рост опухоли оценивали три раза в неделю с помощью штангенциркуля. Объемы опухолей (мм³) рассчитывали на основе измерений штангенциркулем как $([длина] \times [ширина]^2) / 2$, где длина представляет собой самый длинный размер опухоли, а ширина представляет собой самый длинный размер опухоли, перпендикулярный длине.

Лечение начинали, когда опухоли достигали медианного объема 64 мм³. Мышей рандомизировали на группы (n=10 на группу) с одинаковым средним объемом опухоли до обработки (64 мм³). В дни обработки мышам внутрибрюшинно вводили mbsIgG2a-PD-L1 \times 4-1BB (5 мг/кг; объем инъекции 10 мкл/г массы тела; две дозы еженедельно в течение трех недель [2QW \times 3]), антитело против PD-1 мыши (анти-mPD-1; 10 мг/кг; объем инъекции 10 мкл/г массы тела; 2QW \times 3; клон RMP1-14; Leinco Technologies, кат. № P372), комбинация mbsIgG2a-PD-L1 \times 4-1BB (5 мг/кг) с анти-mPD-1 (10 мг/кг; в двух отдельных инъекциях [mbsIgG2a-PD-L1 \times 4-1BB с последующим введением анти-mPD-1 через 20 мин] с объемом инъекции 10 мкл/г массы тела; 2QW \times 3) или PBS с объемом инъекции 10 мкл/г массы тела (таблица 6).

Мышей ежедневно контролировали на наличие клинических признаков заболевания. Измерения массы тела проводили три раза в неделю после рандомизации. Эксперимент заканчивался для отдельных мышей, когда объем опухоли превышал 1500 мм³, или когда животные достигали гуманных конечных точек (например, когда у мышей

наблюдалась потеря массы тела на 20%, когда в опухолях наблюдалось изъязвление [$>75\%$], когда наблюдались серьезные клинические признаки и/ или когда рост опухоли блокировал физическую активность мыши).

Таблица 6. Группы обработки и схема дозирования

Группа обработки	N на группу	Обработка	Доза	Путь введения	Схема введения	Seq ID/ Поставщик, кат. по.
1	10	PBS	N/A	IP	2QW×3 ^a	N/A
2	10	Анти-mPD-1	10 мг/кг	IP	2QW×3 ^a	Leinco Technologies, кат. по. P372
3	10	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB	5 мг/кг	IP	2QW×3 ^a	Seq ID: 60, 61, 55, 56, 57, 58, 59
4	10	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB + анти-mPD-1	5 мг/кг + 10 мг/кг	IP	2QW×3 ^a	Seq ID:60, 61, 55, 56, 57, 58, 59 Leinco Technologies, кат. по. P372

^a2QW×3: две дозы еженедельно в течение трех недель.

Результаты

Быстрый рост опухоли наблюдался у мышей с MC38, обработанных PBS (Фигура 5A). У мышей, получавших анти-mPD-1 (10 мг/кг) или mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB (5 мг/кг), наблюдалась задержка роста опухоли, с более выраженной задержкой роста опухоли, индуцированной mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB (Фигура 5A). У мышей, получавших mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB (5 мг/кг) в комбинации с анти-mPD-1 (10 мг/кг; оба 2QW×3), полная регрессия опухоли наблюдалась у 6 из 10 мышей на 21-й день после начала обработки по сравнению с отсутствием полной регрессии опухоли, наблюдаемой для любого агента индивидуально в этой модели (Фигура 5A). Анализ Каплана-Мейера показал, что обработка комбинацией mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB и анти-mPD-1 вызывала значительное увеличение выживаемости без прогрессирования, определяемой как процент мышей с объемом опухоли менее 500 мм³ по сравнению с группой, получавшей PBS ($p<0,001$), и по сравнению с группой, получавшей только одно антитело ($p\leq 0,001$; Mantel-Сох; Фигура 5B, Таблица 7). Следовательно, при использовании этой комбинации наблюдался терапевтический синергизм, определяемый как превосходящая ($p<0,05$) противоопухолевая эффективность по сравнению с активностью, проявляемой каждым агентом в качестве монотерапии.

Эти результаты дают обоснование для оценки комбинации GEN1046 с антителом против PD-1 для дальнейшего усиления противоопухолевого иммунного ответа у онкологических больных с целью получения стойких и глубоких клинических ответов и

повышения выживаемости.

Таблица 7. Анализ Мантеля-Кокса выживаемости без прогрессирования, индуцированной mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB, анти-mPD-1 (индивидуально или в комбинации) в модели MC38 у мышей C57BL/6

Сравниваемые группы обработки			Выживаемость без прогрессирования ¹
			Р-значение Мантеля-Кокса
PBS	vs	Анти-mPD-1	0,012
PBS	vs	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB	<0,001
PBS	vs	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB+анти-mPD-1	<0,001
Анти-mPD-1	vs	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB	0,515
Анти-mPD-1	vs	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB+анти-mPD-1	0,001
mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB (5 мг/кг)	vs	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB+анти-mPD-1	<0,001

¹Объем опухоли <500 мм³ использовали в качестве порогового значения для выживаемости без прогрессирования. Анализ Мантеля-Кокса проводили на 45-й день.

Пример 3: Анализ антигенспецифической пролиферации CD8+Т-клеток для определения зависимости пролиферации от дозы GEN1046 и антитела против PD-1 пембролизумаба в антигенспецифическом Т-клеточном анализе с активной осью PD1/PD-L1.

Для измерения индукции пролиферации Т-клеток с помощью DuoBody-PD-L1×4-1BB или пембролизумаба был проведен анализ антигенспецифической пролиферации Т-клеток с активной осью PD1/PD-L1.

HLA-A2+ мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) были получены от здоровых доноров (Transfusionszentrale, Университетская больница, Майнц, Германия). Моноциты выделяли из PBMC с помощью технологии магнитно-активируемой клеточной сортировки (MACS) с использованием микрогранул против CD14 (MilteNY; кат. № 130-050-201), согласно инструкции производителя. Лимфоциты периферической крови (PBL, CD14-отрицательная фракция) замораживали для будущего выделения Т-клеток. Для дифференцировки в незрелые DC (iDC) 1×10⁶ моноцитов/мл культивировали в течение пяти дней в среде RPMI GlutaMAX (Life Technologies GmbH, кат. № 61870-044), содержащей 5% человеческой сыворотки АВ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, кат. № H4522-100ML), пируват натрия (Life Technologies GmbH, кат. № 11360-039), заменимые аминокислоты (Life Technologies GmbH, кат. № 11140-035), 100 МЕ/мл пенициллина-стрептомицина (Life Technologies GmbH, кат. №15140-122), 1000 МЕ/мл гранулоцит-макрофаг колониестимулирующего фактора (GM-CSF; MilteNY, кат. № 130-093-868) и 1000 МЕ/мл интерлейкина-4 (IL-4; MilteNY, кат. № 130-093-924). Один раз в течение этих пяти дней половину среды заменяли свежей средой. iDC собирали путем сбора неприкрепившихся клеток, а прикрепившиеся клетки отделяли путем инкубации с PBS,

содержащим 2 mM ЭДТА, в течение 10 минут при 37°. После промывки iDC замораживали в RPMI GlutaMAX, содержащей 10% об./об. ДМСО (AppliChem GmbH, кат. № A3672,0050) + 50% об./об. человеческой сыворотки АВ для будущих антигенспецифических Т-клеточных анализов.

За день до начала антигенспецифического анализа пролиферации CD8⁺ Т-клеток замороженные PBL и iDC от одного и того же донора размораживали. CD8⁺ Т-клетки выделяли из PBL с помощью технологии MACS с использованием анти-CD8 микрогранул (MilteNY, кат. № 130-045-201), согласно инструкции производителя. Примерно $10\text{-}15 \times 10^6$ CD8⁺ Т-клеток подвергали электропорации с 10 мкг транслируемой *in vitro* (IVT)-РНК, кодирующей альфа-цепь, плюс 10 мкг IVT-РНК, кодирующей бета-цепь клаудин-6-специфического мышинового TCR (HLA-A2-рестриктированный; описано в WO 2015150327 A1) плюс 10 мкг IVT-РНК, кодирующей PD-1, в 250 мкл X-Vivo15 (Biozym Scientific GmbH, кат. №881026) в 4-мм кювете для электропорации (VWR International GmbH, кат. № 732-0023) с использованием устройства для электропорации BTX ECM® 830 (BTX; 500 В, импульс 1×3 мс). Сразу после электропорации клетки переносили в свежую среду IMDM (Life Technologies GmbH, кат. № 12440-061) с добавлением 5% человеческой сыворотки АВ и оставляли при 37°C, 5% CO₂ в течение по меньшей мере 1 часа. Т-клетки метили с использованием 1,6 мкМ карбоксифлуоресцеин-сукцинимидилового эфира (CFSE; Invitrogen, кат. № C34564) в PBS в соответствии с инструкциями производителя и инкубировали в среде IMDM, дополненной 5% человеческой сывороткой АВ, O/N.

До 5×10^6 размороженных iDC подвергали электропорации либо с 1 мкг (доза-реакция GEN1046), либо с 3 мкг (доза-реакция пембролизумаба) IVT-РНК, кодирующей полноразмерный клаудин-6, в 250 мкл среды X-Vivo15, используя систему электропорации, как описано выше (300 В, импульс 1×12 мс) и инкубировали в среде IMDM, дополненной 5% человеческой сывороткой АВ, O/N.

На следующий день клетки собирали. Экспрессию клаудина-6 и PD-L1 на клеточной поверхности на DC и TCR и PD-1 на Т-клетках проверяли с помощью проточной цитометрии. DC окрашивали конъюгированным с Alexa647 CLDN6-специфическим антителом (доступным из некоммерческого источника, собственного производства) и антителом против CD274 человека (PD-L1, eBiosciences, кат. № 12-5983) и Т-клетки окрашивали антителом против β-цепи TCR мыши (Becton Dickinson GmbH, кат. № 553174) и антителом против CD279 человека (PD-1, eBioscience, кат. № 17-2799). Электропорированные DC инкубировали с электропорированными Т-клетками, меченными CFSE, в соотношении 1:10 в присутствии GEN1046 (в 3-кратных серийных разведениях от 1 до 0,00015 мкг/мл) или пембролизумаба клинической степени чистоты (в 4-кратных серийных разведениях от 0,8 до 0,00005 мкг/мл; Keytruma, Phoenix Apotheke, PZN 10749897) в IMDM GlutaMAX с добавлением 5% человеческой сыворотки АВ в 96-луночном круглодонном планшете. Анализ проточной цитометрии пролиферации Т-клеток на основе разведения CFSE проводили через 5 дней на проточном цитометре BD FACSCanto™ II или BD FACSCelesta™ (Becton Dickinson GmbH). Полученные данные

анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo версии 10.7.1. Значения индекса экспансии (определяют кратность экспансии всей культуры) для каждого условия обработки рассчитывали и наносили на график в зависимости от концентрации GEN1046 или пембролизумаба. Были построены кривые «доза-ответ» и рассчитаны значения EC₂₀, EC₅₀, EC₉₀ и Hill-Slope в GraphPad Prism версии 9 (GraphPad Software, Inc.) с использованием 4-параметрической логарифмической аппроксимации.

Ответ на дозу GEN1046 анализировали при 3-кратных серийных разведениях от 1 до 0,00015 мкг/мл (Фигура 6А) со значениями EC₂₀, EC₅₀, EC₉₀ и углового коэффициента Хилла, приведенными в Таблице 8. Сильный эффект индукции пролиферации наблюдали при среднем значении EC₅₀ 0,0064 мкг/мл у четырех протестированных доноров.

Ответ на дозу пембролизумаба анализировали при 4-кратных серийных разведениях от 0,8 до 0,00005 мкг/мл (Фигура 6В) со значениями EC₅₀, EC₉₀ и углового коэффициента Хилла, приведенными в Таблице 9. Сильный эффект индукции пролиферации наблюдали при среднем значении EC₅₀ 0,0149 мкг/мл у четырех протестированных доноров.

Таблица 8. Определение значений EC₂₀, EC₅₀ и EC₉₀ GEN1046 на основе данных об экспансии CD8⁺ Т-клеток, измеренной с помощью антигенспецифического анализа пролиферации Т-клеток. Показанные данные представляют собой значения, рассчитанные на основе четырехпараметрической логарифмической аппроксимации.

Донор	EC ₅₀ величина [мкг/мл]	Угловой коэффициент Хилла	Расчетн. EC ₂₀ [мкг/мл]	Расчетн. EC ₉₀ [мкг/мл]
28	0,00754	1,485	0,00296	0,03311
89	0,00776	1,469	0,00302	0,03464
02	0,00523	1,910	0,00253	0,01651
72	0,00506	1,334	0,00179	0,02626
Среднее	0,0064	1,549	0,0026	0,0276

Таблица 9. Определение значений EC₅₀ и EC₉₀ одобренного антитела против PD-1 пембролизумаба на основе данных об экспансии CD8⁺ Т-клеток, измеренной с помощью антигенспецифического анализа пролиферации Т-клеток. Показанные данные представляют собой значения, рассчитанные на основе четырехпараметрической логарифмической аппроксимации. Среднее соответствует среднему арифметическому.

Донор	EC ₅₀ величина [мкг/мл]	Угловой коэффициент Хилла	Расчетн. EC ₉₀ [мкг/мл]
26268_B	0,0218	1,122	0,1545
26685_A	0,0115	0,974	0,1098
26395_B	0,0113	0,9689	0,1091

Среднее	0,0149	1,021	0,1245
---------	--------	-------	--------

Пример 4: Разблокирование опосредованного PD-1/PD-L1 ингибирования Т-клеток и дополнительная стимуляция пролиферации CD8⁺ Т-клеток с помощью GEN1046 в присутствии или в отсутствие антитела против PD-1 пембролизумаба.

Для измерения индукции пролиферации Т-клеток с помощью GEN1046 в комбинации с антителом против PD-1, пембролизумабом, или антителом IgG1-ctrl, проводили анализ антигенспецифической пролиферации Т-клеток с активной осью PD1/PD-L1 (общая схема анализа аналогична к Примеру 1). Вкратце, клаудин-6-IVT-РНК-электропорированные DC инкубировали с TCR- и PD1-IVT-РНК-электропорированными, мечеными CFSE Т-клетками (соотношение 1:10) в присутствии GEN1046 в комбинации с фиксированной концентрацией пембролизумаба или антитела изотипического контроля IgG1-ctrl в IMDM GlutaMAX с добавлением 5% человеческой сыворотки АВ в 96-луночном круглодонном планшете. Тестировали три различные концентрации GEN1046, представляющие собой оптимальные, полумаксимальные и субоптимальные эффективные концентрации, определенные в предыдущих экспериментах (0,2 мкг/мл > EC90; 0,0067 мкг/мл ≈ EC50; 0,0022 мкг/мл ≈ EC20, см. пример 1, Таблица 1). Пембролизумаб и антитело IgG1-ctrl тестировали в концентрации 0,8 мкг/мл, что значительно превышает значение EC90 для пембролизумаба (см. пример 1, таблицу 2). Для определения исходного уровня пролиферации использовали только среду и 0,8 мкг/мл IgG1-ctrl. Пембролизумаб (0,8 мкг/мл) использовали в качестве дополнительного контроля ингибирования контрольной точки. Анализ проточной цитометрии пролиферации Т-клеток на основе разведения CFSE проводили через 5 дней на проточном цитометре BD FACSCanto™ II или BD FACSCelesta™ (Becton Dickinson GmbH). Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo версии 10.7.1. Значения индекса экспансии для каждого условия обработки рассчитывали и наносили на график с использованием GraphPad Prism версии 9 (GraphPad Software, Inc.).

Инкубация PD-1 и клаудин-6-специфичных TCR-экспрессирующих CD8⁺ Т-клеток, с DC, экспрессирующими PD-L1 и родственной антиген, приводила к минимальной индукции пролиферации со значениями индекса экспансии немного выше 1 только в среде и в культурах, обработанных IgG1-ctrl, для всех трех протестированных доноров (см. Фигуру 7). Разблокирование ингибирования, опосредованного PD-1:PD-L1, путем добавления пембролизумаба к среде совместного культивирования приводило к умеренному увеличению индекса экспансии, обозначенному пунктирной линией на графике. Более выраженное, а также дозозависимое увеличение пролиферации Т-клеток наблюдали после добавления GEN1046, при этом самая высокая протестированная концентрация приводила к самой высокой индукции пролиферации по сравнению с условиями обработки одним соединением в средней и низкой концентрации. Следует отметить, что самая низкая концентрация 0,0022 мкг/мл GEN1046 (без комбинации с пембролизумабом) приводила к значениям индекса экспансии, которые были на одном уровне или даже ниже значений, зарегистрированных для контроля только с

пембролизумабом, что указывает на субоптимальную блокаду контрольной точки PD-1:PD-L1. В отличие от этого, независимо от тестируемой концентрации GEN1046, индукция пролиферации Т-клеток для комбинации GEN1046 с пембролизумабом всегда превышала индукцию DuoBody-PD-L1×4-1BB без пембролизумаба. Разница в индексах экспансии между условиями с пембролизумабом и без пембролизумаба была особенно сильной для средних и низких концентраций GEN1046. В частности, в случае субоптимального состояния GEN1046 (0,0022 мкг/мл \approx EC20) добавление пембролизумаба индуцировало пролиферацию CD8⁺ Т-клеток со значительно более высокими индексами экспансии по сравнению с теми, которые наблюдались для контроля только с пембролизумабом.

Пример 6: Первое открытое исследование с участием людей с повышением дозы с расширенными когортами для оценки безопасности GEN1046 у пациентов со злокачественными солидными опухолями

Исследование представляет собой открытое многоцентровое исследование безопасности фазы 1/2а GEN1046 (DuoBody® PD L1×4 1BB). Исследование состоит из 2 частей; первое повышение дозы у человека (FIH) (фаза 1) и расширение (фаза 2а). При повышении дозы оценивали GEN1046 у пациентов с солидными злокачественными опухолями, чтобы определить максимально переносимую дозу (MTD) или максимальную вводимую дозу и/или рекомендуемую дозу фазы 2 (RP2D).

Расширение дополнительно оценивает безопасность, переносимость, ФК и противоопухолевую активность выбранных доз в избранных когортах расширения солидных опухолей при немелкоклеточном раке легкого (NSCLC) (предварительно обработанные PD-1/L1 и ранее не обработанные PD-1/L1), уротелиальном раке (UC), раке эндометрия (EC), трижды негативном раке молочной железы (TNBC) (у пациентов, которые ранее получали лечение ингибитором PD-1/L1, и у пациентов, которые не получали такого лечения): и при плоскоклеточном раке головы и шеи (SCCHN).

Расширение

Таблица 10: Когорты расширения

Когорта No.	N	Тип злокачественного новообразования	суб-когорта	Предшествующее лечение	Исследуемое лечение
EC1	140	NSCLC		Предшествующее лечение CPI	GEN1046 100 мг 1Q3W
EC2	40	NSCLC		Не получали PD-1/L1	GEN1046 100 мг 1Q3W
EC3	40	UC		Предшествующее лечение CPI	GEN1046 100 мг 1Q3W
EC4	40	Рак эндометрия		Не получали PD-1/L1	GEN1046 100 мг 1Q3W
EC5	40	TNBC	5a	Предшествующее лечение CPI	GEN1046 100 мг 1Q3W
			5b	Не получали PD-1/L1	GEN1046 100 мг 1Q3W

Когорта №.	N	Тип злокачественного новообразования	суб- когорта	Предшествующ ее лечение	Исследуемое лечение
EC6	40	SCCHN	6a	Предшествующе е лечение CPI	GEN1046 100 мг 1Q3W
			6b	Не получали PD- 1/L1	GEN1046 100 мг 1Q3W

Схема дизайна исследования представлена на Фигуре 8. Дальнейшее описание повышения дозы и когорт расширения, а также предварительные результаты повышения дозы представлены в международной патентной заявке WO 2021/156326.

Когорты расширения (EC) A и B: NSCLC, не подвергавшийся лечению метастатического заболевания: GEN1046 в комбинации с пембролизумабом)

Расширенные когорты ECA и ECB оценивают дозу 100 мг GEN1046 в комбинации с пембролизумабом при двух различных схемах дозирования:

ECA тестирует схему GEN1046 в дозе 100 мг 1Q3W со схемой пембролизумаба в дозе 200 мг 1Q3W. На основании ФК/фармакодинамического моделирования ожидается, что эта схема GEN1046 приведет к пиковому образованию тримеров и устойчивой активации 4-1BB, что в комбинации с пембролизумабом может обеспечить оптимальное вовлечение обеих мишеней/путей и повысить противоопухолевую эффективность.

ECB оценивает схему лечения GEN1046 в дозе 100 мг 1Q6W со схемой пембролизумаба в дозе 400 мг 1Q6W. На основании фармакодинамического моделирования ожидается, что эта схема GEN1046 обеспечит прерывистую/транзиторную активацию 4-1BB в 6-недельном курсе дозирования по сравнению с устойчивой активацией 4-1BB в 3-недельном курсе дозирования. Ожидается, что транзиторная активация 4-1BB позволит восстановить ответ Т-клеток и снизить хроническую передачу сигналов интерферона (Weber, E.W., et al. (2021), Science 372 (6537)), что может предотвратить истощение инфильтрирующих опухоль CD8⁺ Т-клеток за счет постоянной активации 4-1BB и в комбинации с пембролизумабом может обеспечить улучшенную глубину и продолжительность ответа (DoR).

Схемы пембролизумаба в дозе 200 мг Q3W и 400 мг Q6W были одобрены в качестве лечения NSCLC первой и второй линии, соответственно.

Прекращение лечения

Лечение продолжается до тех пор, пока пациент не выполнит один из критериев прекращения лечения (см. ниже).

Критерии включения

Когорты расширения A и B

а. Пациенты с метастатическим NSCLC, которые ранее не получали схемы системного лечения метастатического заболевания. Пациенты не должны ранее получать лечение ингибитором PD-1/L1. Пациенты должны иметь рентгенологическое прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего лечения. Это не требуется для пациентов, у которых впервые диагностировано заболевание.

b. В исследование включаются пациенты с NSCLC любой гистологии. Пациенты с гистологическим или цитологическим диагнозом неплоскоклеточного NSCLC не должны иметь сенсibiliзирующую EGFR мутацию и/или транслокацию ALK/реарранжировку ROS1. Мутации, сенсibiliзирующие EGFR, - это мутации, которые поддаются лечению одобренными TKI.

c. Пациенты должны иметь результат экспрессии PD-L1 в центральной лаборатории, доступный до 1-го дня курса (C1D1) из образца свежей опухоли, полученного с помощью пункционной или эксцизионной биопсии или из резецированной опухолевой ткани на момент диагностики метастатического заболевания.

d. Опухоль демонстрирует экспрессию PD-L1 в $\geq 1\%$ опухолевых клеток (TPS $\geq 1\%$) по данным иммуногистохимии (ИГХ), определяемой центральными лабораторными исследованиями.

Как для повышения дозы, так и для расширения

3. Пациент должен быть мужчиной или женщиной в возрасте ≥ 18 лет.

4. Пациент должен подписать форму информированного согласия (ICF), указав, что он или она понимает цель и процедуры, необходимые для исследования, и готов участвовать в исследовании до проведения каких-либо оценок или процедур, связанных с исследованием.

5. Пациент должен иметь поддающееся оценке заболевание в соответствии с RECIST 1.1.

6. Пациент должен иметь статус Восточной кооперативной онкологической группы (ECOG) 0-1.

7. Пациент должен иметь следующие функции органов и костного мозга:

a. Костный мозг/гематологическая функция:

абсолютное число нейтрофилов (ANC) $\geq 1,5 \times 10^9/\text{л}$; гемоглобин $\geq 9,0$ г/дл; количество тромбоцитов $\geq 100 \times 10^9/\text{л}$

b. Функция печени:

- Общий билирубин \leq верхней границы нормы (ВГН)

- ALT $\leq 1,5$ x ВГН

- AST $\leq 1,5$ x ВГН

- Альбумин ≥ 30 г/л

c. Коагуляционный статус:

- Протромбиновое время (ПВ)/международное нормализованное отношение (МНО) $\leq 1,5$

- Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) $\leq 1,5$ x ВГН (без антикоагулянтной терапии)

- У пациентов, получающих антикоагулянтную терапию, ПВ и АЧТВ должны находиться в пределах терапевтического диапазона предполагаемого применения антикоагулянтов.

d. Почечная функция:

Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) ≥ 45 мл/мин/1,73 м² - напр. согласно сокращенному уравнению «Модификация диеты при заболеваниях почек»:

$$\text{СКФ} = 186 \times (\text{SCr} - 1,154) \times (\text{возраст} - 0,203)$$

(где SCr, уровень креатинина в сыворотке, выражается в мг/дл; умножьте его на 0,742, если пациент - женщина; умножьте его на 1,212, если пациент - афроамериканец (Levey et al., 1999).

12. А) В части повышения дозы все пациенты должны предоставить образец опухолевой ткани (фиксированные в формалине парафиновые блоки/препараты) из архивной ткани или свежую биопсию, собранную до 1-го дня курса, предпочтительно полученную на поздней стадии заболевания.

В) В расширенной части все пациенты должны предоставить обязательную свежую биопсию (фиксированные формалином парафиновые блоки/препараты [FFPE]) (биопсия под контролем бронхоскопии, тонкоигольная аспирация, клеточные блоки, клеточные осадки, сгустки, костный мозг и цитологические образцы не принимаются), которые содержат опухолевую ткань и взяты после неудачи/прекращения последнего предшествующего лечения.

Критерий исключения

Любой потенциальный пациент, отвечающий любому из следующих критериев, будет исключен из участия в исследовании.

1. У пациента неконтролируемое интеркуррентное заболевание, включая, помимо прочего следующее:

a. Текущая или активная инфекция, требующая внутривенного лечения противомикробной терапией, введенной менее чем за 2 недели до первой дозы.

b. Симптоматическая застойная сердечная недостаточность (III или IV степени по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации), нестабильная стенокардия или сердечная аритмия.

c. Неконтролируемая артериальная гипертензия определяется как систолическое артериальное давление ≥ 160 мм рт.ст. и/или диастолическое артериальное давление ≥ 100 мм рт.ст., несмотря на оптимальное медикаментозное лечение.

d. Текущие или недавние (в течение 1 года) признаки значительного аутоиммунного заболевания, требующего лечения системными иммуносупрессивными препаратами, что может указывать на риск иммуноопосредованных нежелательных явлений (иНЯ).

Пациенты, у которых в анамнезе иНЯ 3-й степени или выше, которые привели к прекращению лечения предшествующей иммунотерапией, должны быть исключены. Пациентов с иНЯ ниже 3 степени, которые привели к прекращению лечения, следует обсудить со спонсором.

f. Исключаются пациенты, ранее перенесшие миозит, синдром Гийена-Барре или миастению гравис любой степени тяжести.

g. Хроническое заболевание печени в анамнезе или признаки цирроза печени.

h. Неинфекционный пневмонит в анамнезе, потребовавший приема стероидов, или наличие пневмонита в настоящее время.

i. В анамнезе аллотрансплантация органов (за исключением трансплантации роговицы), аутологичная или аллогенная трансплантация костного мозга или спасения стволовых клеток в течение 3 месяцев до первой дозы GEN1046.

j. Серьезная незаживающая рана, язва кожи (любой степени тяжести) или перелом кости.

2. Всем пациентам следует пройти компьютерную томографию (КТ) или магнитно-резонансную томографию (МРТ) головного мозга для выявления новых или существующих поражений ЦНС. Будут исключены те, у кого в анамнезе любое из внутримозговой артериовенозной мальформации, церебральной аневризмы, компрессии спинного мозга (в результате заболевания), карциноматозного менингита или инсульта.

a. Допускается транзиторная ишемическая атака >1 месяца до скрининга.

b. Пациенты с недавно выявленными или известными нестабильными или симптоматическими метастазами в ЦНС будут исключены. Пациенты с ранее лечеными метастазами в головной мозг могут участвовать при условии, что они радиологически стабильны (т. е. без признаков прогрессирования) в течение по меньшей мере 28 дней при повторной визуализации (обратите внимание, что повторная визуализация должна проводиться во время скрининга исследования). Пациенты должны быть клинически стабильными и не должны проходить интенсивную терапию кортикостероидами или снижать дозу стероидов, а также не должны получать стереотаксическое облучение или облучение всего мозга в течение 14 дней до C1D1. Хроническая стероидная терапия приемлема при условии, что доза стабильна в течение последних 14 дней до C1D1 (<10 мг преднизона в день или его эквивалент).

3. Предыдущая терапия:

a. Лучевая терапия: лучевая терапия в течение 14 дней до первого введения GEN1046. Будет разрешена паллиативная лучевая терапия.

b. Если ниже не указано иное, лечение противоопухолевым агентом (в течение 28 дней или после по меньшей мере 5 периодов полувыведения препарата, в зависимости от того, что короче) до введения GEN1046. Допустимыми исключениями являются бисфосфонаты (например, памидронат, золедроновая кислота и т. д.) и деносумаб.

c. Пациент получил какой-либо исследуемый агент (включая исследуемые вакцины) или использовал инвазивное исследуемое медицинское устройство в течение 28 дней до запланированной первой дозы GEN1046 или в настоящее время участвует в интервенционном исследовании.

Примечание. Пациенты, находящиеся на последующей стадии интервенционного исследования, могут участвовать, если пациент не получил исследуемый агент в течение 28 дней после первой дозы GEN1046.

d. Предварительное лечение живыми аттенуированными вакцинами в течение 3 недель до начала лечения GEN1046.

e. Хронические системные иммуносупрессивные дозы кортикостероидов, т. е. преднизолон > 10 мг в день или кумулятивная доза > 150 мг преднизолона в течение 14 дней до первого введения GEN1046. Заместительная терапия (например, заместительная терапия тироксином, инсулином или физиологическими кортикостероидами при недостаточности надпочечников или гипофиза) не считается формой системного лечения и разрешена.

f. Получали поддержку в виде гранулоцит-колониестимулирующего фактора (G-CSF) или гранулоцит/макрофаг-колониестимулирующего фактора (GM-CSF) за 4 недели до первого введения GEN1046 или имеют хроническую зависимость от переливания крови.

g. В анамнезе аллергические реакции ≥ 3 степени на терапию моноклональными антителами (mAb), а также известная или подозреваемая аллергия или непереносимость любого агента, назначаемого в ходе этого исследования.

h. Пациенты, прекратившие лечение из-за прогрессирования заболевания в течение первых 6 недель лечения, содержащего CPI.

i. Предшествующее лечение агентом, нацеленным на 4-1BB (CD137).

j. Предшествующее лечение агонистом T-клеток или антицитотоксическим агентом, нацеленным на белок 4, ассоциированный с T-лимфоцитами, в течение 12 недель до начала лечения.

4. Токсичность от предыдущей противоопухолевой терапии, которая не снизилась до исходного уровня или до степени 1 или ниже, за исключением алопеции, анорексии, витилиго, утомляемости, гипертиреоза, гипотиреоза и периферической нейропатии. Анорексия, гипертиреоз, гипотиреоз и периферическая нейропатия должны восстановиться до степени ≤ 2 .

5. Известные прошлые или текущие злокачественные новообразования, кроме диагноза включения, за исключением следующего:

a. Рак шейки матки стадии 1B или ниже.

b. Неинвазивный базальноклеточный или плоскоклеточный рак кожи.

c. Неинвазивный поверхностный рак мочевого пузыря.

d. Рак предстательной железы с неопределяемым в настоящее время PSA.

e. Рак молочной железы у пациентов с BRCA1 или BRCA2-положительным раком яичников (неприменимо для когорты расширения рака молочной железы).

f. Любое излечимое злокачественное новообразование с продолжительностью CR > 2 лет.

6. У пациента выявлена аллергия, гиперчувствительность или непереносимость GEN1046 или его вспомогательных веществ.

7. У пациента имеется какое-либо состояние, участие в котором, по мнению исследователя, не отвечает интересам пациента (например, ставит под угрозу его благополучие) или которое может помешать, ограничить или исказить результаты оценок, предусмотренных протоколом.

8. Пациент перенес серьезную операцию (например, требующую общей анестезии) в течение 4 недель до скрининга, или не полностью восстановился после операции, или операция запланирована на то время, когда пациент, как ожидается, будет участвовать в исследовании.

Примечание. В исследовании могут участвовать пациенты, которым запланированы хирургические процедуры, которые будут проводиться под местной анестезией.

9. Из анамнеза известно о серопозитивности к вирусу иммунодефицита человека (HIV).

10. Из анамнеза известно/положительный серологический результат на гепатит В (кроме случаев, когда имеется иммунитет вследствие вакцинации или разрешившаяся естественная инфекция, или если нет пассивной иммунизации вследствие терапии иммуноглобулинами):

a. Положительный тест на антитела к коровым антигенам гепатита В.

и

b. Отрицательный тест на антитела к поверхностным антигенам гепатита В.

11. Из анамнеза известно или продолжающаяся инфекция гепатита С, которая не была вылечена.

12. Злоупотребление психоактивными веществами, медицинские, психологические или социальные условия, которые могут помешать участию пациента в исследовании или оценке его результатов.

13. Пациенту уже вводили дозу в этом исследовании.

14. Пациент - женщина, беременная или кормящая грудью.

15. Пациент имеет противопоказания к использованию пембролизумаба согласно местной инструкции по назначению.

Введение GEN1046

GEN1046 вводят внутривенно (IV) в течение как минимум 60 минут в первый день каждого курса лечения, состоящего из 21 дня или 42 дней после завершения всех процедур и оценок.

В ECA и -B пациенты получают GEN1046 100 мг 1Q3W в комбинации с пембролизумабом 200 мг 1Q3W (ECA) или GEN1046 100 мг 1Q6W в комбинации с пембролизумабом 400 мг 1Q6W (ECB).

Введение пембролизумаба

ECA и ECB: пембролизумаб в дозе 200 мг или 400 мг вводят в первый день каждого 3-недельного или 6-недельного курса лечения, соответственно, после завершения всех предварительных процедур и обследований.

Сначала вводят пембролизумаб, а затем GEN1046. Пембролизумаб вводят внутривенно в течение 30 минут. Перед началом инфузии GEN1046 необходимо сразу же промыть систему физиологическим раствором, чтобы очистить ее от пембролизумаба. Время между инфузиями составляет примерно 30 минут или больше в зависимости от

ситуации. Снижение дозы пембролизумаба не рекомендуется.

Информация об исследуемом лекарственном средстве

GEN1046-20 мг/мл, приготовленный на основе 20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 0,02% полисорбата-80, рН 5,5 - представляет собой раствор от прозрачного до опалесцирующего, от бесцветного до слегка желтого цвета, поставляемый в виде концентрата для приготовления раствора для инфузий, который необходимо развести (на месте) в 0,9% растворе NaCl (физраствор).

Инфузионный пембролизумаб (Кейтруда®) представляет собой стерильный, не содержащий консервантов, прозрачный или слегка опалесцирующий раствор, от бесцветного до слегка желтого цвета, который требует разведения для внутривенной инфузии.

Инфузионные реакции (ИР) на GEN1046

Для пациентов, у которых наблюдается ИР, связанная с введением GEN1046:

Степень 1: При возникновении ИР 1 степени инфузию не нужно прерывать и можно продолжать по усмотрению исследователя на половине скорости инфузии под тщательным медицинским наблюдением.

Степень 2-3: при возникновении ИР 2 или 3 степени инфузию следует прервать и назначить соответствующее медицинское лечение. Инфузию можно возобновить по усмотрению исследователя на половине скорости инфузии под тщательным медицинским наблюдением, если симптомы разрешились до степени ≤ 1 в течение часа.

Пациентам, у которых ранее в исследовании наблюдались реакции 2 или 3 степени, связанные с инфузией, следует пройти премедикацию. Премедикация для предотвращения ИР при последующих инфузиях может проводиться по усмотрению исследователя в соответствии с местными рекомендациями, но предпочтительно включает антигистаминный препарат (например, димедрол 50 мг или эквивалентный антигистаминный препарат), ацетаминофен/парацетамол (например, ацетаминофен 500-1000 мг или эквивалентный) и если это считается необходимым, пациенты должны получать кортикостероиды в рекомендуемой максимальной дозе 100 мг преднизолона или его эквивалента.

Если у пациента наблюдается вторая ИР степени 3, несмотря на премедикацию, инфузию следует прекратить, а пациента следует отстранить от лечения.

Степень 4: При возникновении анафилаксии или ИР степени 4 введение GEN1046 следует немедленно и окончательно прекратить и назначить соответствующую медицинскую терапию.

Инфузионные реакции на пембролизумаб

Пембролизумаб может вызывать тяжелые или опасные для жизни ИР, включая тяжелую гиперчувствительность или анафилаксию. Признаки и симптомы обычно развиваются во время или вскоре после инфузии препарата и обычно полностью исчезают в течение 24 часов после завершения инфузии.

Таблица 11. Побочные эффекты, связанные с пембролизумабом

Наиболее распространенные побочные эффекты ($\geq 20\%$ пациентов)	Менее распространенные побочные эффекты (могут быть тяжелыми или угрожающими жизни)
Усталость Кашель Тошнота Зуд Сыпь Снижение аппетита Запор Артралгия Диарея	Иммуноассоциированные НЯ Инфузионные реакции См. местную инструкцию по применению Пембролизумаба

Прекращение лечения

Пациенты получают лечение GEN1046 в первый день каждого 3-недельного или 6-недельного курса лечения до тех пор, пока не будет выполнен один из заранее определенных критериев прекращения лечения (ниже).

Пациенты в когортах ECA и ECB получают лечение пембролизумабом в комбинации с GEN1046 в первый день каждого 3-недельного курса лечения или в первый день каждого 6-недельного курса лечения, соответственно, до прогрессирования заболевания или до 1-го из заранее определенных критериев прекращения лечения. Прием обоих, GEN1046 и пембролизумаба, следует прекратить. Пациенты могут продолжать монотерапию GEN1046 или пембролизумабом только при наличии одобрения медицинского наблюдателя от спонсора. Пациенты переходят в период наблюдения за безопасностью после прекращения приема обоих препаратов.

Рентгенологическое прогрессирование заболевания или подтвержденное рентгенологическое прогрессирование заболевания по данным iRECIST

Клиническое прогрессирование

Выбывание из последующего наблюдения

Пациент просит прекратить лечение

Смерть

Неприемлемые НЯ, требующие прекращения лечения исследования.

Исследователь считает, что в интересах пациента прекратить лечение исследования.

Отзыв согласия

Беременность

Оценка эффективности

Во время скрининга всем пациентам проводят визуализацию головного мозга, грудной клетки, брюшной полости и таза. Для пациентов с SCCHN всегда требуется визуализация головы и шеи.

Визуализацию опухоли предпочтительно получают с помощью компьютерной

томографии (КТ). При скрининге определяют до 5 целевых поражений (максимум 2 на орган), и их отслеживают на протяжении всего исследования. Нецелевые поражения также оцениваются на протяжении всего исследования. Первоначальная визуализация опухоли при скрининге проводится в течение 21 дня до даты введения первой дозы. На сайте просматриваются скрининговые изображения, чтобы подтвердить наличие у пациента поддающегося оценке заболевания согласно RECIST 1.1.

Визуализация в ходе исследования проводится каждые 6 недель (± 7 дней) в течение 50 недель и каждые 12 недель (± 7 дней) в дальнейшем с даты введения первой дозы до тех пор, пока исследователь не оценит прогрессирование заболевания (если только исследователь не решит продолжить лечение и следовать iRECIST), начало новой противоопухолевой терапии, отзыв согласия или смерть, в зависимости от того, что произойдет раньше.

Критерии RECIST 1.1 используются для оценки вторичного конечного ответа (Eisenhauer et al., 2009, Eur J Cancer 45, 228-247). iRECIST используются для исследовательской оценки конечного ответа (Seymour et al., 2017, Lancet Oncol 18, e143-e152). Если исследователь решит применить iRECIST, лечение следует продолжать до тех пор, пока не будет подтверждено PD.

По усмотрению исследователя могут быть выполнены дополнительные КТ или МРТ для подтверждения ответа или появления новых симптомов. Визуализацию опухоли для подтверждения PR или CR следует проводить по меньшей мере через 4 недели после появления первых признаков ответа.

Оценка заболевания iRECIST

iRECIST основана на RECIST 1.1, но была модифицирована для учета уникальных паттернов ответа, наблюдаемых при иммунотерапии. В этом исследовании iRECIST оценивается как исследовательская конечная точка (Seymour et al., 2017, Lancet Oncol 18, e143-e152).

Прогрессирование заболевания согласно iRECIST должно быть подтверждено по меньшей мере через 4-7 недель после первых рентгенологических признаков PD у клинически стабильных участников. Пациенты, у которых наблюдается неподтвержденное прогрессирование заболевания, могут продолжать лечение GEN1046 до тех пор, пока не будет подтверждено прогрессирование, при условии, что пациент клинически стабилен. Клинически стабильные пациенты должны соответствовать следующим критериям:

Пациент должен иметь клиническую пользу от продолжения лечения GEN1046 (по оценке исследователя) и не должен иметь быстрого прогрессирования заболевания.

Пациент переносит лечение GEN1046.

Пациент должен иметь стабильный статус ECOG.

Лечение после прогрессирования не задерживает неизбежное вмешательство, чтобы предотвратить серьезные осложнения, способствующие прогрессированию заболевания (например, метастазы в центральную нервную систему, требующие

немедленного лечения).

Любые клинически нестабильные пациенты прекращают лечение GEN1046 при первом появлении рентгенологического прогрессирования заболевания. Если повторная визуализация покажет прогрессирование заболевания, подтвержденное iRECIST (iCPD), пациенты прекратят лечение GEN1046.

Показатель общего состояния по шкале ECOG

Показатель общего состояния по шкале ECOG будет оцениваться исследователем во время скрининга, в первый день каждого курса и во время визита для прекращения лечения. Показатель общего состояния будет оцениваться с использованием показателя общего состояния по шкале ECOG (Таблица 12).

Таблица 12:

Балльная оценка	Определение
0	Полностью активен, способен выполнять любую обычную деятельность без ограничений.
1	Ограничен в физической активности, но ходит и способен выполнять легкую или сидячую работу, например, легкую работу по дому, работу в офисе.
2	Амбулаторный и способный к самообслуживанию, но неспособный выполнять какую-либо трудовую деятельность. Пробуждение и примерно более 50% времени бодрствования.
3	Способен лишь на ограниченный уход за собой, прикован к кровати или креслу более 50% времени бодрствования.
4	Полностью недееспособен. Не может осуществлять какой-либо уход за собой. Полностью прикован к кровати или креслу.
5	Умер.

ECOG=Восточная кооперативная онкологическая группа.

Предварительные результаты и выводы

Дозы от 25 до 1200 мг Q3W, которые оценивались в фазе повышения дозы исследования FII, были безопасными и в целом хорошо переносились. MTD не была достигнута.

Предварительная оценка данных по безопасности не выявила зависимости от дозы, что указывает на отсутствие зависимости от дозы в зависимости от частоты НЯ.

Ответы в соответствии с RECIST v1.1 наблюдались при дозах GEN1046 от 80 до 200 мг Q3W в фазе повышения дозы исследования FII. Кроме того, ответы также наблюдались при расширении дозы 100 мг Q3W.

Последовательная модуляция фармакодинамических маркеров (пролиферирующих [Ki67+] эффекторных CD8+T-клеток памяти и общего количества CD8+T-клеток, а также повышенных уровней IFN γ и IP-10) наблюдалась в периферической крови при дозах \leq 200

мг. Снижение модуляции этих конечных точек наблюдалось при более высоких уровнях дозы (≥ 400 мг).

Полумеханистическая ФК/фармакодинамическая модель (см. пример 13 в WO 2021/156326) предсказала колоколообразный ответ на образование тримера, пик которого достигался при дозе около 100 мг Q3W. Чтобы сбалансировать уровни тримеров и взаимодействие с мишенью PD-L1 RO, была выбрана доза 100 мг Q3W, которая может обеспечить оптимальный первоначальный ответ на GEN1046.

При монотерапии GEN1046 выживаемость без прогрессирования (ВБП) была выше у пациентов, ранее получавших лечение ингибитором контрольной точки (Фигура 9).

Клинический ответ на монотерапию GEN1046 у пациентов NSCLC, предварительно получавших ингибитор контрольной точки, связан со временем, прошедшим с момента последней предшествующей терапии анти-PD-1 (Фигура 12).

Пациенты с NSCLC, получившие положительный эффект от монотерапии GEN1046, продемонстрировали тенденцию к более позднему лечению последним агентом против PD-1.

Более короткое время с момента терапии, содержащей агент против PD-1, может указывать на то, что остаточная активность анти-PD-1 облегчает ответ на GEN1046. В пользу этого свидетельствует тот факт, что у пациентов, получавших в клинике агенты против PD-1, наблюдается длительная занятость рецептора PD-1 терапевтическим антителом, что может продолжаться более 200 дней (Brahmer et al., JCO 2010; 28(19): 3167-3175). Наличие терапевтического агента а-PD-1, все еще связанного с рецепторами PD-1, может, в свою очередь, привести к тому, что большее количество свободных молекул PD-L1 будет доступно для связывания с GEN1046.

Наличие остаточной активности а-PD-1 также может обеспечить более полную блокаду пути PD-1 (блокирование взаимодействия PD-1 как с PD-L1, так и с PD-L2), что может быть важно для биологической активности GEN1046 в настройке после CPI.

Более позднее лечение анти-PD-1 может оказывать прямое воздействие на микроокружение опухоли, например, инициируя противоопухолевый иммунный ответ, который может быть усилен GEN1046, если его назначать сразу или вскоре после прогрессирования на терапии, содержащей анти-PD-1.

- У респондеров наблюдалась «низкая» частота встречаемости PD-1+CD8 Т-клеток, что может отражать занятость рецептора (RO) в результате предшествующего лечения а-PD-1.

- И наоборот, у пациентов, не ответивших на лечение, обычно наблюдалась высокая частота встречаемости PD-1+CD8 Т-клеток, что может указывать на более истощенный фенотип.

Пример 8: Фаза 2, многоцентровое, рандомизированное, открытое исследование GEN1046 в качестве монотерапии и в комбинации с пембролизумабом у пациентов с рецидивирующим/рефрактерным метастатическим немелкоклеточным раком легких после лечения стандартной терапией с ингибитором иммунных контрольных точек

Дизайн исследования

Исследование представляет собой многоцентровое рандомизированное открытое исследование фазы 2, оценивающее безопасность и эффективность GEN1046 в качестве монотерапии и в комбинированной терапии с пембролизумабом у взрослых пациентов с местно-распространенным или метастатическим NSCLC после лечения терапией, содержащей CPI.

Приблизительно 126 пациентов будут включены в исследование, и 120 подходящих пациентов (по 40 в каждой группе) будут рандомизированы в одну из групп лечения, описанных ниже. Пациенты должны предоставить свежую и/или архивную опухолевую ткань для проспективного центрального подтверждения экспрессии PD-L1 в опухолях. Процент пациентов с неплоскоклеточной гистологией будет ограничен примерно 70%. Рандомизация будет стратифицирована по экспрессии PD-L1 (TPS \geq 50% против 1%-49%) и гистологии (плоскоклеточный или неплоскоклеточный).

A. GEN1046 100 мг Q3W в течение первых 2 курсов, затем GEN1046 500 мг Q6W для последующих курсов

B. GEN1046 100 мг Q3W в комбинации с пембролизумабом 200 мг Q3W

C. GEN1046 100 мг Q6W в комбинации с пембролизумабом 400 мг Q6W

Во время предварительной проверки безопасности в группы B и C будут включены 6 пациентов (по 3 пациента в каждой группе). Эти пациенты будут находиться под пристальным наблюдением в течение как минимум 3 недель. После завершения проверки безопасности для этих групп будут оценены собранные данные (включая, помимо прочего, все соответствующие данные по безопасности и клинические данные). После этого обзора, если комбинированная схема считается хорошо переносимой, начнется рандомизация для групп A, B и C.

Лечение пациента следует продолжать до тех пор, пока он не выполнит один из критериев прекращения лечения, определенных ниже.

Компьютерную томографию (КТ) с контрастом или магнитно-резонансную томографию (МРТ) проводят исходно перед приемом первой дозы и через 6, 12, 18 и 24 недели (\pm 7 дней) после первой дозы исследуемого лекарственного средства, а затем каждые 9 недель (\pm 7 дней). КТ или МРТ будут продолжаться выполняться до прогрессирования заболевания (по оценке исследователя), начала последующей противоопухолевой терапии, отзыва согласия или смерти, в зависимости от того, что наступит раньше. Прогрессирование заболевания, определенное критериями оценки ответа при солидных опухолях (RECIST) v1.1, должно быть подтверждено дополнительным подтверждающим сканированием после первоначально зарегистрированного прогрессирующего заболевания (PD). Любой клинически нестабильный пациент прекращает участие в лечении исследования при первом появлении рентгенологического прогрессирования заболевания, и ему не требуется повторная визуализация для подтверждения PD. При подозрении на задержку ответа на лечение исследователь может продолжить лечение после периода прогрессирования,

определенного RECIST v1.1, если у пациента наблюдается клиническое улучшение. Как только у пациента возникает PD, статус выживаемости собирается каждые 12 недель до смерти, отзыва согласия, прекращения наблюдения или окончания исследования, в зависимости от того, что наступит раньше. Также собираются данные о последующих противоопухолевых методах лечения и реакции пациента на них. Во время лечения за рамками прогрессирования, определенного RECIST v1.1, iRECIST используют для оценки последующего прогрессирования.

Обоснование дизайна исследования

Исследование представляет собой рандомизированное открытое исследование, оценивающее безопасность и эффективность GEN1046 в качестве монотерапии или в комбинации с пембролизумабом у взрослых пациентов с рецидивирующим/рефрактерным метастатическим NSCLC после лечения терапией, содержащей CPI. Рандомизация используется для устранения потенциальной систематической ошибки распределения, в то время как открытый дизайн позволит эффективно управлять НЯ/СНЯ. Уровень экспрессии PD L1 связан с эффективностью пембролизумаба, а гистология является важной исходной характеристикой заболевания. Рандомизация будет стратифицирована, чтобы обеспечить баланс между этими двумя факторами.

Основная цель - оценить частоту объективного ответа (ЧОО) на противоопухолевую активность GEN1046 при монотерапии и в комбинации с пембролизумабом. ЧОО - это хорошо зарекомендовавший себя параметр эффективности для оценки противоопухолевой активности в экспериментальном исследовании при NSCLC.

Обоснование дозы и схемы приема

Выбор дозы 100 мг Q3W для GEN1046 был основан на клинических данных исследования FIN, GCT1046-01, где дозы в диапазоне от 25 до 1200 мг Q3W оценивались у 61 пациента в фазе повышения дозы. Кроме того, была разработана ФК/фармакодинамическая модель для прогнозирования образования тримолекулярного комплекса (тримера) 4-1BB, GEN1046, PD-L1 и RO для PD-L1 в опухолях, чтобы понять взаимосвязь ФК/фармадинамики/эффективности (см. Пример 9).

Таким образом, дозы GEN1046, составляющие 100 мг Q3W, были выбраны на основе исследования повышения дозы в примере 7.

Группа А будет тестировать схему активации дозы GEN1046 (100 мг Q3W в течение 2 курсов) с последующей более высокой поддерживающей дозой GEN1046 (500 мг, вводимой Q6W в течение последующих курсов), исходя из следующего:

Полумеханистическая ФК/фармакодинамическая модель показывает, что образование тримеров в опухоли достигает пика при схеме GEN1046 в дозе 100 мг Q3W, который, как ожидается, обеспечит непрерывную активацию 4-1BB и выбран в качестве активирующей дозы для первых 2 курсов. В исследовании GCT1046-01 клинические данные расширенной когорты показали, что доза 100 мг Q3W приводила к ответам в течение первых 2 курсов.

Поддерживающая схема GEN1046 по 500 мг Q6W будет использоваться после первых 2 курсов и, по прогнозам, обеспечит более высокий RO PD-L1 в течение цикла дозирования и периодическую активацию 4-1BB за счет вовлечения тримеров в меньшей степени по сравнению со 100 мг Q3W. Ожидается, что эта доза обеспечит улучшение продолжительности ответа (DOR).

В группах В и С будет оцениваться GEN1046 в комбинации с пембролизумабом при двух разных схемах дозирования:

Группа В будет тестировать схему GEN1046 по 100 мг Q3W с схемой пембролизумаба по 200 мг Q3W. Ожидается, что при этой схеме GEN1046 приведет к пиковому образованию тримеров и устойчивой активации 4-1BB, что в комбинации с пембролизумабом может обеспечить оптимальное взаимодействие обеих мишеней/путей и повысить противоопухолевую эффективность.

Группа С будет оценивать схему GEN1046 по 100 мг Q6W со схемой пембролизумаба по 400 мг Q6W. На основании ФК/фармакодинамической модели ожидается, что GEN1046 обеспечит прерывистую/транзиторную активацию 4-1BB в 6-недельном курсе дозирования по сравнению с устойчивой активацией 4-1BB в 3-недельном курсе дозирования. Ожидается, что транзиторная активация 4-1BB позволит восстановить ответ Т-клеток и снизить хроническую передачу сигналов интерферона (Weber, E.W., et al. (2021), *Science* 372 (6537)), что может предотвратить истощение инфильтрирующих опухоль CD8+Т-клеток за счет постоянной активации 4-1BB и в комбинации с пембролизумабом может обеспечить улучшенную глубину и DOR.

Схемы пембролизумаба в дозе 200 мг Q3W и 400 мг Q6W были одобрены в качестве лечения NSCLC первой и второй линии, соответственно. Ожидается, что пембролизумаб в дозе 200 мг Q3W и 400 мг Q6W обеспечит сопоставимые профили эффективности и безопасности (Lala et al., 2020, *Eur J Cancer* 131, 68-75).

Критерии включения

1. Пациенту должно быть по меньшей мере 18 лет.
2. Пациент должен иметь гистологически или цитологически подтвержденный диагноз NSCLC 4 стадии и, по меньшей мере, одну предыдущую линию системной терапии, содержащую мАт против PD-1/PD-L1, для лечения метастатического заболевания. Примечание. Пациент должен получить по меньшей мере 2 дозы одобренного моноклонального антитела против PD1/PD-L1, одобренного для лечения NSCLC.
 - a. У пациента наблюдалось прогрессирование во время или после лечения 1 моноклональным антителом против PD-1/PD-L1, которое вводили либо в виде монотерапии, либо в виде комбинации SOC.
 - b. У пациента прогрессирование заболевания наблюдалось во время или после химиотерапии дублетом платины после введения мАт против PD-1/PD-L1.
 - c. У пациента прогрессирование наблюдалось во время или после приема моноклональных антител против PD-1/PD-L1 после химиотерапии дублетом платины.

3. Пациент должен иметь показатель экспрессии опухоли PD-L1 TPS $\geq 1\%$, оцененный центральной лабораторией во время скрининга.

4. Пациент должен иметь подлежащее оценке заболевание в соответствии с RECIST 1.1.

5. Пациент должен иметь показатель общего состояния (PS) по шкале Восточной кооперативной онкологической группы (ECOG) ≤ 1 .

6. Ожидаемая продолжительность жизни пациента должна составлять по меньшей мере 3 месяца.

7. Пациент должен иметь следующие функции органов и костного мозга:

a. Абсолютное число нейтрофилов (ANC) $\geq 1500/\text{л}$.

b. Тромбоциты $\geq 100000/\text{л}$.

c. Гемоглобин $\geq 9,0$ г/дл (при отсутствии переливания крови в течение 4 недель до рандомизации).

d. Общий билирубин $< 1,5 \times$ институциональная верхняя граница нормы (ВГН) (за исключением синдрома Гилберта, тогда прямой билирубин $< 2 \times$ институциональная ВГН и общий билирубин < 3 мг/дл).

e. Аланинаминотрансфераза (ALT) и аспартатаминотрансфераза (AST) $\leq 3 \times$ ВГН. В случае сопутствующего повышения щелочной фосфатазы $> 2,5 \times$ ВГН уровни ALT и AST должны быть $\leq 1,5 \times$ ВГН.

f. Скорость клубочковой фильтрации ≥ 45 мл/мин/1,73 м² согласно сокращенному уравнению «Модификация диеты при заболеваниях почек».

g. Протромбиновое время (ПВ)/международное нормализованное отношение (МНО) $\leq 1,5 \times$ ВГН (если только пациент не получает антикоагулянтную терапию, в этом случае ПВ должно находиться в пределах терапевтического диапазона предполагаемого применения антикоагулянтов).

h. Активированное частичное тромбопластиновое время (аЧТВ) $\leq 1,5 \times$ ВГН (если только пациент не получает антикоагулянтную терапию, в этом случае аЧТВ должно находиться в пределах терапевтического диапазона предполагаемого использования антикоагулянтов).

Критерии исключения

Любой потенциальный пациент, отвечающий любому из следующих критериев, будет исключен из участия в исследовании.

1. Документирование известных мутаций или реарранжировок генов EGFR, ROS1 или ALK. Если документация о мутационном статусе недоступна, пациенты с неплоскоклеточной гистологией или смешанной гистологией неплоскоклеточной и плоскоклеточной, фиксированной формалином и залитой в парафин (FFPE) опухолевой ткани любого возраста должны быть отправлены в назначенную центральную лабораторию спонсором для тестирования панели биомаркеров (которое может включать, помимо прочего, BRAF, пропуск METex 14, мутации KRAS, реарранжировку RET, амплификацию MET высокого уровня или инфузии гена NTRK). Пациенты не должны

быть рандомизированы до тех пор, пока статус биомаркера не будет доступен в исходной документации на сайте.

2. Пациент подвергался любой из следующих предшествующих терапий:

- a. Предшествующее лечение доцетакселом по поводу NSCLC.
- b. Предшествующее лечение агентом, нацеленным на 4-1BB (CD137), любым типом противоопухолевой вакцины или аутологичной клеточной иммунотерапии.
- c. Лечение противоопухолевым агентом в течение 28 дней до введения GEN1046.
- d. Любой исследуемый агент для лечения NSCLC 4 стадии.
- e. Предшествующее лечение живыми аттенуированными вакцинами в течение 30 дней до начала применения GEN1046. Примеры живых вакцин включают, помимо прочего, следующие: против кори, эпидемического паротита, краснухи, ветряной оспы/опоясывающего лишая (ветряная оспа), желтой лихорадки, бешенства, против бациллы Кальмета-Герена и брюшного тифа. Вакцины против сезонного гриппа для инъекций, как правило, представляют собой инактивированные вирусные вакцины и разрешены; однако интраназальные вакцины против гриппа (например, FluMist®) являются живыми аттенуированными вакцинами и не допускаются. Экспериментальные и/или несанкционированные вакцинации против SARS-CoV-2 не допускаются.
- f. Лучевая терапия в течение 14 дней до первого введения GEN1046. Если пациент получил лучевую терапию в дозе >30 Гр, он должен был восстановиться от токсичности и/или осложнений, вызванных вмешательством.

g. Хронические системные иммуносупрессивные дозы кортикостероидов, т. е. преднизолон > 10 мг в день или кумулятивная доза > 150 мг преднизолона в течение 14 дней до первого введения GEN1046. Заместительная терапия (например, заместительная терапия тироксином, инсулином или физиологическими кортикостероидами при недостаточности надпочечников или гипофиза) не считается формой системного лечения и разрешена.

h. Получали поддержку в виде гранулоцит-колониестимулирующего фактора (G-CSF) или гранулоцит/макрофаг-колониестимулирующего фактора (GM-CSF) за 4 недели до первого введения GEN1046, или имеется хроническая зависимость от переливания крови.

3. Пациент использовал инвазивное исследовательское медицинское устройство в течение 28 дней до запланированной первой дозы GEN1046 или в настоящее время участвует в интервенционном исследовании.

4. Пациент прекратил лечение из-за прогрессирования заболевания в течение первых 6 недель лечения, содержащего иммунную CPI.

5. Пациент получил последнюю дозу моноклональных антител против PD-1/PD-L1 >250 дней до включения в это исследование.

6. Пациент имел прошлую или текущую злокачественную опухоль, отличную от включенного диагноза, за исключением отличных от меланомы злокачественных новообразований кожи; *in situ* злокачественные новообразования мочевого пузыря,

желудка, толстой кишки, шейки матки/дисплазию, эндометрия, меланому или злокачественное новообразование молочной железы; и любое излечимое злокачественное новообразование с полным ответом продолжительностью более 2 лет, которое не требует или не предполагает какой-либо дополнительной терапии.

7. Всем пациентам следует пройти КТ или МРТ головного мозга для выявления новых или существующих поражений центральной нервной системы (ЦНС). Пациенты с историей внутримозговых артериовенозных мальформаций, церебральной аневризмы, прогрессирующими метастазами в головной мозг, компрессией спинного мозга (в результате заболевания) или инсультом будут исключены.

8. Пациенты с известными нестабильными метастазами в ЦНС и любым активным карциноматозным менингитом или в анамнезе будут исключены. Пациенты с ранее лечеными метастазами в головной мозг могут участвовать при условии, что они радиологически стабильны (т. е. без признаков прогрессирования) в течение по меньшей мере 28 дней при повторной визуализации (обратите внимание, что повторная визуализация должна выполняться во время скрининга исследования). Пациенты должны быть клинически стабильными и не должны проходить интенсивную терапию кортикостероидами или снижать дозу стероидов, а также не должны получать стереотаксическое облучение или облучение всего мозга в течение 14 дней до C1D1. Хроническая стероидная терапия приемлема при условии, что доза стабильна в течение последних 14 дней до C1D1 (<10 мг преднизона в день или его эквивалент).

9. У пациента выявлена аллергия, гиперчувствительность или непереносимость GEN1046 или его вспомогательных веществ.

10. Пациент имеет противопоказания к использованию пембролизумаба согласно местной инструкции по назначению.

11. Пациентом является женщина, которая беременна, кормит грудью или планирует забеременеть во время участия в этом исследовании или в течение 6 месяцев после приема последней дозы GEN1046.

12. Пациент - мужчина, который планирует зачать ребенка во время участия в этом исследовании или в течение 6 месяцев после последней дозы GEN1046.

13. У пациента имеются признаки активного интерстициального заболевания легких или активного неинфекционного пневмонита.

14. Пациент имеет любое из следующего:

а. Текущая или активная инфекция, требующая внутривенного лечения противомикробной терапией, которую вводили менее чем, за 2 недели до первой дозы.

б. Симптоматическая застойная сердечная недостаточность (III или IV степени по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации), нестабильная стенокардия или сердечная аритмия.

в. Неконтролируемая артериальная гипертензия определяется как систолическое артериальное давление ≥ 160 мм рт.ст. и/или диастолическое артериальное давление ≥ 100 мм рт.ст., несмотря на оптимальное медикаментозное лечение.

d. Текущие или недавние (в течение 6 месяцев) признаки значительного аутоиммунного заболевания, требующего лечения системными иммуносупрессивными препаратами, что может указывать на риск возникновения иНЯ.

e. Текущая сенсорная или моторная нейропатия ≥ 2 степени.

a. Серьезная незаживающая рана, язва кожи или перелом кости.

f. Злоупотребление психоактивными веществами, медицинские, психологические или социальные условия, которые могут помешать участию пациента в исследовании или оценке его результатов.

15. Из анамнеза пациента известно о любом из следующих событий:

a. иНЯ 3-й степени или выше, которые привели к прекращению лечения предшествующей иммунотерапией.

b. Миозит, синдром Гийена-Барре или миастения любой степени.

c. Заболевания печени (например, алкогольный гепатит или неалкогольный стеатогепатит, лекарственный или аутоиммунный гепатит или признаки цирроза печени).

d. Аллотрансплантат органов (за исключением трансплантации роговицы), или аутологичная или аллогенная трансплантация костного мозга, или спасение стволовых клеток в течение 3 месяцев до первой дозы GEN1046.

e. Аллергические реакции 3 степени или выше на терапию моноклональными антителами, а также известная или подозреваемая аллергия или непереносимость любого агента, назначаемого в ходе этого исследования.

f. Продолжающаяся токсичность ≥ 2 степени (за исключением алопеции), связанная с предшествующим лечением, за исключением случаев, когда по мнению исследователя иЯ являются клинически незначительными и/или стабильными на поддерживающей терапии.

16. Пациент перенес серьезную операцию (например, требующую длительного периода восстановления) и не полностью восстановился до своего исходного состояния до участия в этом исследовании.

17. У пациента из анамнеза известно о серопозитивности к вирусу иммунодефицита человека HIV.

18. Пациент имеет в анамнезе/положительную серологию на вирус гепатита В (HBV) (если только у него нет иммунитета в результате вакцинации или разрешившейся естественной инфекции, или если нет пассивной иммунизации вследствие терапии иммуноглобулинами):

a. Положительный тест на антитела к коровому антигену гепатита В (анти-НВс)

и

b. Отрицательный тест на антитела к поверхностному антигену гепатита В (анти-НВs).

19. В анамнезе пациента имеется продолжающаяся инфекция вируса гепатита С (HCV), которая не была излечена.

20. Пациент имеет в анамнезе инфекцию вируса HBV (определяемого как

положительный на поверхностный антиген гепатита В [HBsAg] или ДНК HBV) или известного активного вируса HCV (определяемого как обнаружение РНК HCV [качественное]).

21. У пациента имеется какое-либо состояние, участие в котором, по мнению исследователя, не отвечает интересам пациента (например, ставит под угрозу его благополучие) или которое может помешать, ограничить или исказить результаты оценок, предусмотренных протоколом.

Введение исследуемого лечения

Исследуемое лечение проводят, как описано в Таблице 13, до тех пор, пока не будет выполнен один или более из приведенных ниже критериев прекращения.

GEN1046 и пембролизумаб будут вводить внутривенно с помощью квалифицированного персонала. Во время приготовления и обращения с лекарственным средством следует избегать энергичного перемешивания или встряхивания. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы обеспечить стерильность приготовленного раствора, поскольку продукт не содержит антимикробных консервантов или бактериостатических агентов.

Таблица 13: Введение лечения

Плечо	Обработка	Доза (мг)	Лекарственная форма	Путь	Инструкции по введению	Схема	Продолжительность курса
A	GEN1046	100	Концентрат для раствора	IV	30-минутная инфузия	Один раз	3 недели
A	GEN1046	500	Концентрат для раствора	IV	30-минутная инфузия	Один раз	6 недель
B	GEN1046	100	Концентрат для раствора	IV	30-минутная инфузия	Один раз	3 недели
B	Пембролизумаб	200	Раствор	IV	30-минутная инфузия согласно инструкции по назначению	Один раз	3 недели
C	GEN1046	100	Концентрат для раствора	IV	30-минутная инфузия	Один раз	6 недель
C	Пембролизумаб	400	раствор	IV	30-минутная инфузия согласно инструкции по назначению	Один раз	6 недель

Монотерапия GEN1046

В группе A GEN1046 в дозе 100 мг Q3W вводят в виде 30-минутной внутривенной инфузии в первый день в течение первых 2 курсов лечения; после этого GEN1046 в дозе 500 мг Q6W вводят в виде 30-минутной внутривенной инфузии в первый день последующих 6-недельных курсов лечения. Для GEN1046 снижение дозы не допускается.

GEN1046 и пембролизумаб

В группе B GEN1046 100 мг и пембролизумаб 200 мг будут вводить в первый день

каждого 3-недельного курса.

В группе С GEN1046 100 мг и пембролизумаб 400 мг будут вводить в первый день каждого 6-недельного курса.

Сначала вводят пембролизумаб, а затем GEN1046. Сразу после пембролизумаба следует промывание физиологическим раствором для очистки линии перед началом инфузии GEN1046. Время между инфузиями составляет примерно 30 минут или больше в зависимости от ситуации. Снижение дозы GEN1046 и/или пембролизумаба не допускается.

Описание исследуемого лечения

GEN1046-20 мг/мл, приготовленный на основе 20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 0,02% полисорбата-80, pH 5,5 - представляет собой раствор от прозрачного до опалесцирующего, от бесцветного до слегка желтого цвета, поставляемый в виде концентрата для приготовления раствора для инфузий, который необходимо развести (на месте) в 0,9% растворе NaCl (физраствор).

Инфузионный пембролизумаб (Кейтруда®) представляет собой стерильный, не содержащий консервантов, прозрачный или слегка опалесцирующий раствор, от бесцветного до слегка желтого цвета, который требует разведения для внутривенной инфузии.

Прекращение исследуемого лечения

Исследуемое лечение пациента должно быть прекращено в случае:

Неприемлемых НЯ, требующих прекращения лечения*

Несоответствия пациента

Запроса пациента на прекращение исследуемого лечения*

Беременности

Клинического прогрессирования*

Прогрессирование заболевания (в соответствии с критериями ответа)

Статус выживаемости

Статус выживаемости оценивают каждые 12 недель (± 14 дней), начиная со дня последней дозы GEN1046 и до тех пор, пока пациент не умрет или не выйдет из исследования. Пациенты, которые недоступны или чьи назначенные члены семьи недоступны для этой оценки, заносятся как «выбывшие из последующего наблюдения».

Выход пациента из исследования

Пациент будет выведен из исследования по любой из следующих причин:

Смерть

Выбывание из последующего наблюдения

Отзыв согласия пациентом

Закрытие исследования

Спонсор прекращает исследование

Если пациент прекращает лечение в ходе исследования и выходит из исследования до того, как у него проявится PD, необходимо получить оценки по окончании лечения.

Оценка эффективности

Ответ опухоли оценивают локально в соответствии с критериями RECIST v1.1 (Eisenhauer et al., 2009). План сбора изображений для оценки представлен ниже. Кроме того, если это возможно, собирают предыдущие изображения сканирования опухоли.

Данные визуализации собирают централизованно и проверяют на качество контрактной исследовательской организацией по визуализации (CRO), назначенной спонсором. Оценка местного исследователя будет использована для анализа первичных конечных точек и принятия решения о лечении.

Таблица 14: План сбора данных для оценки изображений

Процедура	Скрининг/Исходный уровень	Во время лечения/Последующее наблюдение
КТ или МРТ грудной клетки, брюшной полости и таза (с внутривенным контрастным усилением)	предписано	предписано
КТ или МРТ мозга	Если есть клинические показания	Если поражения были зарегистрированы исходно, следуйте той же схеме, что и КТ/МРТ грудной клетки, брюшной полости и таза.
Сканирование костей всего тела (в соответствии с институциональным стандартом лечения [например, сканирование костей Tc-99, МРТ костей всего тела, ФДГ-ПЭТ или NaF ПЭТ])	Если есть клинические показания	Если есть клинические показания
Локализованная КТ костей, МРТ или рентгенография	Для любых поражений, выявленных при сканировании костей всего тела, которые не видны на КТ или МРТ грудной клетки, живота и таза.	Если поражения были зарегистрированы исходно, следуйте той же схеме, что и КТ/МРТ грудной клетки, брюшной полости и таза.
КТ или МРТ других метастатических участков (например, шеи)	Если есть клинические показания	Если поражения были зарегистрированы исходно, следуйте той же схеме, что и

		КТ/МРТ грудной клетки, брюшной полости и таза.
--	--	--

Сокращения: КТ=компьютерная томография; МРТ=магнитно-резонансная томография; ПЭТ=позитронно-эмиссионная томография.

Для пациентов, которые продолжают лечение после первоначального прогрессирования заболевания, определенного RECIST, необходимо продолжить оценку эффективности.

Для пациентов, которые прекращают исследуемое лечение без прогрессирования заболевания, определенного RECIST по оценке исследователя, визуализация в ходе исследования должна продолжаться до прогрессирования заболевания, определенного RECIST, начала последующей противоопухолевой терапии, отзыва согласия, смерти или выбывания из последующего наблюдения, в зависимости от того, что произойдет раньше.

Оценки визуализации на исходном уровне

Оценку визуализации проводят при скрининге/исходном уровне в течение 21 дня после введения первой дозы исследуемого лечения (от дня -21 до дня -1 перед C1D1). Обо всех участках метастатического заболевания сообщается как о целевых или нецелевых поражениях на исходном уровне, и их отслеживают на протяжении всего исследования.

Любые методы визуализации, уже выполненные в ходе регулярного обследования пациента в течение 21 дня до начала лечения, в том числе до подписания ICF основного исследования, могут рассматриваться как исходные изображения для этого исследования только в том случае, если они соответствуют техническим требованиям к визуализации для исследования. Любые оценки изображений, полученные после рандомизации, не могут считаться изображениями исходного уровня.

Все плановые исследования опухолей, включая скрининг, должны включать полную визуализацию грудной клетки, брюшной полости и таза. Для визуализации опухолей настоятельно рекомендуется использовать КТ с йодсодержащим контрастом. МРТ органов брюшной полости и таза можно использовать, когда КТ с йодсодержащим контрастом противопоказана или когда этого требует местная практика. Визуализацию органов грудной клетки необходимо выполнять с помощью КТ, но ее можно проводить и без контрастирования, если йодсодержащий контраст противопоказан.

МРТ является наиболее предпочтительным методом визуализации головного мозга. В случае известных метастазов в головной мозг или подозрений их существования в начале исследования проводят МРТ головного мозга. Предпочтительна МРТ головного мозга с контрастированием; однако, если контраст МРТ противопоказан, то допускается МРТ без контраста или КТ с контрастом или без него.

Любое потенциально измеримое поражение, которое ранее подвергалось лечению лучевой терапией, следует рассматривать как неизмеримое поражение. Однако, если поражение, ранее подвергавшееся лучевой терапии, явно прогрессировало после лучевой терапии, его можно рассматривать как измеримое поражение.

Визуализационные оценки после исходного уровня

Визуализационные оценки, как описано в Таблице 14, выполняются с использованием того же метода визуализации, который использовался на исходном уровне, независимо от прерывания исследуемого лечения или фактического введения дозы. Визуализацию в ходе исследования проводят каждые 6 недель (± 7 дней) в течение первых 24 недель и каждые 9 недель (± 7 дней) в дальнейшем от даты введения первой дозы до прогрессирования заболевания (по оценке исследователя), начала последующей противоопухолевой терапии, отзыва согласия, смерти или выбывания из последующего наблюдения, в зависимости от того, что наступит раньше. Оценка изображений планируется с использованием даты приема первой дозы исследуемого препарата в качестве эталонной и соблюдается независимо от того, временно приостанавливается ли лечение исследуемым препаратом или проводятся внеплановые обследования.

Дополнительные методы визуализации могут быть выполнены в любой момент исследования по усмотрению исследователя для подтверждения оценки эффективности для пациента, если это необходимо. Клиническое подозрение на прогрессирование заболевания в любой момент требует немедленного проведения физического осмотра и визуализационной оценки, а не ожидания следующей плановой визуализационной оценки.

Каждое поражение, оцениваемое на исходном уровне, должно оцениваться методом визуализации и, если возможно, одним и тем же местным рентгенологом/врачом на протяжении всего исследования, чтобы сравнение было последовательным. Если внеплановая визуализационная оценка проводится из-за подозрения на прогрессирование, последующие визуализационные оценки следует проводить в соответствии с первоначальным графиком визуализации.

Комбинированная позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ)-КТ может использоваться только в том случае, если КТ имеет такое же диагностическое качество, как и КТ, выполненная без ПЭТ, включая использование внутривенного контрастного вещества. По усмотрению исследователей может быть выполнено сканирование ФДГ-ПЭТ для документирования PD в соответствии с RECIST 1.1.

Выживаемость без прогрессирования 2

Выживаемость без прогрессирования 2 (ВБП2) определяется как время от первой инфузии до объективного прогрессирования опухоли при лечении следующей линии или смерти по любой причине. Для ВБП2 объективное прогрессирование опухоли будет определяться на основе оценки исследователем прогрессирования на терапии следующей линии. С этой целью будут фиксироваться последующие противоопухолевые терапии, включая дату начала/окончания, причину прекращения и дату прогрессирования заболевания.

Оценка заболевания iRECIST

Прогрессирование заболевания iRECIST должно быть подтверждено как минимум через 4-7 недель после первых рентгенологических признаков PD у клинически стабильных участников. Пациенты, у которых наблюдается неподтвержденное прогрессирование заболевания, могут продолжать исследуемое лечение до тех пор, пока

не будет подтверждено прогрессирующее, при условии, что пациент клинически стабилен.

Клинически стабильные пациенты должны соответствовать следующим критериям:

Пациент должен иметь клиническую пользу от продолжения комбинированной схемы GEN1046 или GEN1046 (по оценке исследователя) и не должен иметь быстрого прогрессирующего заболевания.

Пациент переносит пробное лечение.

Пациент должен иметь стабильный статус ECOG.

Лечение после прогрессирующего не задерживает неизбежное вмешательство, чтобы предотвратить серьезные осложнения, способствующие прогрессирующему заболеванию (например, метастазы в центральную нервную систему, требующие немедленного лечения).

Любые клинически нестабильные пациенты прекращают исследуемое лечение при первом появлении рентгенологического прогрессирующего заболевания. Пациентам с клинической нестабильностью не требуется повторная визуализация для подтверждения PD с помощью iRECIST; однако подтверждение прогрессирующего заболевания может быть получено по усмотрению исследователя после консультации со спонсором.

Если повторная визуализация покажет прогрессирующее заболевание, подтвержденное iRECIST (iCPD), пациенты прекратят исследуемое лечение. Однако если пациент получает улучшение после наблюдения iCPD, исключение для продолжения пробного лечения должно быть одобрено медицинским наблюдателем спонсора. Если повторная визуализация показывает стабильное заболевание iRECIST (iSD), частичный ответ iRECIST (iPR) или полный ответ iRECIST (iCR), визуализацию следует продолжать каждые 6 недель (± 7 дней), а пациенту следует продолжать исследуемое лечение.

Предварительные результаты

По состоянию на 10 августа 2022 г. 4 пациента были включены в подготовительную часть безопасности группы C, а период DLT у 4-го пациента завершен. У поддающихся оценке пациентов не было зарегистрировано никаких DLT, и ни одно из зарегистрированных СНЯ не было связано с исследуемым препаратом (GEN1046 или пембролизумаб). У 1 пациента наблюдался частичный ответ, а у 1 пациента заболевание стабильно.

Пример 9: Фармакокинетическая/фармакодинамическая модель.

Была разработана интегрированная модель количественной системной фармакологии (QSP), которая сочетает в себе многокамерную физиологически обоснованную фармакокинетическую модель (PBPK) с моделью механистической системной биологии, представляющей опухолевые/иммунные процессы и взаимодействия, которые происходят в микроокружении опухоли и дренирующих лимфатических узлах. Модель PBPK описывает FcRn-опосредованный транспорт и распределение GNE1046 в пространствах здоровых тканей и опухолей с возвратом в

плазму, опосредованным лимфатическим потоком. Модель механистической системной биологии предназначена для обобщения известных биологических процессов, связанных с пролиферацией опухолей, циклом злокачественного новообразования/иммунитета, а также механизмов, непосредственно связанных с активностью GEN1046 и лекарственного средства против PD1 пембролизумаба. Модель использовала широкий спектр литературных, доклинических, фармакокинетических и фармакодинамических данных для параметризации этих путей. Модель использовалась для создания популяции виртуальных пациентов, охватывающей наблюдаемую вариабельность ключевых маркеров (например, экспрессии PD-1 и PD-L1 на исходном уровне) и использовалась для прогнозирования частоты объективного ответа (ЧОО) при применении GEN1046 и пембролизумаба в виде монотерапии или в виде комбинации. Модель была проверена на основе объективной частоты ответа (ЧОО), наблюдаемой для пембролизумаба (данные из литературы) и клинических исследований монотерапии GEN1046. Оценка проводилась для GEN1046 в дозе 100 мг Q3W или 100 мг Q6W в виде монотерапии или в комбинации с пембролизумабом в утвержденной дозе 200 мг Q3W или 400 мг Q6W.

Слабая дозозависимая связь наблюдалась как в частоте частичного ответа (PR), так и в полном (CR) для GEN1046, назначаемого в дозе 100 мг Q3W или Q6W в комбинации с пембролизумабом. Прогноз показателей PR и CR показывает максимальный ответ между дозами GEN1046 100 и 300 мг Q3W. Кроме того, прогнозы показывают минимальные различия между GEN1046 и пембролизумабом при введении Q3W или Q6W (Фигура 11).

Пример 10: Влияние GEN1046 в комбинации с пембролизумабом на секрецию цитокинов в аллогенном MLR-анализе LPS-созревших дендритных клеток и истощенных *in vitro* Т-клеток.

Цель: Чтобы проанализировать, может ли комбинация GEN1046 с пембролизумабом обратить вспять истощение Т-клеток в анализе реакции смешанных лимфоцитов (MLR), четыре уникальные аллогенные пары зрелых дендритных клеток человека (mDC) и истощенных *in vitro* Т-клеток (Tex) совместно культивировали в присутствии только GEN1046, только пембролизумаба или комбинации обоих антител. Экспрессию ингибирующих рецепторов на Tex определяли с помощью проточной цитометрии, а секрецию интерферона (IFN) γ оценивали в супернатантах совместных культур.

Методы

Моноциты и Т-клетки здоровых доноров

CD14+моноциты и очищенные CD3+Т-клетки были получены от BioIVT. Для анализа MLR использовали четыре уникальные пары аллогенных доноров.

Дифференцировка моноцитов в незрелые дендритные клетки

CD14+моноциты человека были получены от здоровых доноров. Для дифференцировки в незрелые дендритные клетки (iDC) $1-1,5 \times 10^6$ моноцитов/мл культивировали в течение шести дней в полной среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (формула модификации ATCC; ThermoFisher, кат. № A1049101) с

добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (FBS; Gibco, кат. № 16140071), 100 нг/мл гранулоцит-макрофагколониестимулирующего фактора (GM-CSF; BioLegend, кат. № 766106) и 300 нг/мл интерлейкина (IL)-4 (BioLegend, кат. № № 766206) в культуральных колбах T25 (Falcon, кат. № 353108) при 37°C. Через четыре дня среду заменяли свежей средой и добавками.

Дифференцировка iDC в mDC

Перед началом анализа MLR iDC собирали путем сбора неприкрепившихся клеток и дифференцировали в mDC путем инкубации $1-1,5 \times 10^6$ клеток/мл в полной среде RPMI 1640, дополненной 10% FBS, 100 нг/мл GM-CSF, 300 нг/мл IL-4 и 5 мкг/мл липополисахарида (LPS; ThermoFisher, кат. № 00-4976-93) в течение 24 ч при 37°C.

Истощение T-клеток

Очищенные CD3⁺ T-клетки, полученные от здоровых доноров, размораживали и ресуспендировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде AIM-V (ThermoFisher, кат. № 12055091) с добавлением 5% FBS и 10 нг/мл IL-2 (BioLegend, кат. № 589106). Для создания T-клеток с фенотипом, подобным истощению, клетки стимулировали в течение двух раундов с помощью Dynabeads™ Human T Activator CD3/CD28 (Gibco, кат. № 11161D) при соотношении гранулы:клетки 1:1 в течение 48 часов при 37°C и 5% CO₂. Истощенный фенотип T-клеток подтверждали гипочувствительностью к рестимуляции CD3/CD28 (отсутствие секреции IFN γ), как описано ниже. Высокая экспрессия ингибирующих рецепторов TIM3, LAG3 и PD-1 соответствовала истощенному фенотипу. После двух раундов стимуляции истощенные CD3⁺ T-клетки (Tex) оставляли на 24 часа.

В качестве наивного контроля очищенные CD3⁺ T-клетки, полученные от здоровых доноров, размораживали за день до начала анализа MLR и ресуспендировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в полной среде RPMI 1640, дополненной 10% FBS и 10 нг/мл IL-2 и инкубировали O/N при 37°C. Перед анализом MLR аликвоты наивных T-клеток и Tex собирали для проточной цитометрии.

Проточная цитометрия

Для анализа ингибирующих рецепторов на Tex методом проточной цитометрии клетки осаждали при $400 \times g$ в течение 5 минут, промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), снова осаждали, ресуспендировали в 1 мл PBS с добавлением LIVE/DEAD™ фиксируемого в ближнем ИК-диапазоне красителя мертвых клеток. (ThermoFisher Scientific, кат. № L10119, разбавленный 1:500) или синего красителя на жизнеспособность клеток живые/мертвые (ThermoFisher Scientific, кат. № L2305, разведение 1:500) и инкубировали 20 мин при 4°C в темноте. Затем клетки промывали, осаждали и ресуспендировали до концентрации 8×10^6 клеток/мл в буфере FACS (фосфатно-солевой буфер Дульбекко [DPBS, Gibco, кат. № 14190136] с добавлением 0,5% бычьего сывороточного альбумина [BSA, Sigma, кат. № A9576] и 2 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты [ЭДТА, Invitrogen, кат. № 15575-038]), содержащей 5% человеческую сыворотку (Sigma, кат. № H4522), и инкубировали 15 мин при 4°C. Затем 25 мкл, содержащих 2×10^5 клеток, переносили в новый 96-луночный планшет,

содержащий 150 мкл окрашивающей смеси с флуоресцентно меченными антителами, показанными в Таблице 15, разведенными в буфере FACS с добавлением красителя Brilliant Stain Buffer Plus (BD Horizon, кат. № 566385) и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте. Клетки осаждали, промывали буфером FACS, ресуспендировали в 100 мкл фиксационного буфера (Biolegend, кат. № 420801) и инкубировали 15 мин при 4°C в темноте. Клетки снова осаждали, промывали и ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS. Образцы анализировали на проточном цитометре Cytex® Aurora (Cytex Biosciences).

Таблица 15: Антитела, использованные для проточной цитометрии

Маркер	Флуорохром	Клон	Поставщик	кат#	Титр
TIM3	BV421	7D3	BD	565562	1:60
PD-1	PerCP-eFluor 710	J105	Thermofisher	46-2799-42	1:15
Lag3	PE	11C3C65	Biolegend	369306	1:30
4-1BB	PE-Cy5	4B4-1	Biolegend	309808	1:30
Ki67	BV786	B56	BD	563756	1:150

MLR-анализ

mDC (см. Дифференцировка mDC в iDC) собирали и ресуспендировали в среде AIM-V в концентрации 4×10^5 клеток/мл. Тех и наивные CD3+ Т-клетки (см. «Истощение Т-клеток») собирали и ресуспендировали в среде AIM-V в концентрации 4×10^6 клеток/мл. Совместные культуры mDC и Тех высевали при соотношении DC:Т-клеток 1:4 или 1:10, что соответствует 2×10^4 mDC, инкубированных с 8×10^4 или 2×10^5 Тех, и культивировали в присутствии пембролизумаба (1 мкг/мл; неклиническая/исследовательская версия клинического продукта пембролизумаба; Selleckchem, кат. № A2005) или GEN1046 (0,001-30 мкг/мл) в качестве отдельного агента, или оба агента, объединенные в среде AIM-V, в 96-луночном круглодонном планшете (Falcon, кат. № 353227) при 37°C в течение 5 дней. Совместные культуры, обработанные bsIgG1-PD-L1×ctrl (30 мкг/мл), bsIgG1-ctrl×4-1BB (30 мкг/мл), IgG1-ctrl-FEAL (30 мкг/мл) или изотипическим контролем IgG4 (1 мкг/мл) включали в качестве контроля (Таблица 16). Параллельно совместные культуры mDC и наивных CD3+ Т-клеток при соотношении DC:Т-клеток 1:10, что соответствует 2×10^4 mDC, инкубированных с 2×10^5 Т-клетками, культивировали с 1 мкг/мл пембролизумаба и без него. Через 5 дней планшеты центрифугировали при $500 \times g$ в течение 5 мин и супернатант осторожно переносили из каждой лунки в новый 96-луночный круглодонный планшет.

Собранные супернатанты анализировали на уровень IFN γ с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора AlphaLISA IFN γ (Perkin Elmer, кат. № AL217) на приборе Envision в соответствии с инструкциями производителя.

Таблица 16: Антитела

Тестируемое соединение	Поставщик, кат. по.	Содержащие SEQ ID NO
GEN1046	N/A	CD137-связывающее плечо:

		SEQ ID NO: 1, 5, 35, 29 PD-L1-связывающее плечо: SEQ ID NO: 11, 15, 36, 30
bsIgG1-PD-L1×ctrl ¹	N/A	SEQ ID NO: 11, 15, 53, 54, 35, 36, 29, 30
bsIgG1-ctrl×4-1BB ¹	N/A	SEQ ID NO: 35, 36, 1, 5, 53, 54, 29, 30
IgG1-ctrl-FEAL ¹	N/A	SEQ ID NO: 53, 54, 30, 35
Пембролизумаб	Selleckchem, кат. по. A2005, Лот по. A200504 (вариант не клинического/лабораторного класса клинического продукта Пембролизумаб)	N/A
IgG4 isotype control	Biolegend, кат. по.403702 (антитело изотипического контроля для Пембролизумаба)	N/A

¹Контрольный связывающий фрагмент на основе IgG1-b12-антитела против HIV gp120 (Barbas et al., J Mol Biol 230: 812-823)

Анализ синергии лучшего индивидуального агента (Highest single agent (HSA))

Значения концентрации цитокинов в каждой схеме лечения нормализовали путем вычитания значений фонового контроля (контрольные лунки без обработки) и выражали в процентах от максимального значения в анализе. Комбинированный эффект оценивали количественно путем сравнения наблюдаемого ответа с ожидаемым ответом с использованием эталонной модели Highest Single Agent (HSA), которая определяется как максимальный ответ на одно лекарственное средство при соответствующих концентрациях.

Результаты и заключение

После двух раундов стимуляции с гранулами CD3/CD28 Т-клетки стали гипочувствительными к двойной стимуляции анти-CD3 и анти-CD28, что соответствует истощенному фенотипу, о чем свидетельствует снижение секреции IFN γ (Фигура 12А). Кроме того, Т-клетки продемонстрировали повышенную экспрессию ингибирующих рецепторов TIM3, LAG3 и PD-1 (Фигура 12В) и пониженную экспрессию маркера пролиферации Ki67 (Фигура 12С) по сравнению с наивными Т-клетками, что соответствует фенотипу, подобному истощенному.

Снижение секреции IFN γ также было очевидно в анализах MLR mDC и Тех по сравнению с анализами MLR mDC и наивных CD3+Т-клеток (Фигура 13). Лечение пембролизумабом или GEN1046 в качестве отдельных агентов частично снижало секрецию IFN γ . Комбинация $\geq 0,1$ мкг/мл GEN1046 с 1 мкг/мл пембролизумаба дополнительно усиливала секрецию IFN γ по сравнению с активностью одного агента в этих анализах mDC:Тех MLR (Фигура 13) и демонстрировала синергизм на основе модели HSA (Фигура 14). Эти данные позволяют предположить, что потерю секреции цитокинов истощенными Т-клетками можно частично обратить вспять с помощью GEN1046 в комбинации с пембролизумабом.

Пример 11: Противоопухолевая активность в отношении роста опухоли рака толстой кишки мышей MC38 при обработке комбинацией mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB с анти-mPD-1.

Цель: изучить противоопухолевую активность антитела mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB индивидуально или в комбинации с анти-mPD-1 на модели рака толстой кишки MC38 у мышей C57BL/6.

Методы

Клетки рака толстой кишки мыши MC38 культивировали в модифицированной среде Игла Дульбекко с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки при 37°C, 5% CO₂. Клетки MC38 собирали из культуры клеток, растущих в логарифмической фазе, и оценивали количественно.

Клетки MC38 (1×10^6 опухолевых клеток в 100 мкл PBS) вводили подкожно в правый нижний бок самкам мышей C57BL/6 (полученных от Shanghai Lingchang Biotechnology Co., Ltd and Services; возраст 6-8 недель на начало эксперимента).

Рост опухоли оценивали три раза в неделю с помощью штангенциркуля. Объемы опухолей (мм³) рассчитывали на основе измерений штангенциркулем как $([длина] \times [ширина]^2) / 2$, где длина представляет собой самый длинный размер опухоли, а ширина представляет собой самый длинный размер опухоли, перпендикулярный длине.

Обработку начинали, когда средний объем опухоли достигал 60 мм³. Мышей рандомизировали на группы (n=10/группа) с одинаковым средним объемом опухоли до обработки. В дни обработок (две дозы еженедельно в течение трех недель [2QW×3]) мышам внутрибрюшинно вводили антитела, указанные в Таблице 17, в объеме инъекции 10 мкл/г массы тела. При комбинированной обработке антитела вводили двумя отдельными инъекциями с интервалом 20 минут между ними (Таблица 17). Уровни доз были основаны на предыдущем опыте применения этих антител на мышинной модели MC38.

Мышей ежедневно контролировали на наличие клинических признаков заболевания. Измерения массы тела проводили три раза в неделю после рандомизации. Антитела и их комбинации хорошо переносились, поскольку при обработке у мышей наблюдалась минимальная потеря массы тела (<20%), а не увеличение массы тела. Эксперимент заканчивался для отдельных мышей, когда объем опухоли превышал 1500 мм³ или когда животные достигали гуманных конечных точек (например, когда у мышей наблюдалась потеря массы тела >20%, когда в опухолях наблюдалось изъязвление [>75%], когда наблюдались серьезные клинические признаки и/или когда рост опухоли блокировал физическую активность мыши).

Таблица 17. Группы обработки и схема дозирования

Группа обработки	№ на группу	Обработка	Доза	Схема введения	Seq id/ Поставщик, кат. по.
1	10	mIgG2a-ctrl-AAKR	5 мг/кг	2QW×3	Seq id: 53, 54, 58, 59

Группа обработки	№ на группу	Обработка	Доза	Схема введения	Seq id/ Поставщик, кат. по.
2	10	Анти-mPD-1	10 мг/кг	2QW×3	клон RMP1-14, Leinco Technologies, кат. по. P372
3	10	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB	5 мг/кг	2QW×3	Seq id: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61
4	10	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB ^a + Анти-mPD-1	5 мг/кг + 10 мг/кг	2QW×3	См. выше: группа 2 и 3

^aПервым вводили mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB, а второе антитело вводили через 20 минут.

Мышам, у которых наблюдалась полная регрессия опухолей после обработки антителами, повторно вводили опухолевые клетки MC38 через 121 день после начала обработки. Мышам инокулировали 1×10^6 свежих опухолевых клеток MC38 на противоположном фланге от исходной инокуляции опухолевых клеток. В качестве контроля обработки опухолевого роста группе наивных мышей C57BL/6 соответствующего возраста (n=6) инокулировали опухолевые клетки MC38 из той же культуры клеток.

Результаты

Быстрый рост опухоли наблюдали у мышей, несущих MC38, обработанных несвязывающим контрольным антителом mIgG2a-ctrl-AAKR (5 мг/кг; Фигура 15A). У мышей, подвергнутых обработке антителом против мышинового PD-1 (анти-mPD-1; 10 мг/кг) или mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB (5 мг/кг; Фигура 15A) в качестве отдельных агентов, наблюдали задержку роста опухоли с более выраженной задержкой роста опухоли, индуцированной mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB. У мышей, подвергнутых обработке mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB (5 мг/кг) в комбинации с анти-mPD-1 (10 мг/кг; оба 2QW×3), рост опухоли был дополнительно замедлен по сравнению с применением каждого агента по отдельности (Фигура 15A), и полную регрессию опухоли наблюдали у 4 из 10 мышей на 23-й день после начала обработки (по сравнению с полной регрессией опухоли у 1/10 и 0/10 мышей, наблюдаемой для mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB и анти-mPD-1 индивидуально, соответственно (Таблица 18). Анализ Каплана-Мейера показал, что обработка комбинацией mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB и анти-mPD-1 приводила к значительному увеличению выживаемости без прогрессирования, определяемой как процент мышей с объемом опухоли менее 500 мм³, по сравнению с группой, подвергнутой обработке контрольным антителом (p<0,001), и по сравнению с любым антителом в отдельности (p<0,05; по Мантелю-Коксу; Фигура 15B, Таблица 19). Следовательно, при использовании этой комбинации наблюдался терапевтический синергизм, определяемый как

превосходящая ($p < 0,05$) противоопухолевая эффективность по сравнению с активностью, проявляемой каждым агентом в качестве монотерапии.

Мышам с полной регрессией опухоли, например, у которых опухоли полностью исчезли в течение периода наблюдения (Таблица 18), и контрольной группе из шести мышей соответствующего возраста, не имеющих опухолей, (повторно) вводили опухолевые клетки MC38, которые были подкожно инъецированы на 121 день после начала обработки антителами. Контрольной группе из шести мышей соответствующего возраста, не имеющих опухолей, одновременно подкожно инъецировали опухолевые клетки MC38. У всех наивных мышей опухоль MC38 выросла до 1500 мм^3 на 24-й день после инокуляции опухоли, тогда как у мышей, подвергнутых повторному заражению, роста опухоли не наблюдалось в течение всего периода наблюдения, составляющего 35 дней после повторного заражения (156 дней после исходной инокуляции опухолевыми клетками MC38), что соответствует развитию иммунной памяти (Фигура 16).

Эти результаты дают обоснование для оценки комбинации GEN1046 с антителом против PD-1 для дальнейшего усиления противоопухолевого иммунного ответа у онкологических больных с целью получения стойких и глубоких клинических ответов и повышения выживаемости.

Таблица 18. Полная регрессия опухоли при обработке мышей с опухолью MC38.

Группа обработки	Обработка	Доза	Полная регрессия опухоли (но. мышей с CR/ общее но. мышей на группу)
1	mIgG2a-ctrl-AAKR	5 мг/кг	0/10
2	Анти-mPD-1	10 мг/кг	0/10
3	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB	5 мг/кг	1/10
4	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB+Анти-mPD-1	5 мг/кг+10 мг/кг	4/10

Таблица 19. Анализ Мантеля-Кокса выживаемости без прогрессирования, индуцированной mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB, анти-mPD-1 или их комбинациями в модели MC38 у мышей C57BL/6

Сравниваемые группы обработки			Выживание без прогрессии ¹ Р-значение Мантеля-Кокса
mIgG2a-ctrl-AAKR	vs	Анти-mPD-1	0,008
mIgG2a-ctrl-AAKR	vs	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB	0,002
mIgG2a-ctrl-AAKR	vs	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB+анти-mPD-1	<0,001
Анти-mPD-1	vs	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB	0,070
Анти-mPD-1	vs	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB+анти-mPD-1	<0,001
mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB	vs	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB+анти-mPD-1	0,043

¹Объем опухоли $< 500 \text{ мм}^3$ использовали в качестве порогового значения для

выживаемости без прогрессирования. Анализ Мантеля-Кокса проводили на 69-й день.

²Значение $p < 0,05$ считалось значимым.

Пример 12: Комбинация mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB и анти-mPD-1 усиливает противоопухолевый иммунитет на мышинной модели опухоли рака толстой кишки MC38 посредством различных и дополняющих друг друга иммуномодулирующих эффектов.

Цель: Как описано в Примерах 2 и 11, mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB в комбинации с анти-mPD-1 продемонстрировал сильную противоопухолевую активность с длительным ответом на модели рака толстой кишки MC38 у мышей C57BL/6. Поэтому эту модель использовали для дальнейшего изучения механизма действия комбинации mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB и анти-mPD-1 *in vivo*. Мышей, несущих MC38, подвергали обработке mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB, анти-mPD-1 или их комбинацией.

Методы

Модель рака толстой кишки MC38

Опухоли карциномы толстой кишки мышей MC38 из двух независимых исследований собирали для оценки иммуногистохимии и проточной цитометрии, чтобы охарактеризовать *in vivo* активность mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB и анти-mPD-1 в качестве монотерапии и в комбинации.

Модель опухоли MC38 была создана, как описано в Примерах 2 и 11. Обработку мышей с опухолями SC MC38 начинали, когда объем опухоли достигал 50-70 мм³. Мышей рандомизировали на группы с одинаковым средним объемом опухоли до обработки. В дни обработок (две дозы еженедельно в течение двух недель [2QW×2]) мышам внутрибрюшинно вводили антитела, указанные в Таблице 20, в объеме инъекции 10 мкл/г массы тела. При комбинированной обработке антитела вводили двумя отдельными инъекциями с интервалом 20 минут между ними (Таблица 20).

Мышей ежедневно контролировали на наличие клинических признаков заболевания. Измерения массы тела проводили три раза в неделю после рандомизации. На 7-й или 14-й день после начала обработки мышей (n=5 на группу) подвергали эвтаназии для удаления опухолей.

Таблица 20. Группы обработки и схема дозирования

Группа обработки	Обработка	Доза	Схема введения	Seq id/ Поставщик, кат. по.
1	PBS	N/a	2QW×2	n/a
2	Анти-mPD-1	10 мг/кг	2QW×2	клон RMP1-14, Leinco Technologies, кат. по. P372
3	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB	5 мг/кг	2QW×2	Seq id: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61
4	mbsIgG2a-PD-	5 мг/кг	2QW×2	См. выше: группа 2 и 3

	L1×4-1BB ^a + Анти-mPD-1	+ 10 мг/кг		
--	---------------------------------------	------------	--	--

^aПервым вводили mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB, а второе антитело вводили через 20 минут.

Иммуногистохимия и гибридизация опухолевой ткани *in situ*

Опухоли иссекали, фиксировали в формалине, заливали в парафин и делали срезы (4 мкм). Для гистологической оценки срезы опухоли депарафинизировали и окрашивали с помощью набора Tissue-Tek Prisma H&E Stain Kit (Sakura [Torrance, CA], 6190) с использованием автоматического устройства для окрашивания слайдов Tissue-Tek Prisma Plus (Sakura). Для оценки CD3+, CD4+ и CD8+ клеток в опухоли срезы депарафинизировали и извлекали антигены с использованием буфера CC1 (Roche, 950-124), после чего следовали гашение эндогенной пероксидазы (Dako Agilent, S2003) и блокирование специфических сайтов связывания с помощью блокирующего буфера (Roche, 05268869001) с использованием платформы автоматического окрашивания Roche Ventana Discovery (DISC). Срезы инкубировали с первичными антителами (перечисленными в Таблице 21), которые детектировали с использованием наборов для иммуногистохимического детектирования антикरोличьих антител: для CD3 и CD4 с использованием только анализа антикरोличьих антител DISC, Omnimap (Roche, 05269679001) для CD8 последовательно с использованием DISC антикроличьего HQ (Roche, 07017812001) и DISC, а также амплификации для анти-HQ HRP мультимера (Roche, 06442544001). HRP визуализировали с использованием 3,3'-диаминобензидина (ChromoMap DAB; Roche, 05266645001) в соответствии с инструкциями производителя. Для оценки PD-L1+клеток в опухоли срезы депарафинизировали и антигены извлекали с использованием буфера ER2 (Leica Biosystems, AR9640), с последующим гашением эндогенной пероксидазы (Dako Agilent, S2003) и блокированием неспецифических сайтов связывания блокирующим буфером (Leica Biosystems, DS9800) с использованием платформы автоматического окрашивания Leica Bond Rx. Срезы инкубировали с первичными антителами (перечисленными в Таблице 21), которые детектировали с использованием набора для иммуногистохимического детектирования антикроличьих антител (Leica Biosystems, DS9800) в соответствии с инструкциями производителя. Для оценки 4-1BB+ и PD-L2+ клеток в опухоли анализы RNAscope проводили на Leica Bond Rx с соответствующими зондами RNAscope (ACDBio, 493658 и 447788, соответственно) и наборами для детектирования RNAscope (ACDBio, 322150) для детектирования специфических для генов молекул мРНК. Во всех анализах ядра контрастировали путем инкубации с гематоксилином Майера. Специфичность окрашивания контролировали путем включения окрашивания изотипического контроля, положительного и отрицательного контроля на последовательных тканевых срезах. Окрашенные слайды подвергали визуализации препарата целиком (Zeiss, Axioscan), и изображения препаратов целиком загружали и анализировали с помощью программного обеспечения Halo (Indica

Labs, Альбукерке, Нью-Мексико) с использованием предварительно запрограммированных инструментов анализа программного обеспечения для определения CD3+, CD4+, CD8+ и PD-L1+клеток (CytoNuclear v2.0.9) и для определения 4-1BB+ и PD-L2+ клеток (ISH v4.1.3). Количественные данные по CD3+, CD4+, CD8+ и PD-L1+клеткам впоследствии выражали как процент маркер-положительных клеток по отношению к общему количеству клеток. Количественные данные по 4-1BB+ и PD-L2+клеткам были выражены в виде H-показателей RNAscore путем создания четырех сегментов интенсивности RNAscore и расчета H-показателей по формуле: H-показатель=[(0 x % клеток с 0 точек/на клетку) + (1 x % клеток с 1-3 точками/на клетку) + (2 x % клеток с 4-9 точками/на клетку) + (3 x % клеток с 10-15 точками/на клетку) + (4 x % клеток с >15 точек/на клетку)].

Таблица 21. Антитела, используемые для иммуногистохимии

Мишень	Метка	Клон	Поставщик	Кат. по.
CD3	неконъюгированный	2GV6	Ventana	790-4341
CD4	неконъюгированный	EPR19514	Abcam	Ab183685
CD8 α	неконъюгированный	D4W2Z	Cell Signaling Technology	98941
PD-L1	неконъюгированный	D5V3B	Cell Signalling Technology	64988

Проточная цитометрия опухолевой ткани

Диссоциированные опухолевые клетки блокировали с помощью 1 мкг/мл мышиного BD Fc Block™ (буфер, блокирующий Fc; BD, кат. № 553141) при температуре 4С в темноте в течение 10 мин. Для окрашивания маркеров клеточной поверхности к клеткам добавляли флуоресцентно-меченую смесь антител, описанную в Таблице 22 (кроме Ki67 и GzmB), разведенных в буфере, блокирующем Fc, и инкубировали при 4°С в течение 30 минут, защищая от света. Для внутриклеточного окрашивания (Ki67 и GzmB) клетки пермеабилizировали путем инкубации с 200 мкл концентрата Fix/Perm (eBioscience, кат. № 00-5123), разведенного в буфере для разведения Fix/Perm (1:4; eBioscience, кат. № 00-5223) при комнатной температуре в течение 30 мин, в защищенном от света месте. После двукратной промывки в буфере для пермеабилizации (eBioscience, кат. № 00-8333), клетки инкубировали с антителами Ki67 и GzmB (таблицы 22), разведенными в буфере для пермеабилizации, при комнатной температуре в течение 30 минут, в защищенном от света месте. Наконец, клетки ресуспендировали в 250 мкл буфера FACS (PBS с добавлением 10% FBS [Gibco, кат., № 10099-141] и 40 мМ ЭДТА [Boston BioProducts, кат. BM-711-K]) и измеряли на клеточном анализаторе BD LSRFortessa™ X20 (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния, США). Данные анализировали с использованием программного обеспечения Kaluza Analysis.

Таблица 22. Антитела, используемые для проточной цитометрии

Мишень	Метка ¹	Клон	Поставщик	Кат. по.
CD45	BV785	30-F11	Biolegend	103149
CD3	BUV395	17A2	BD	740268

CD4	BV510	GK1.5	Biolegend	100449
CD8	PE-eFluor610	53-6.7	eBiosciences	61-0081-82
Ki67	PerCP/Cy5.5	SolA15	eBioscience	46-5698-82
GzmB	AF700	QA16A02	Biolegend	372222
Живые/мертвые	eFluor780	N/A	eBioscience	65-0865

Результаты и заключение

Срезы опухолевой ткани оценивали на предмет субпопуляций Т-клеток и целевой экспрессии с помощью иммуногистохимии (ИГХ) и гибридизации *in situ* (ISH) на 7 и 14 день после начала обработки (Фигура 17), а диссоциированные опухолевые ткани оценивали на предмет пролиферации Ki.67+ и GzmB+ цитотоксических внутриопухолевых CD8+ Т-клеток по данным проточной цитометрии на 7-й день после начала обработки (Фиг. 18).

Обработка mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB и анти-mPD-1 в качестве отдельных агентов повышала процент CD3+клеток в опухоли на 7-й и 14-й день после обработки. Комбинация mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB с анти-mPD-1 дополнительно увеличивала процент CD3+ клеток на 14-й день (Фигура 17А).

Никаких различий в процентном соотношении CD4+ клеток между группами обработки на 7-й день не наблюдалось. Напротив, процент CD4+ клеток был увеличен при обработке mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB и анти-mPD-1 в качестве отдельных агентов по сравнению с группой, получавшей PBS, на 14-й день и даже дополнительно увеличивался за счет комбинации mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB с анти-mPD-1 (Фигура 17В).

Процент CD8+клеток увеличивался при использовании mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB по сравнению с группой PBS как на 7-й, так и на 14-й день, но не при использовании анти-mPD-1. Комбинация mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB с анти-mPD-1 показала аналогичные уровни CD8+клеток по сравнению с mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB индивидуально, что позволяет предположить, что увеличение количества CD8+клеток было обусловлено mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB (Фигура 17С).

На 7-й и/или 14-й день внутриопухолевая экспрессия PD-L1 и PD-L2 повышалась под действием mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB и анти-mPD-1 в качестве отдельных агентов по сравнению с мышами, получавшими PBS. Напротив, комбинация mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB с анти-mPD-1 не показала такого увеличения, поскольку уровни внутриопухолевых PD-L1 и PD-L2 были сопоставимы с уровнями у мышей, получавших PBS. (Фигура 17D-E).

Наконец, на 7-й день опухолевая экспрессия 4-1BB увеличивалась при использовании mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB. Напротив, экспрессия 4-1BB снижалась при использовании анти-mPD-1 в качестве отдельного агента и в комбинации mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB с анти-mPD-1 на 14-й день (Фигура 17F).

В диссоциированных опухолевых тканях было обнаружено, что процент GzmB+ в общей внутриопухолевой популяции CD8+Т-клеток значительно увеличивался при комбинации mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB и анти-mPD-1 по сравнению с каждым отдельным

агентом (Фигура 18А), что указывает на повышенную цитотоксичность CD8+Т-клеток. Аналогичным образом, процент Ki67+ в общей популяции CD8+Т-клеток, инфильтрирующих опухоль, увеличивался при комбинации mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB и анти-mPD-1 по сравнению с каждым отдельным агентом, что позволяет предположить увеличение количества CD8+Т-клеточной пролиферации (Фигура 18В).

В совокупности, эти результаты позволяют предположить, что комбинация mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB и анти-mPD-1 приводит к четкой и взаимодополняющей модуляции иммунного контекста опухоли по сравнению с обработкой mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB или анти-mPD-1 в качестве отдельных агентов. В частности, более высокая частота пролиферирующих и цитотоксических CD8+ТIL в группе, получавшей mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB с комбинацией анти-PD1, указывает на усиление функциональных и эффекторных функций ТЛ, вероятно, связанных с улучшенной противоопухолевой активностью.

Пример 13: Анализ цитокинов в периферической крови мышей с опухолями MC38, обработанных комбинациями mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB с антителом против mPD-1.

Цель: изучить уровни цитокинов в периферической крови мышей C57BL/6 с опухолями MC38, обработанных mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB отдельно или в комбинации с антителом против mPD-1.

Методы

В эксперименте, описанном в Примере 11, образцы крови собирали у мышей C57BL/6, несущих опухоль MC38, в следующие моменты времени: День -1 (исходный уровень; за день до обработки первой дозой), День 2 (через 2 дня после первой дозы) и день 5 (через 2 дня после второй дозы) после начала обработки.

Цитокины анализировали в образцах плазмы методом электрохемилюминесценции (ECLIA) с использованием набора для мышей V-PLEX Proclaim Panel 1 (MSD LLC, кат. № K15048D-2) и набора для мышей V-PLEX Cytokine Panel 1 (MSD LLC, кат. № K15245D-2) на приборе MESO QuickPlex SQ 120 (MSD, LLC. R31QQ-3), согласно инструкции производителя.

Результаты

У мышей, получавших mIgG2a-ctrl-AAKR (5 мг/кг) или антитело против PD-1 мыши (анти-mPD-1; 10 мг/кг) в качестве отдельного агента, не наблюдалось или были незначительные изменения в уровнях IFN γ , TNF α , IL-2 и IP-10 на 2-й день или на 5-й день по сравнению с днем -1 (Фигура 19). У мышей, получавших mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB (5 мг/кг), уровни IFN γ , TNF α , IL-2 и IP-10 в плазме повышались на 2-й день и еще больше повышались на 5-й день. У мышей, получавших комбинацию mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB (5 мг/кг) и анти-mPD-1 (10 мг/кг), наблюдалось повышение уровней IFN γ , TNF α , IL-2 и IP-10 на 2-й день и/или на 5-й день относительно каждого отдельного агента (Фигура 19). На 5-й день уровни IFN γ , TNF α и IP-10 были более чем в 3 раза выше у мышей, получавших комбинацию mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB и анти-mPD-1, по сравнению как с mIgG2a-ctrl-AAKR, так и с группами, получавшими анти-PD-1, а уровни TNF α и IP-10 были в >1,48

раза выше по сравнению с группами, получавшими mbsIgG2-PD-L1×4-1BB (Таблица 23).

Эти результаты дают основание для оценки комбинации GEN1046 с антителом против PD-1 для дальнейшего усиления противоопухолевого иммунного ответа у онкологических больных.

Таблица 23. Кратное изменение уровней цитокинов в ответ на комбинацию mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB с анти-mPD-1 по сравнению с отдельными агентами

Цитокин	Сравниваемые группы обработки			Коэффициент изменений медианной кратности	
				день 2	день 5
IFN γ	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB+анти-mPD-1	vs	mIgG2a-ctrl-AAKR	1,77	3,39
IFN γ	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB+анти-mPD-1	vs	Анти-mPD-1	1,93	3,42
IFN γ	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB+анти-mPD-1	vs	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB	0,98	0,99
TNF α	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB+анти-mPD-1	vs	mIgG2a-ctrl-AAKR	3,07	3,56
TNF α	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB+анти-mPD-1	vs	Анти-mPD-1	2,59	3,44
TNF α	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB+анти-mPD-1	vs	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB	1,97	1,87
IL-2	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB+анти-mPD-1	vs	mIgG2a-ctrl-AAKR	2,66	1,85
IL-2	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB+анти-mPD-1	vs	Анти-mPD-1	2,87	2,87
IL-2	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB+анти-mPD-1	vs	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB	1,39	1,17
IP-10	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB+анти-mPD-1	vs	mIgG2a-ctrl-AAKR	3,54	6,41
IP-10	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB+анти-mPD-1	vs	Анти-mPD-1	4,70	4,94
IP-10	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB+анти-mPD-1	vs	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB	1,41	1,48

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Связывающий агент для применения в способе уменьшения или предотвращения прогрессирующей опухоли или лечения злокачественного новообразования у пациента, причем указанный способ включает введение указанному пациенту связывающего агента до, одновременно или после введения антитела, связывающегося с белком программируемой клеточной смерти-1 (PD-1), или его антигенсвязывающего фрагмента,

где

связывающий агент содержит первую связывающую область, связывающуюся с CD137, и вторую связывающую область, связывающуюся с PD-L1;

а) причем первая связывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно,

и

б) вторая антигенсвязывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL) содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно,

и

антитело, связывающееся с PD-1, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 43, 44 и 45, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно, или антитело, связывающееся с PD-1, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно.

2. Связывающий агент для применения по п. 1, где антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 49, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 50.

3. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 49, и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50.

4. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

5. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где антитело, связывающееся с PD-1, представляет собой пембролизумаб или его биоаналог.

6. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где PD-L1 представляет собой PD-L1 человека, в частности, PD-L1 человека, содержащий последовательность SEQ ID NO: 40, и/или CD137 представляет собой CD137 человека, в частности, CD137 человека, содержащий последовательность SEQ ID NO: 38.

7. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где первая связывающая область связывающего агента содержит варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или 9, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ. ID NO: 5 или 10.

8. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где вторая связывающая область связывающего агента содержит варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15.

9. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где первая связывающая область связывающего агента содержит варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или 9, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 10.

10. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где вторая связывающая область связывающего агента содержит варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

11. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где

а) первая связывающая область связывающего агента содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5;

и

б) вторая связывающая область связывающего агента содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

12. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент представляет собой полиспецифическое антитело, такое как биспецифическое антитело.

13. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент представлен в форме полноразмерного антитела или фрагмента антитела.

14. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где каждая переменная область содержит три области, определяющие комплементарность, (CDR1, CDR2 и CDR3), и четыре каркасные области (FR1, FR2, FR3 и FR4).

15. Связывающий агент для применения по п. 13, где указанные области, определяющие комплементарность, и указанные каркасные области расположены от аминоконца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

16. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент содержит

i) полипептид, содержащий, состоящий из или по существу состоящий из указанной переменной области первой тяжелой цепи (VH) и константной области первой тяжелой цепи (CH), и

ii) полипептид, содержащий, состоящий из или по существу состоящий из указанной переменной области второй тяжелой цепи (VH) и константной области второй тяжелой цепи (CH).

17. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент содержит

i) полипептид, содержащий указанную переменную область первой легкой цепи (VL) и дополнительно содержащий константную область первой легкой цепи (CL), и

ii) полипептид, содержащий указанную переменную область второй легкой цепи (VL) и дополнительно содержащий константную область второй легкой цепи (CL).

18. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент представляет собой антитело, содержащее первое связывающее плечо и второе связывающее плечо, где

первое связывающее плечо содержит

i) полипептид, содержащий указанную вариабельную область первой тяжелой цепи (VH) и константную область первой тяжелой цепи (CH), и

ii) полипептид, содержащий указанную вариабельную область первой легкой цепи (VL) и константную область первой легкой цепи (CL);

и второе связывающее плечо содержит

iii) полипептид, содержащий указанную вариабельную область второй тяжелой цепи (VH) и константную область второй тяжелой цепи (CH), и

iv) полипептид, содержащий указанную вариабельную область второй легкой цепи (VL) и константную область второй легкой цепи (CL).

19. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент содержит

i) первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную связываться с CD137, и

ii) вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную связываться PD-L1.

20. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где указанный связывающий агент содержит

i) первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную связываться с CD137, причем первая тяжелая цепь содержит константную область первой тяжелой цепи, а первая легкая цепь содержит константную область первой легкой цепи; и

ii) вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, содержащую указанную антигенсвязывающую область, способную связываться с PD-L1, причем вторая тяжелая цепь содержит константную область второй тяжелой цепи, и вторая легкая цепь содержит константную область второй легкой цепи.

21. Связывающий агент для применения по любому из пп. 16-20, где каждая из константных областей первой и второй тяжелой цепи (CH) содержит одну или более из константной области тяжелой цепи 1 (CH1), шарнирной области, константной области тяжелой цепи 2 (CH2) и константной области тяжелой цепи 3 (CH3), предпочтительно, по меньшей мере, шарнирную область, область CH2 и область CH3.

22. Связывающий агент для применения по любому из пп. 16-21, где каждая из константных областей первой и второй тяжелой цепи (CH) содержит область CH3, и где две области CH3 содержат асимметричные мутации.

23. Связывающий агент для применения по любому из пп. 16-21, где в указанной константной области первой тяжелой цепи (CH) по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU была заменена, и в указанной константной области второй тяжелой цепи (CH) по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению,

выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU была заменена, и где указанная первая и указанная вторая тяжелые цепи не заменены в одних и тех же положениях.

24. Связывающий агент для применения по п. 23, где (i) аминокислота в положении, соответствующем F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляет собой L в указанной константной области первой тяжелой цепи (CH), а аминокислота в положении, соответствующем K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляет собой R в указанной константной области второй тяжелой цепи (CH), или (ii) аминокислота в положении, соответствующем K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляет собой R в указанной первой тяжелой цепи, а аминокислота в положении, соответствующем F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляет собой L в указанной второй тяжелой цепи.

25. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где указанный связывающий агент индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с другим антителом, содержащим такие же первую и вторую антигенсвязывающие области и две константные области тяжелой цепи (CH), содержащие шарнирную область, области CH2 и CH3 IgG1 человека.

26. Связывающий агент для применения по п. 25, где указанные константные области первой и второй тяжелой цепи (CH) модифицированы так, что антитело индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с антителом, которое идентично, за исключением того, что оно содержит немодифицированные константные области первой и второй тяжелой цепи (CH).

27. Связывающий агент для применения по п. 26, где каждая из указанных немодифицированных константных областей первой и второй тяжелой цепи (CH) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19 или 25.

28. Связывающий агент для применения по п. 26 или 27, где указанную Fc-опосредованную эффекторную функцию измеряют путем связывания с Fcγ-рецепторами, связывания с C1q или индукции Fe-опосредованной перекрестной сшивки Fcγ-рецепторов.

29. Связывающий агент для применения по п. 28, где указанную Fc-опосредованную эффекторную функцию измеряют путем связывания с C1q.

30. Связывающий агент для применения по любому из пп. 25-29, где указанные константные области первой и второй тяжелой цепи модифицированы так, что связывание C1q с указанным антителом снижено по сравнению с антителом дикого типа, предпочтительно снижено по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100%, причем связывание C1q предпочтительно определяют с помощью ИФА.

31. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где по меньшей мере в одной из указанных константных областей первой и второй тяжелой цепи (CH) одна или более аминокислот в положениях, соответствующих положениям L234,

L235, D265, N297, и P331, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU не являются L, L, D, N и P, соответственно.

32. Связывающий агент для применения по п. 31, где положения, соответствующие положениям L234 и L235, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляют собой F и E, соответственно, в указанных первой и второй тяжелых цепях.

33. Связывающий агент для применения по п. 31 или 32, где положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляют собой F, E и A, соответственно, в указанных константных областях первой и второй тяжелой цепи (HC).

34. Связывающий агент для применения по любому из пп. 31-33, где положения, соответствующие положениям L234 и L235, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU обеих константных областей первой и второй тяжелой цепи представляют собой F и E, соответственно, и где (i) положение, соответствующее F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU константной области первой тяжелой цепи представляет собой L, а положение, соответствующее K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU второй тяжелой цепи представляет собой R, или (ii) положение, соответствующее K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU константной области первой тяжелой цепи представляет собой R, и положение, соответствующее F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU второй тяжелой цепи представляет собой L.

35. Связывающий агент для применения по любому из пп. 31-34, где положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU обеих константных областей первой и второй тяжелой цепи представляют собой F, E и A, соответственно, и где (i) положение, соответствующее F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU константной области первой тяжелой цепи представляет собой L, и положение, соответствующее K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU константной области второй тяжелой цепи представляет собой R, или (ii) положение, соответствующее K409, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU первой тяжелой цепи представляет собой R, и положение, соответствующее F405, в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU второй тяжелой цепи представляет собой L.

36. Связывающий агент для применения по любому из пп. 16-35, где константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

a) последовательности SEQ ID NO: 19 или 25 [IgG1-FC];

b) подпоследовательности последовательности в a), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в a); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 10 замен, как например, по большей мере 9 замен, по большей мере 8, по большей мере 7, по большей мере 6, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

37. Связывающий агент для применения по любому из пп. 16-36, где константная область указанной первой или второй тяжелой цепи, как например второй тяжелой цепи содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности SEQ ID NO: 20 или 26 [IgG1-F405L];

б) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 9 замен, как например, по большей мере 8, по большей мере 7, по большей мере 6, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

38. Связывающий агент для применения по любому из пп. 16-36, где константная область указанной первой или второй тяжелой цепи, как например, первой тяжелой цепи, содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности SEQ ID NO: 21 или 27 [IgG1-K409R];

б) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 10 замен, как например, по большей мере 9 замен, по большей мере 8, по большей мере 7, по большей мере 6, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

39. Связывающий агент для применения по любому из пп. 16-15, где константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности SEQ ID NO: 22 или 28 [IgG1-Fc_FEA];

б) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца

последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 7 замен, как например, по большей мере 6 замен, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

40. Связывающий агент для применения по любому из пп. 16-39, где константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи, как например второй тяжелой цепи, содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности SEQ ID NO: 24 или 30 [IgG1-Fc_FEAL];

б) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 6 замен, как например, по большей мере 5 замен, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

41. Связывающий агент для применения по любому из пп. 16-40, где константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи, как например, первой тяжелой цепи, содержит или по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности SEQ ID NO: 23 или 29 [IgG1-Fc_FEAR];

б) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 6 замен, как например, по большей мере 5 замен, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

42. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где указанный связывающий агент содержит константную область легкой цепи каппа (κ).

43. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где указанный связывающий агент содержит константную область легкой цепи лямбда (λ).

44. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где указанная константная область первой легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа (κ) или константную область легкой цепи лямбда (λ).

45. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где указанная константная область второй легкой цепи представляет собой константную

область легкой цепи лямбда (λ) или константную область легкой цепи каппа (κ).

46. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где указанная константная область первой легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа (κ), а указанная константная область второй легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи лямбда (λ), или указанная константная область первой легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи лямбда (λ), а указанная константная область второй легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа (κ).

47. Связывающий агент для применения по любому из пп. 42-46, где легкая цепь каппа (κ) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

а) последовательности SEQ ID NO:35,

б) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 10 замен, например по большей мере 9 замен, по большей мере 8, по большей мере 7, по большей мере 6, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

48. Связывающий агент для применения по любому из пп. 43-47, где легкая цепь лямбда (λ) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

а) последовательности SEQ ID NO: 36,

б) подпоследовательности последовательности в а), такой как подпоследовательность, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот удалены/были удалены, начиная с N-конца или C-конца последовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей по большей мере 10 замен, например по большей мере 9 замен, по большей мере 8, по большей мере 7, по большей мере 6, по большей мере 5, по большей мере 4, по большей мере 3, по большей мере 2 замены или по большей мере 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

49. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

50. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент представляет собой полноразмерное антитело IgG1.

51. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где

связывающий агент представляет собой антитело аллотипа IgG1m(f).

52. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент содержит

i) первую тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную связываться с CD137, где первая тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 31, и первая легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 32;

ii) вторую тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную связываться с PD-L1, где вторая тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 33, и вторая легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 34.

53. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент представляет собой акасунлимаб или его биоаналог.

54. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент находится в композиции или составе, содержащем гистидин, сахарозу и полисорбат-80, и имеет pH от 5 до 6.

55. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент находится в композиции или составе, содержащем примерно 20 мМ гистидина, примерно 250 мМ сахарозы, примерно 0,02% полисорбата-80, и имеет pH примерно 5,5.

56. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент находится в композиции или составе, содержащем 10-30 мг связывающего агента/мл, как например 20 мг связывающего агента/мл.

57. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент находится в композиции, как определено по любому из пп. 54-56, и перед введением его разбавляют в 0,9% NaCl (в физрастворе).

58. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где пациентом является человек.

59. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где опухоль или злокачественное новообразование представляет собой солидную опухоль или злокачественное новообразование.

60. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где указанная опухоль представляет собой PD-L1-положительную опухоль.

61. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где опухоль или злокачественное новообразование выбраны из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака легких (например, немелкоклеточного рака легких (NSCLC)), колоректального рака, рака головы и шеи, рака желудка, рака молочной железы, рака почки, уротелиального рака, рака мочевого пузыря, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака печени, тимомы и карциномы тимуса, рака головного мозга, глиомы, аденокарциномы, рака щитовидной железы, других видов рака

кожи, саркомы, множественной миеломы, лейкоза, лимфомы, миелодиспластических синдромов, рака эндометрия, рака предстательной железы, рака полового члена, рак шейки матки, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, карциномы клеток Меркеля и мезотелиомы.

62. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где опухоль или злокачественное новообразование выбраны из группы, состоящей из рака легких (например, немелкоклеточного рака легких (NSCLC), уротелиального рака (рак мочевого пузыря, мочеточника, уретры или почечной лоханки), рака эндометрия (EC), рака молочной железы (например, трижды негативного рака молочной железы (TNBC)) и плоскоклеточного рака головы и шеи (SCCHN) (например, рака полости рта, глотки или гортани).

63. Связывающий агент для применения по п. 61 или 62, где опухоль или злокачественное новообразование представляет собой рак легких, в частности немелкоклеточный рак легких (NSCLC), такой как плоскоклеточный или неплоскоклеточный NSCLC.

64. Связывающий агент для применения по любому из пп. 61-63, где опухоль или злокачественное новообразование являются метастатическими, как например, метастатический NSCLC.

65. Связывающий агент для применения по пп. 61-64, где рак легких, в частности NSCLC, не имеет мутации, сенсibiliзирующей эпидермальный фактор роста (EGFR), и/или транслокации/реарранжировки ROS1 анапластической лимфомы (ALK).

66. Связывающий агент для применения по любому из пп. 61-65, где рак легких, в частности NSCLC, включает клетки злокачественного новообразования, и PD-L1 экспрессируется в $\geq 1\%$ клеток злокачественного новообразования или опухоли, например по оценке иммуногистохимии (ИГХ).

67. Связывающий агент для применения по п. 66, где рак легких, в частности NSCLC, включает клетки злокачественного новообразования, и PD-L1 экспрессируется в 1% - 49% клеток злокачественного новообразования или опухолевых клеток, например по оценке иммуногистохимии (ИГХ).

68. Связывающий агент для применения по п. 66, где рак легких, в частности NSCLC, включает клетки злокачественного новообразования, и PD-L1 экспрессируется в $\geq 50\%$ клеток злокачественного новообразования или опухолевых клеток, например по оценке иммуногистохимии (ИГХ).

69. Связывающий агент для применения по предыдущим пп., где пациент ранее не получал системного лечения метастатического заболевания.

70. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где пациент ранее не получал лечения ингибитором контрольной точки; например, ингибитором PD-1 или ингибитором PD-L1, таким как антитело против PD-1 или антитело против PD-L1.

71. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где

пациент ранее не получал лечение с использованием агента, нацеленного на 4-1BB (CD137), такого как антитело против 4-1BB (CD137), с использованием противоопухолевой вакцины, или с использованием аутологичной клеточной иммунотерапии.

72. Связывающий агент для применения по любому из пп. 1-68, где опухоль или злокачественное новообразование рецидивируют и/или являются резистентными после лечения, такого как системное лечение с использованием ингибитора контрольной точки.

73. Связывающий агент для применения по любому из пп. 1-68 и 72, где пациент получал по меньшей мере 1 предшествующую линию системной терапии, такой как системная терапия, включающая ингибитор PD-1 или ингибитор PD-L1, такой как антитело против PD-1 или антитело против PD-L1.

74. Связывающий агент для применения по любому из пп. 1-68, 72 и 73, где злокачественное новообразование или опухоль рецидивируют и/или являются резистентными, или у пациента наблюдается прогрессирование после лечения ингибитором PD-1 или ингибитором PD-L1, таким как антитело против PD-1 или антитело против PD-L1, причем ингибитор PD-1 или ингибитор PD-L1 вводят в виде монотерапии или как часть комбинированной терапии.

75. Связывающий агент для применения по любому из пп. 1-68 и 72-74, где последнее предшествующее лечение проводили ингибитором PD1 или ингибитором PD-L1, таким как антитело против PD-1 или антитело против PD-L1, причем ингибитор PD-1 или ингибитор PD-L1 вводят в виде монотерапии или как часть комбинированной терапии.

76. Связывающий агент для применения по любому из пп. 1-68 и 72-74, где время с момента прогрессирования при последнем лечении ингибитором PD1 или ингибитором PD-L1, таким как антитело против PD-1 или антитело против PD- L1, составляет 8 месяцев или меньше, например 7 месяцев или меньше, 6 месяцев или меньше, 5 месяцев или меньше, 4 месяца или меньше, 3 месяца или меньше, 2 месяца или меньше, 1 месяц или меньше, 3 недели или меньше или например, 2 недели или меньше.

77. Связывающий агент для применения по любому из пп. 1-68 и 72-74, где время с момента последнего введения ингибитора PD1 или ингибитора PD-L1, такого как антитело против PD-1 или антитело против PD-L1, как части последнего предшествующего лечения составляет 8 месяцев или меньше, например, 7 месяцев или меньше, 6 месяцев или меньше, 5 месяцев или меньше, 4 месяца или меньше, 3 месяца или меньше, 2 месяца или меньше, 1 месяц или меньше, 3 недели или меньше или например 2 недели или меньше.

78. Связывающий агент для применения по любому из пп. 1-68 и 72-74, где злокачественное новообразование или опухоль рецидивируют и/или являются резистентными, или у пациента наблюдается прогрессирование во время или после

i) химиотерапии с платиновым дублетом после лечения антителом против PD-1 или антителом против PD-L1, или

ii) лечения антителом против PD-1 или антителом против PD-L1 после химиотерапии с платиновым дублетом.

79. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где пациент не получал предшествующего лечения таксановым химиотерапевтическим агентом, например, доцетакселом, как например, предшествующего лечения NSCLC таксановым химиотерапевтическим агентом, например, доцетакселом.

80. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент и антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент вводят по меньшей мере в одном курсе лечения, причем каждый курс лечения составляет три недели (21 дней) или шесть недель (42 дня).

81. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где одну дозу связывающего агента и одну дозу антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента вводят каждые три недели (1Q3W).

82. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где одну дозу связывающего агента и одну дозу антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента вводят каждые шесть недель (1Q6W).

83. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где одну дозу связывающего агента и одну дозу антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, вводят в первый день каждого курса лечения.

84. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где количество указанного связывающего агента, вводимое в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, составляет 100 мг.

85. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где количество указанного антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, вводимое в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, составляет 200 мг.

86. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где количество указанного антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, вводимое в каждой дозе и/или в каждом курсе лечения, составляет 400 мг.

87. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где дозу 100 мг связывающего агента и дозу 200 мг антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента вводят каждые три недели (1Q3W).

88. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где дозу 100 мг связывающего агента и дозу 400 мг антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента вводят каждые шесть недель (1Q6W).

89. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где опухоль или злокачественное новообразование представляет собой NSCLC; и где дозу 100 мг связывающего агента, которым является акасунлимаб или его биоаналог, и дозу 200 мг антитела, связывающегося с PD-1, которое представляет собой пемболизумаб, вводят каждые три недели (1Q3W), например, в первый день каждого трехнедельного курса лечения.

90. Связывающий агент для применения по любому из пп. 1-88, где опухоль или злокачественное новообразование представляет собой NSCLC; и где дозу 100 мг связывающего агента, которым является аказунлимаб или его биоаналог, и дозу 400 мг антитела, связывающегося с PD-1, которым является пемболизумаб, вводят каждые шесть недель (1Q6W), например, в первый день каждого шестинедельного курса лечения.

91. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где сначала вводят антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, а затем связывающий агент.

92. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент вводят посредством внутривенной (IV) инфузии в течение минимум 30 минут, например, в течение минимум 60 минут.

93. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где связывающий агент вводят посредством внутривенной (IV) инфузии в течение 30 минут.

94. Связывающий агент для применения по любому из предыдущих пп., где ингибитор PD-1 вводят в виде внутривенной инфузии в течение 30 минут.

95. Набор, содержащий

(i) связывающий агент, содержащий первую связывающую область, связывающуюся с CD137, и вторую связывающую область, связывающуюся с PD-L1

а) причем первая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно,

б) вторая антигенсвязывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно,

и

(ii) антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 43, 44 и 45, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно, или антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно.

96. Набор по п. 95, где связывающий агент и/или антитело, связывающееся с PD-1,

или его антигенсвязывающий фрагмент является таким, как определено по любому из пп. 1-94.

97. Набор по п. 95 или 96, где связывающий агент и антитело, связывающееся с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент предназначены для системного введения, в частности, для инъекции или инфузии, такой как внутривенная инъекция или инфузия.

98. Набор по любому из пп. 95-97 для применения в способе уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли или лечения злокачественного новообразования у пациента.

99. Набор для применения по п. 98, где опухоль или злокачественное новообразование, и/или пациент, и/или способ такие, как определено по любому из пп. 1-94.

100. Способ уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли или лечения злокачественного новообразования у пациента, причем указанный способ включает введение указанному пациенту связывающего агента до, одновременно или после введения антитела, связывающегося с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента,

где связывающий агент содержит первую связывающую область, связывающуюся с CD137, и вторую связывающую область, связывающуюся с PD-L1.

с) причем первая связывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно,

и

d) вторая антигенсвязывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно,

и

где антитело, связывающееся с PD-1, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 43, 44 и 45, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно, или антитело, связывающееся с PD-1, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно.

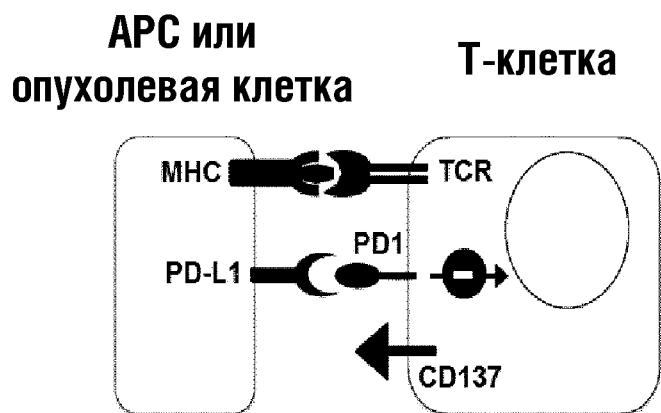
101. Способ по п. 100, где опухоль или злокачественное новообразование, и/или

пациент, и/или способ, и/или связывающий агент, и/или ингибитор PD-1 соответствует/соответствуют любому из пп. 1-94.

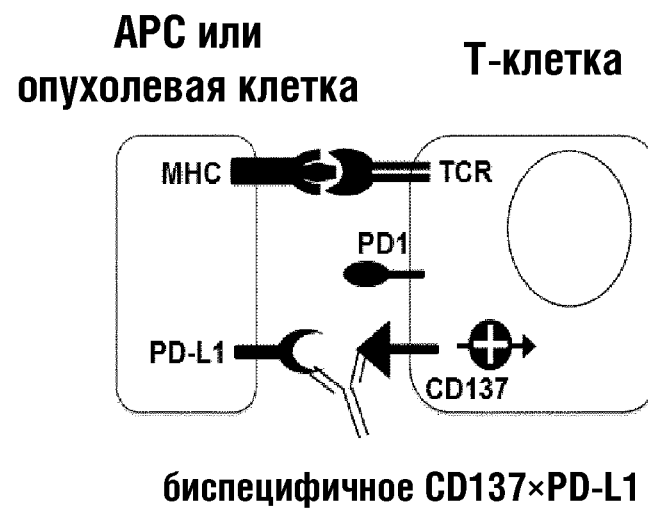
По доверенности

ФИГ.1

A. PD1-опосредованное ингибирование Т-клеток

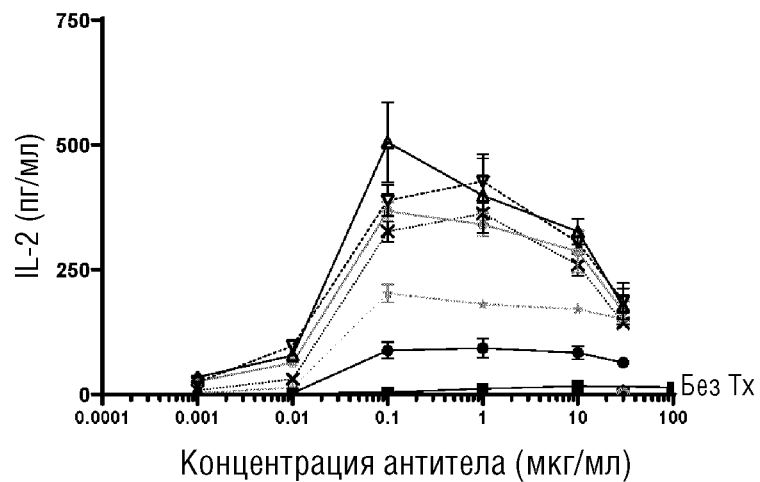


B. PD-L1-блокада + стимуляция Т-клеток

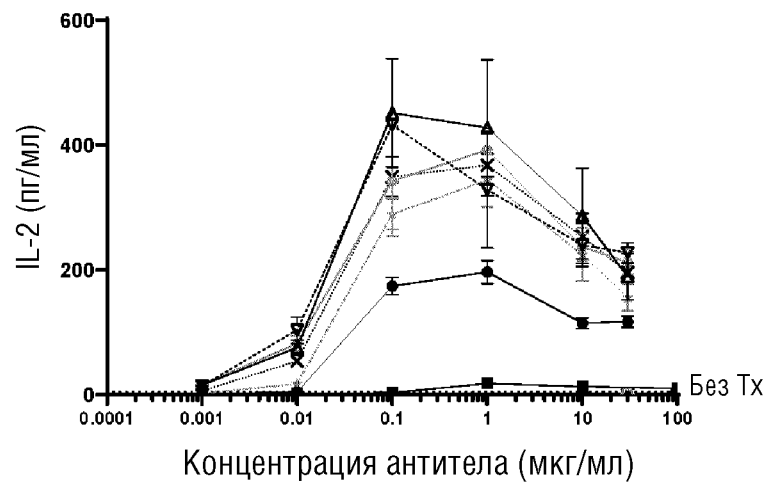


ФИГ.2

Пара доноров 1



Пара доноров 2



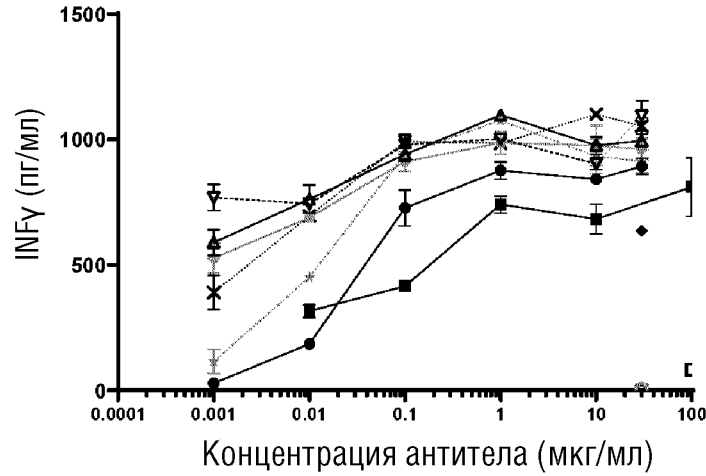
Пара доноров 3



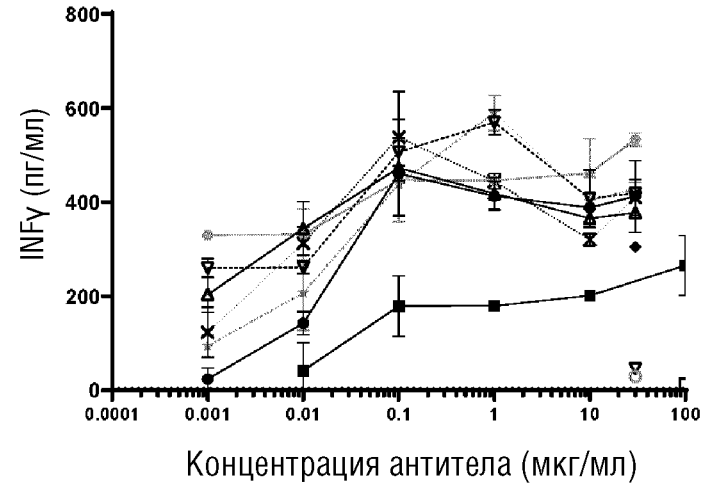
- GEN1046
- Пембролизумаб
- IgG1-ctrl-FEAL
- ▽ bslgG1-ctrlx4-1BB
- ◆ bslgG1-PD-L1xctrl
- IgG4
- ▲ GEN1046+ 100 мкг/мл Пембролизумаб
- ▽ GEN1046 + 10 мкг/мл Пембролизумаб
- GEN1046 + 1 мкг/мл Пембролизумаб
- × GEN1046 + 0.1 мкг/мл Пембролизумаб
- ☆ GEN1046 + 0.01 мкг/мл Пембролизумаб

ФИГ.3

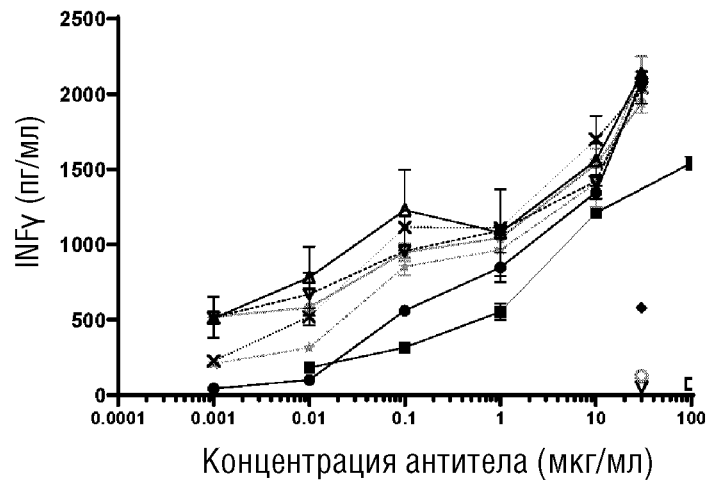
DC: LS 11 69636, CC00936
T:LS 11 69584B, CC00481



DC: LS 24 18861, 58355
T:LS 11 69584B, CC00481

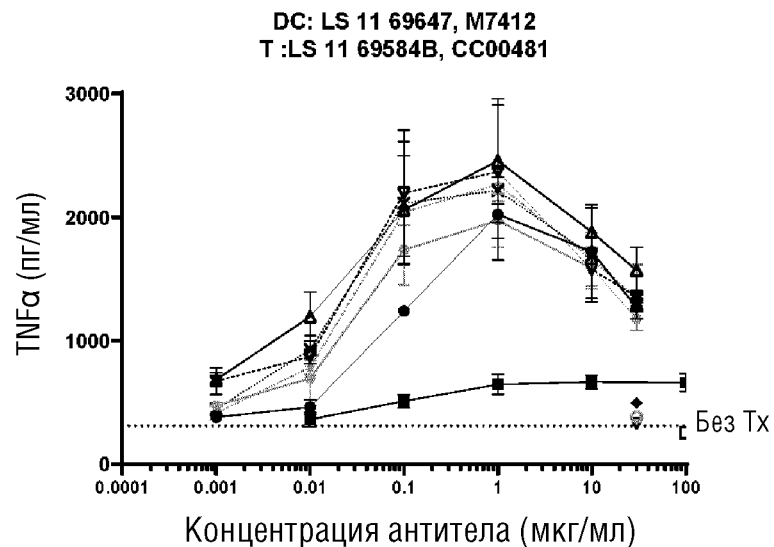
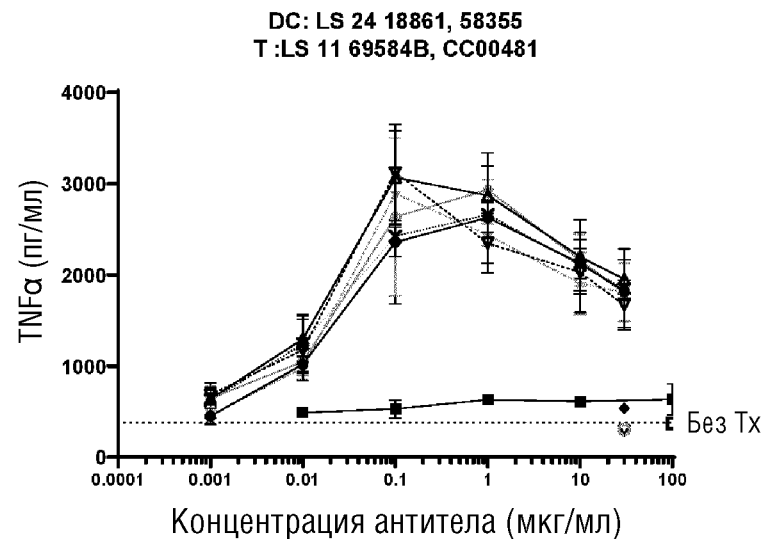
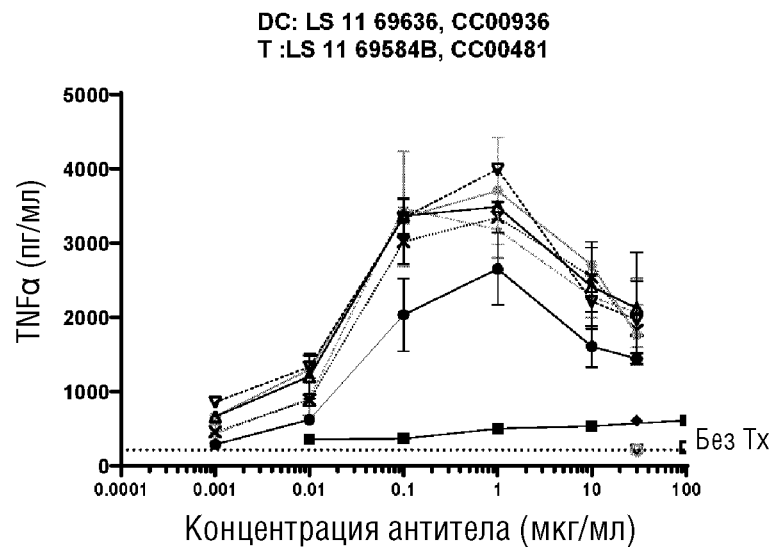


DC: LS 11 69647, M7412
T:LS 11 69584B, CC00481



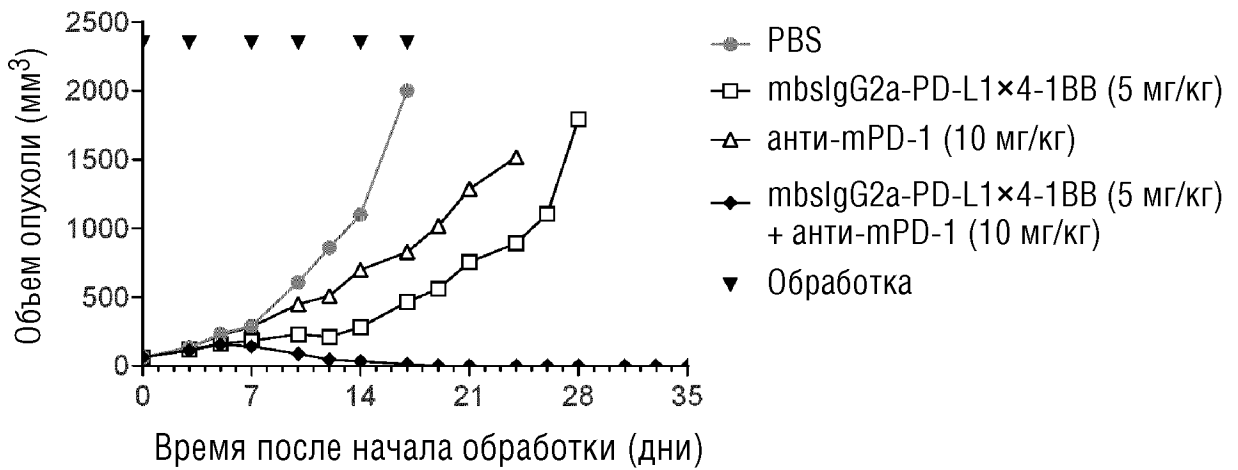
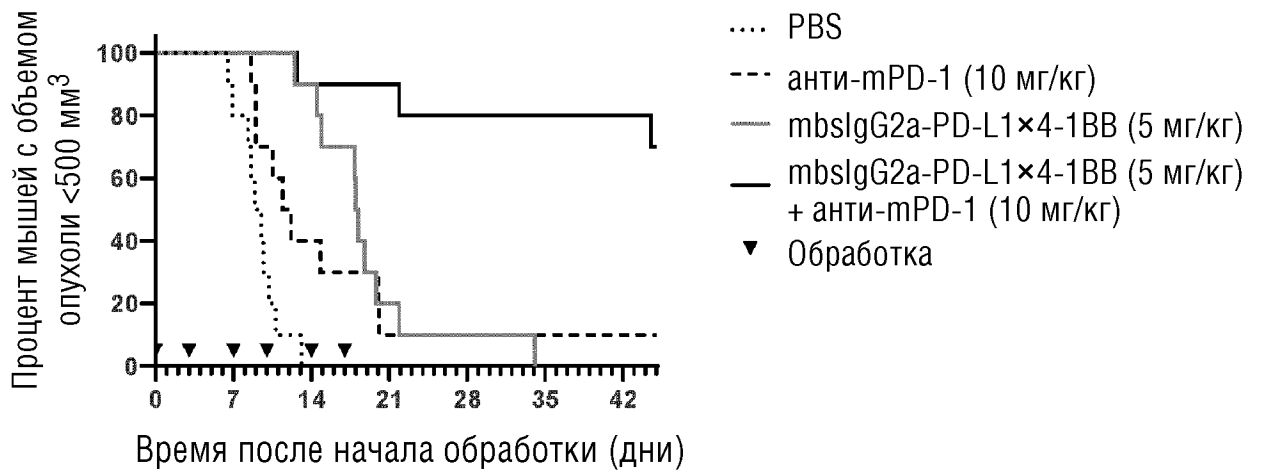
- GEN1046
- Пембролизумаб
- IgG1-ctrl-FEAL
- ▼ bsIgG1-ctrlx4-1BB
- ◆ bsIgG1-PD-L1xctrl
- IgG4
- ▲ GEN1046+ 100 мкг/мл Пембролизумаб
- ▽ GEN1046 + 10 мкг/мл Пембролизумаб
- GEN1046 + 1 мкг/мл Пембролизумаб
- × GEN1046 + 0.1 мкг/мл Пембролизумаб
- ☆ GEN1046 + 0.01 мкг/мл Пембролизумаб

ФИГ.4



- GEN1046
- Пембролизумаб
- IgG1-ctrl-FEAL
- ▽ bslgG1-ctrlx4-1BB
- ◆ bslgG1-PD-L1xctrl
- IgG4
- ▲ GEN1046+ 100 мкг/мл Пембролизумаб
- ▼ GEN1046 + 10 мкг/мл Пембролизумаб
- ⊙ GEN1046 + 1 мкг/мл Пембролизумаб
- ⊗ GEN1046 + 0.1 мкг/мл Пембролизумаб
- ☆ GEN1046 + 0.01 мкг/мл Пембролизумаб

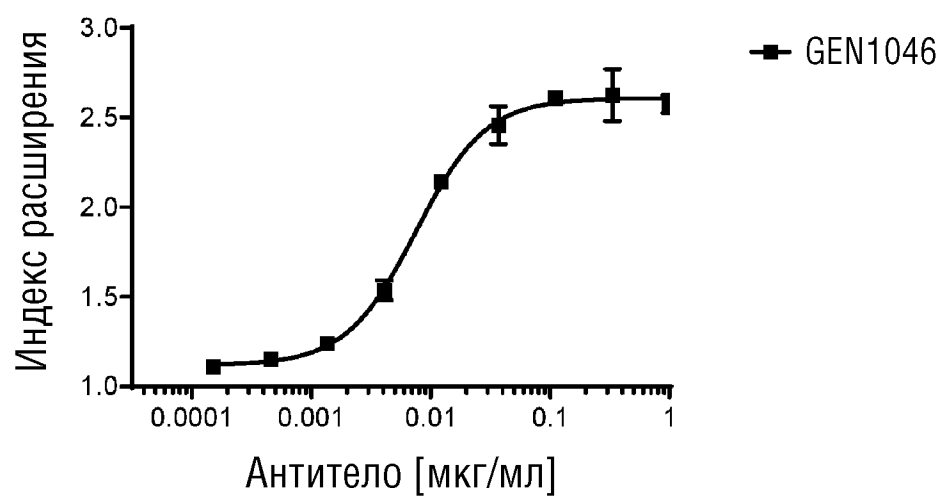
ФИГ.5

А. Медианный объем опухоли**В. Выживаемость без прогрессирования**

ФИГ.6

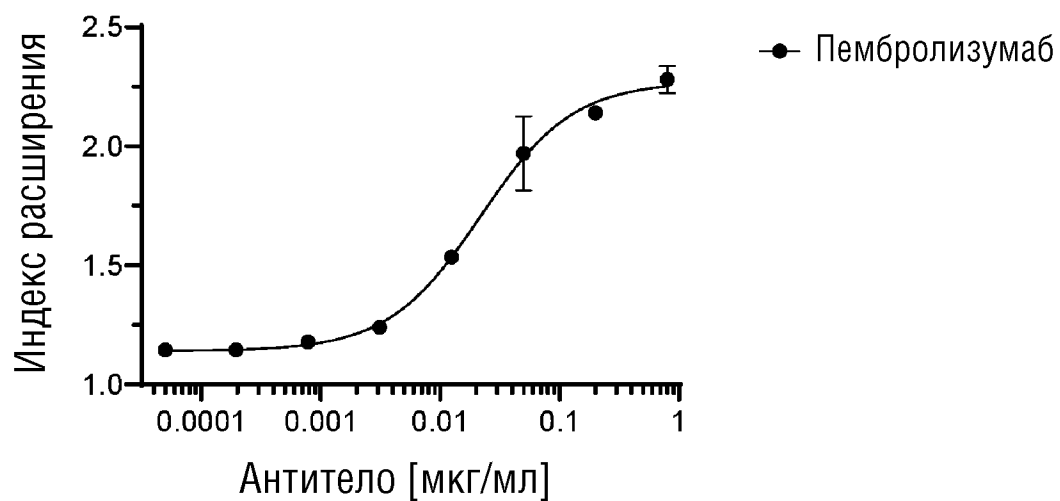
А

Донор 28

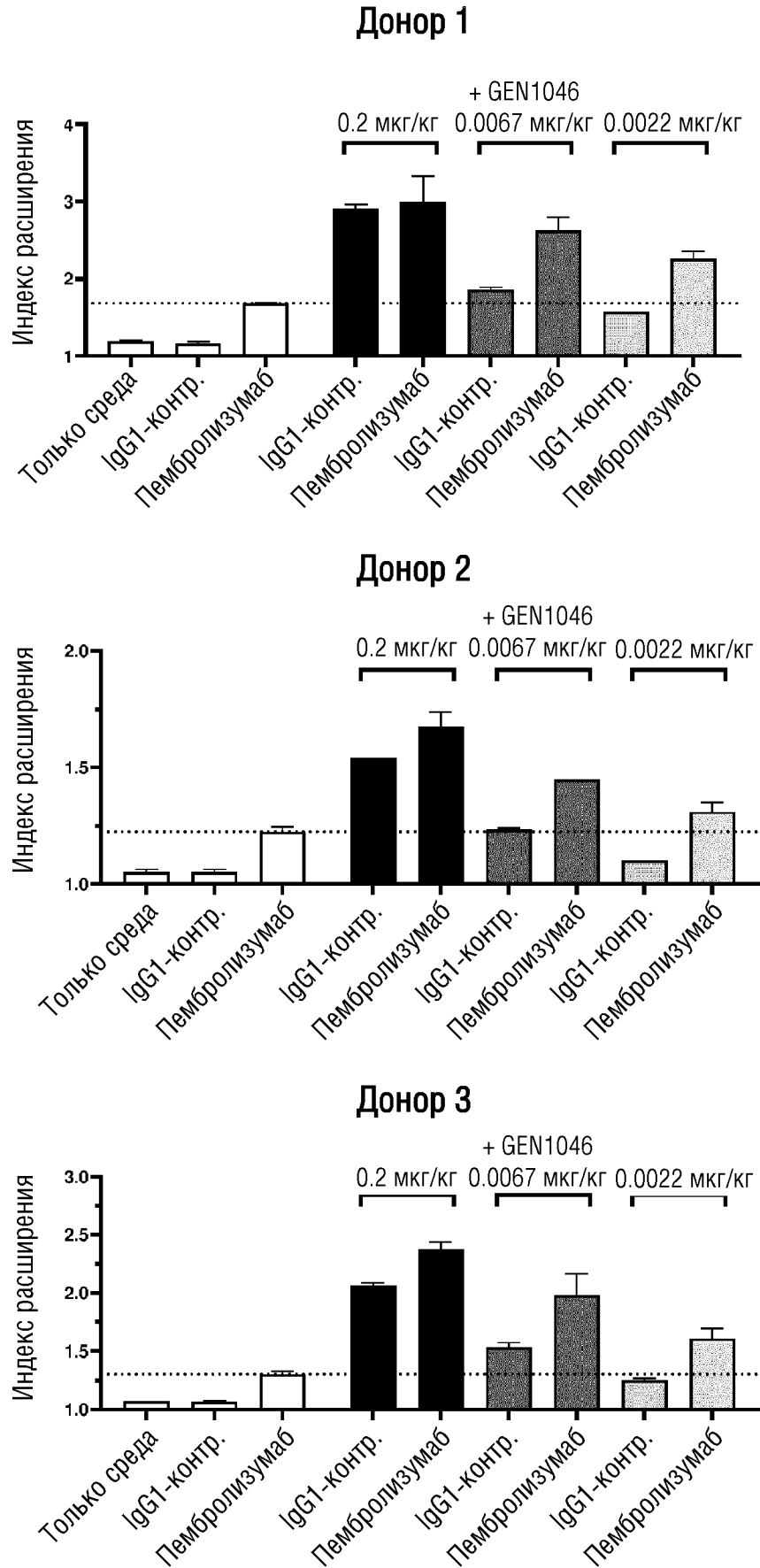


В

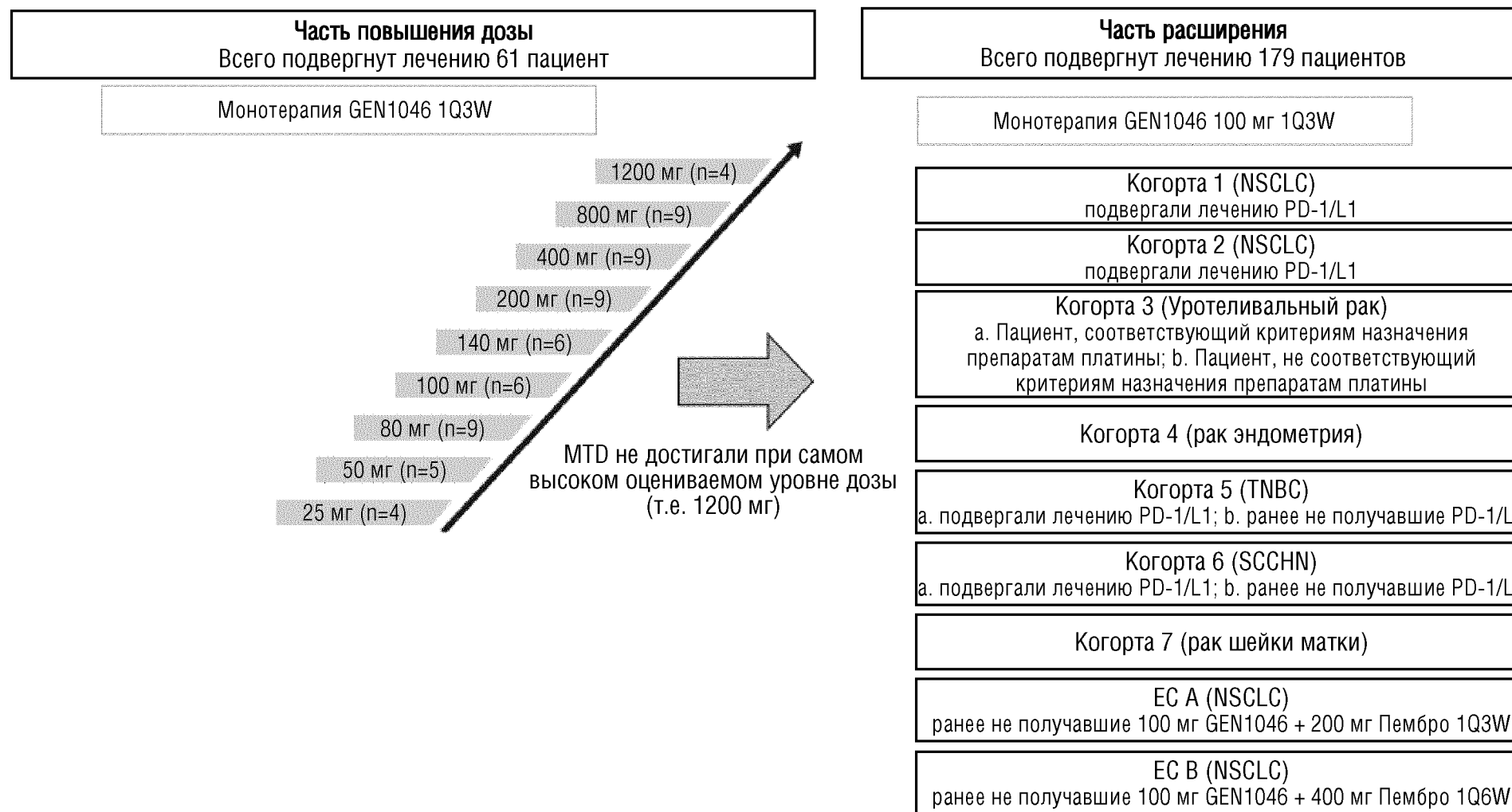
Донор 26268_В



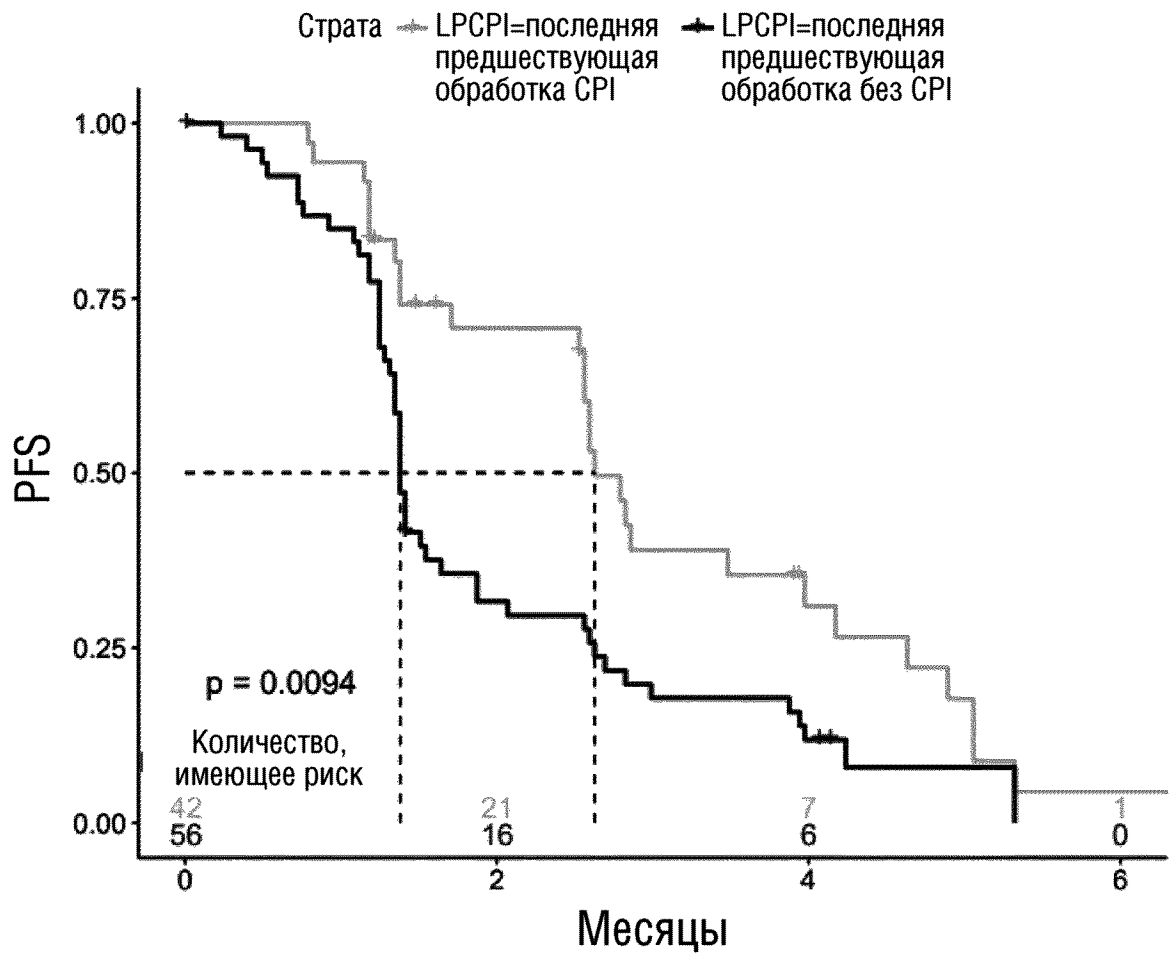
ФИГ.7



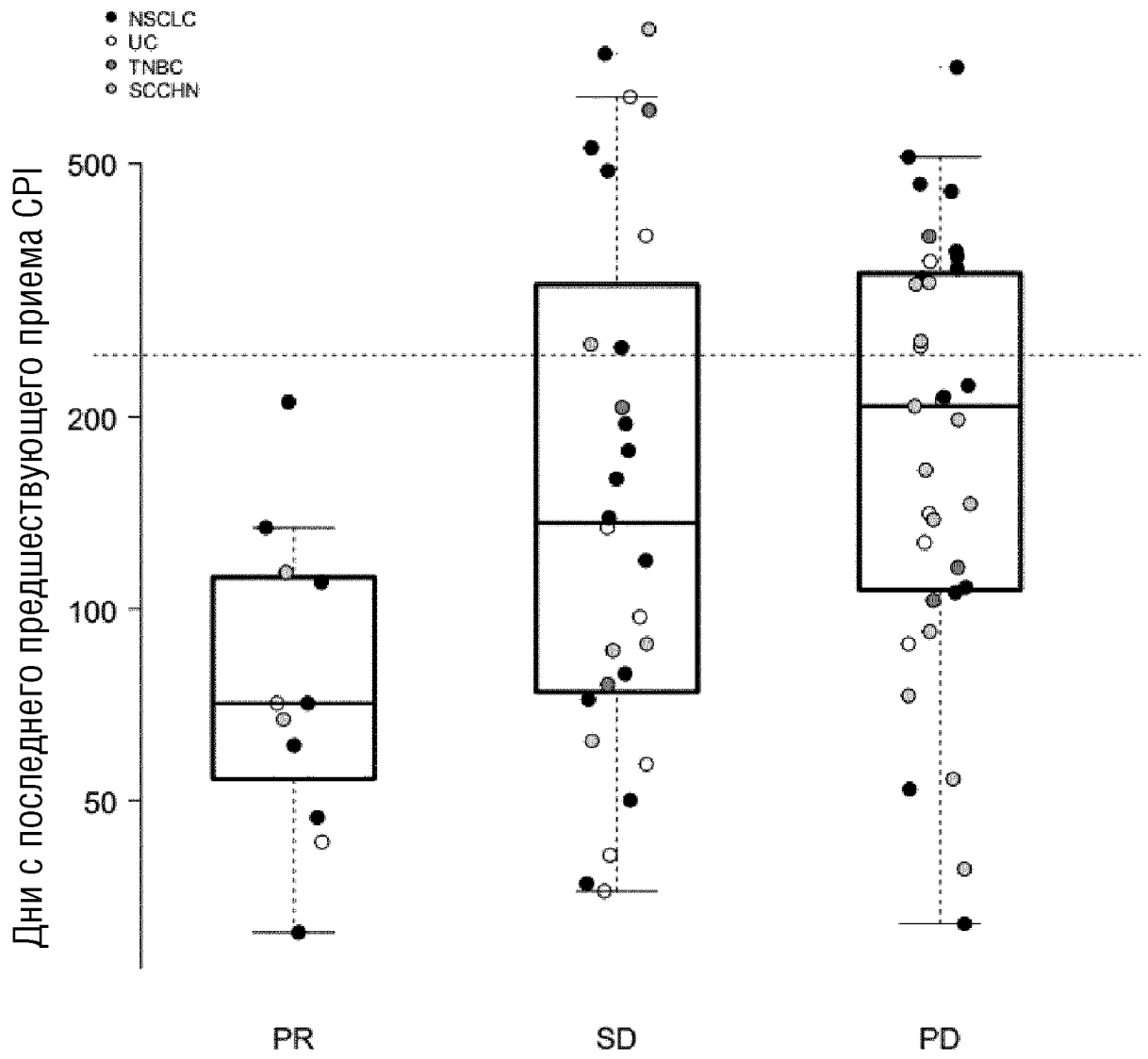
ФИГ.8



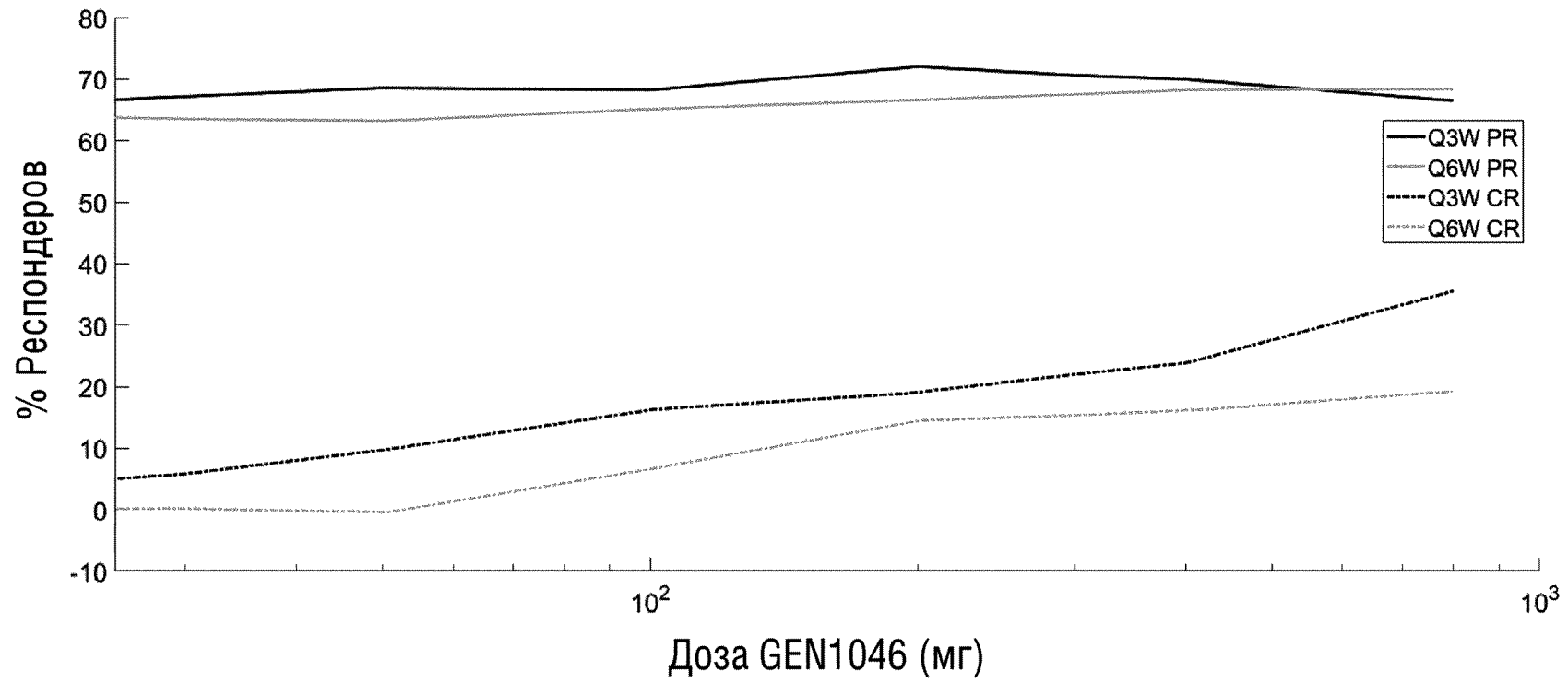
ФИГ.9



ФИГ.10

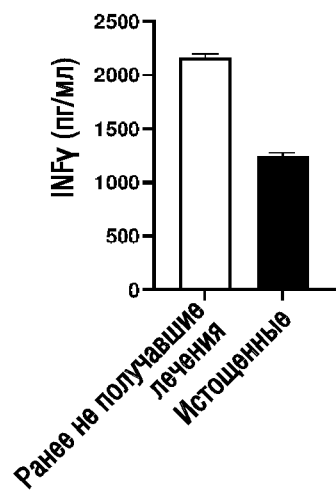


ФИГ.11

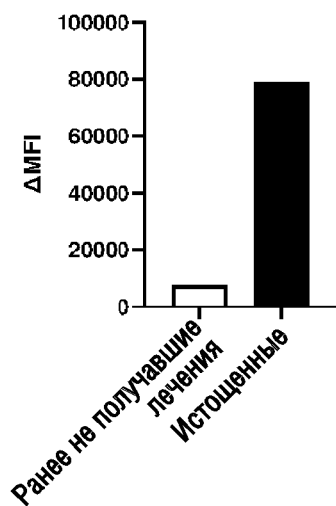


ФИГ.12

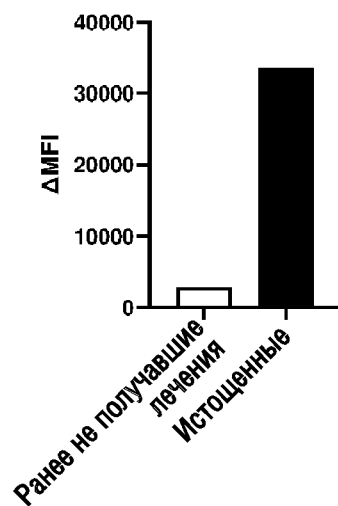
А. Стимуляция CD3/CD28



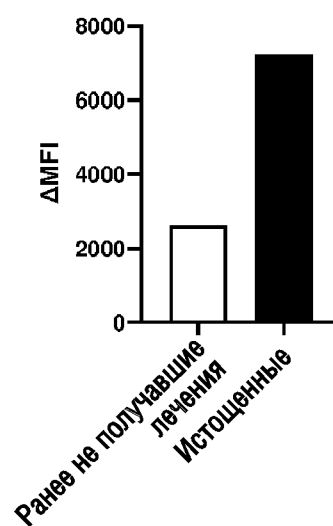
В. TIM3



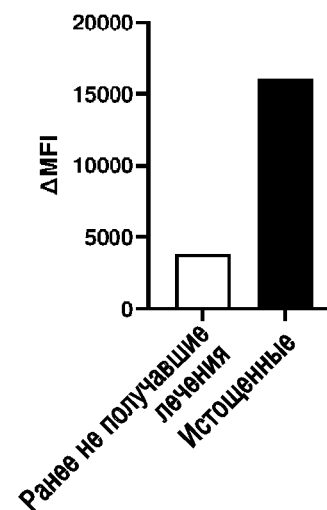
LAG3



PD-1

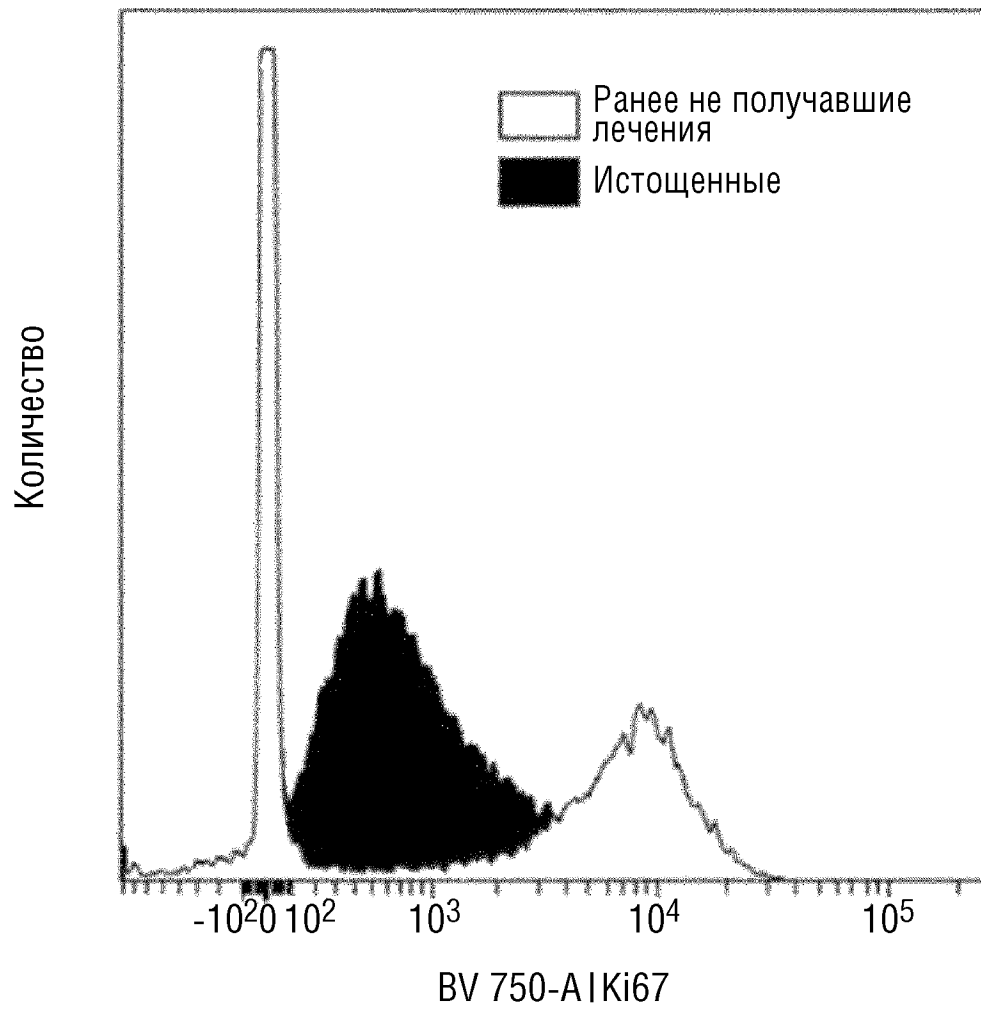


4-1BB

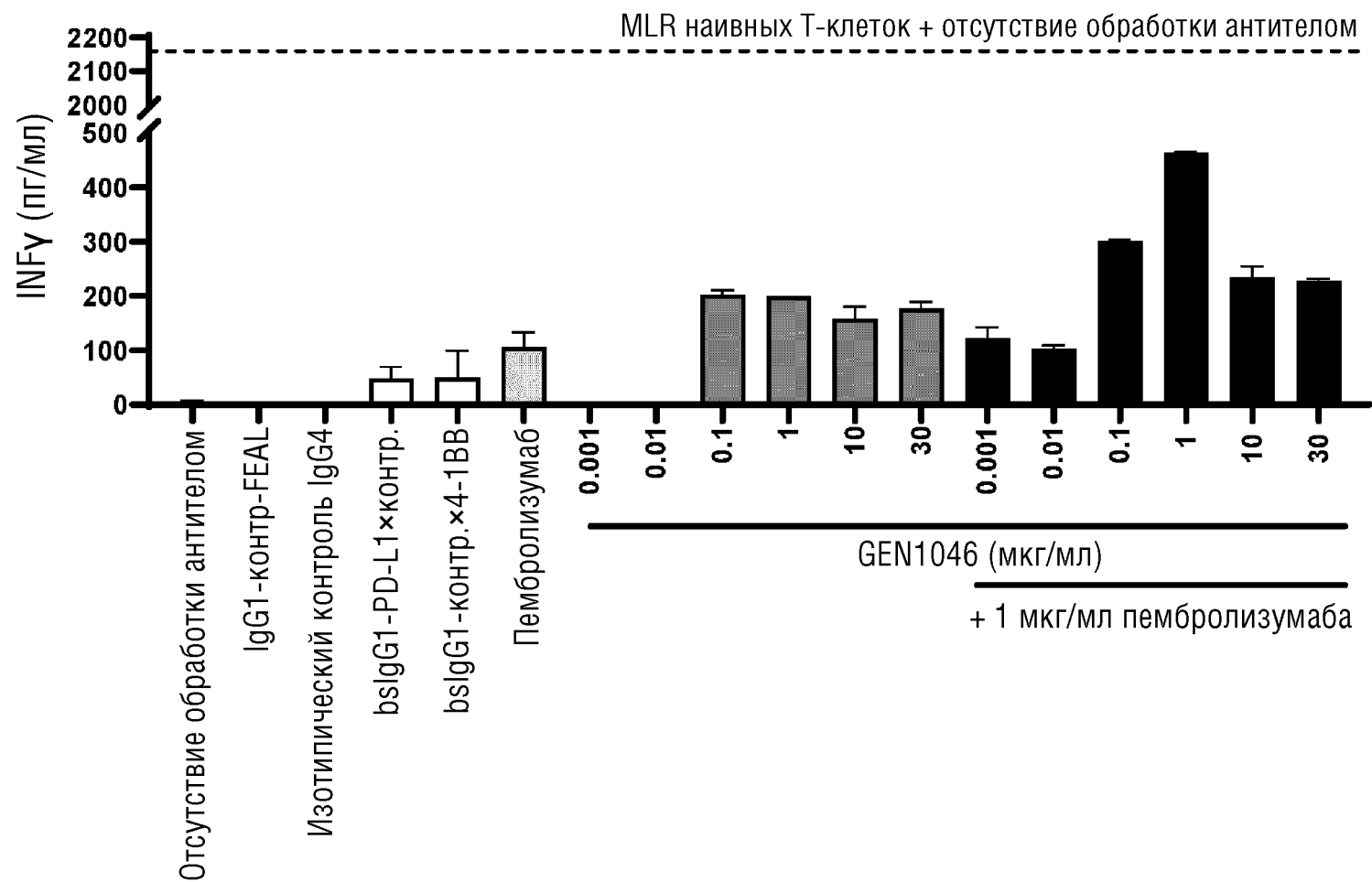


ФИГ.12, продолжение

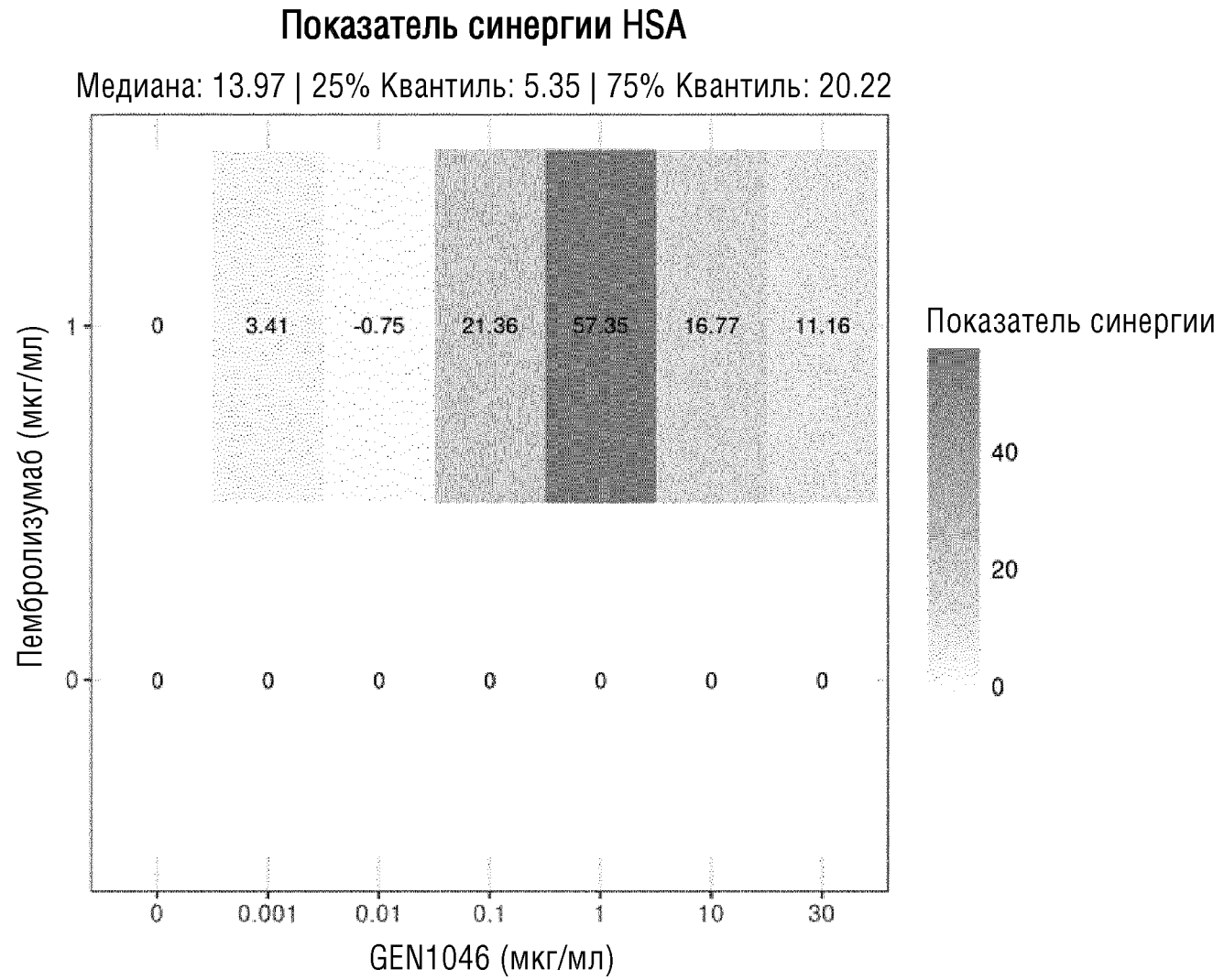
с.



ФИГ.13

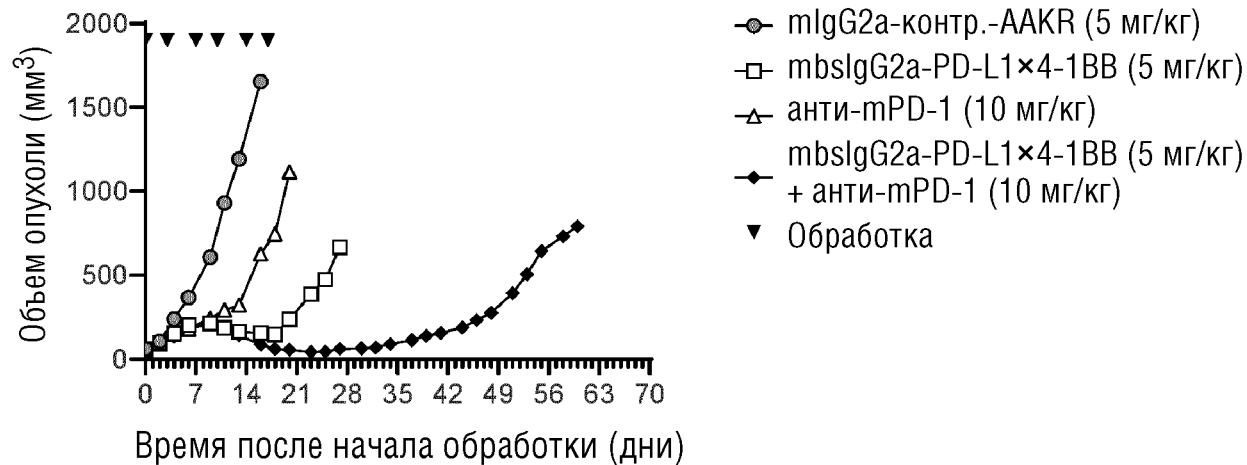


ФИГ.14

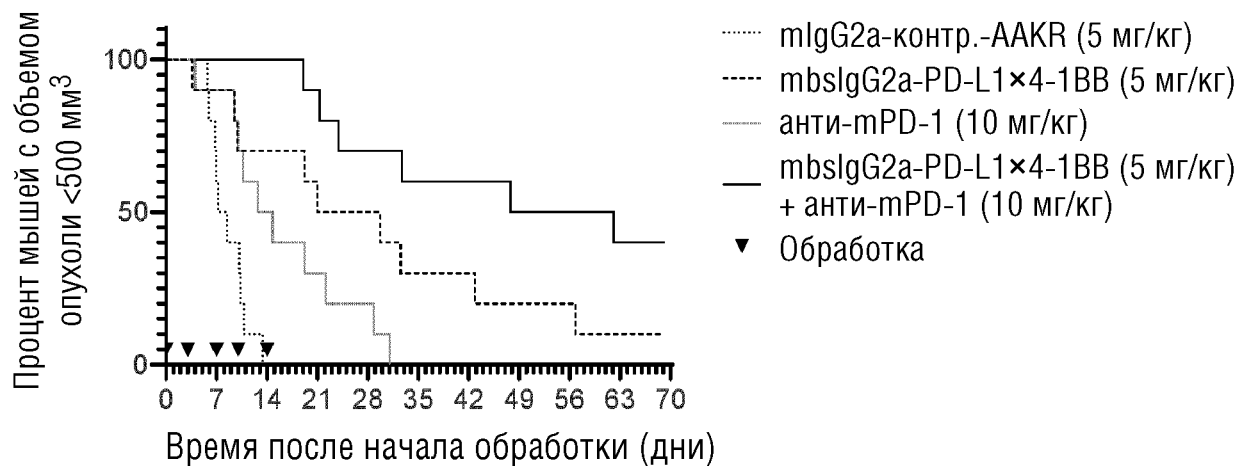


ФИГ.15

А. Медианный объем опухоли

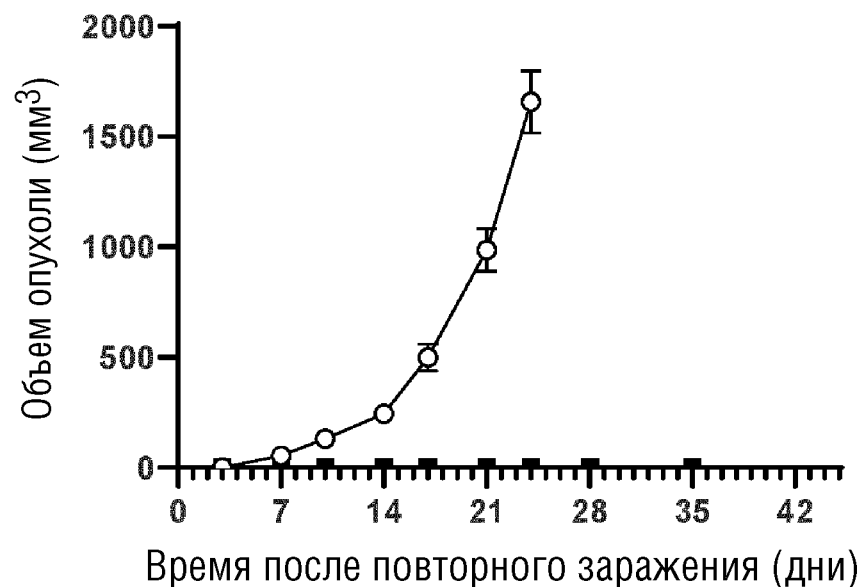


В. Выживаемость без прогрессирования



ФИГ.16

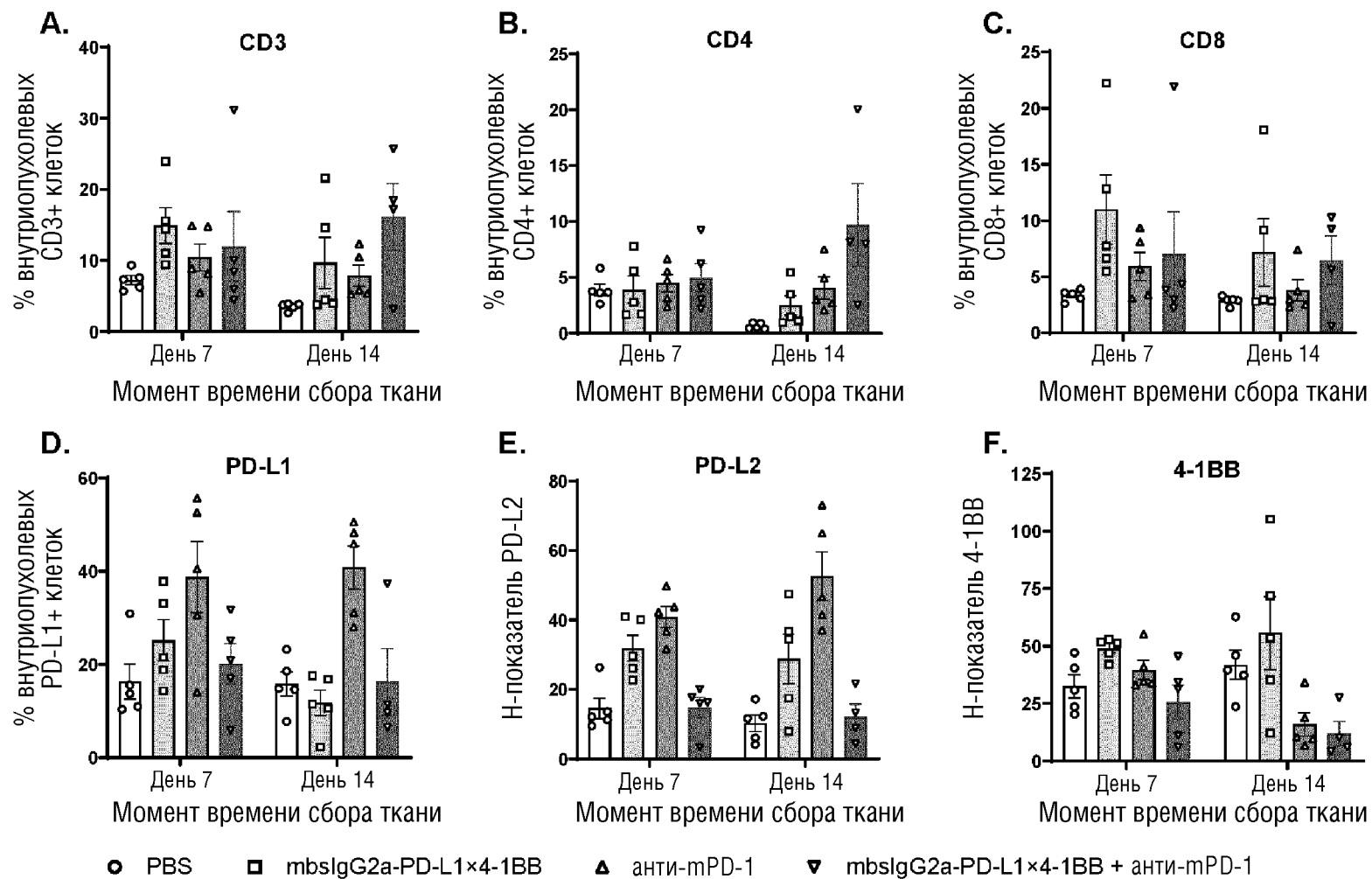
Повторное заражение мышей CR
с использованием опухолевых клеток MC38



○ Мыши, не получавшие обработки (n=6)

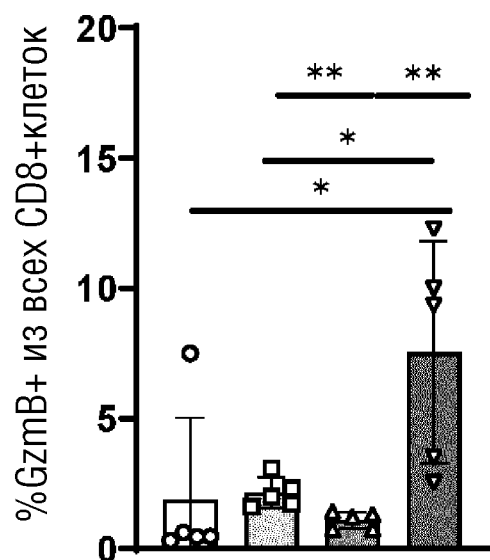
■ Повторное заражение мышей CR (n=4): mbslgG2a-PD-L1×4-1BB (5 мг/кг) + анти-mPD-1 (10 мг/кг)

ФИГ.17

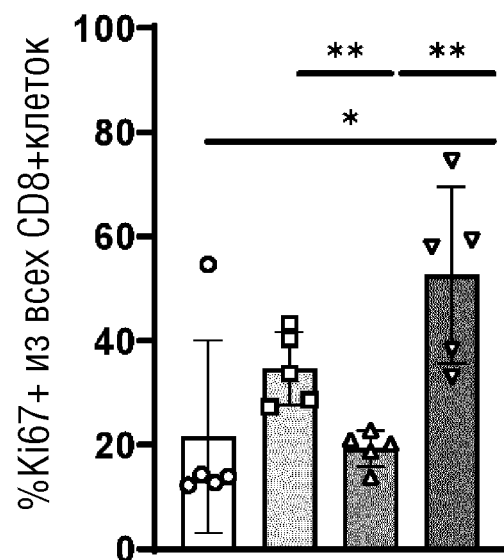


ФИГ.18

A. %GzmB+ CD8



B. %Ki67+ CD8



- PBS
- mbsIgG2a-PD-L1x4-1BB
- ▲ анти-mPD-1
- ▼ mbsIgG2a-PD-L1x4-1BB + анти-mPD-1

ФИГ.19

