



(51) МПК  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*A61K 39/3955* (2020.02); *A61P 35/00* (2020.02); *C07K 16/2878* (2020.02); *C07K 2317/565* (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019116731, 05.01.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
05.01.2018

Дата регистрации:  
06.07.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
06.01.2017 US 62/443,281

(45) Опубликовано: 06.07.2020 Бюл. № 19

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 30.05.2019

(86) Заявка РСТ:  
IB 2018/000043 (05.01.2018)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2018/127787 (12.07.2018)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО  
"Юридическая фирма Городиский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):

КВОН, Бионг С. (KR),  
ЛИ, Сеонг-Дзоо (KR),  
КИМ, Янг Хо (KR),  
ОХ, Хо-Сик (KR),  
ЛИ, Дзоонг Вон (KR)

(73) Патентообладатель(и):

ЮТАЙЛЕКС КО., ЛТД. (KR)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: US 7932045 B2, 26.04.2011. US  
6458934 B1, 01.10.2002. RU 2551963 C2,  
10.06.2015. MURILLO et al. Therapeutic  
antitumor efficacy of anti-CD137 agonistic  
monoclonal antibody in mouse models of  
myeloma, Clin Cancer Res., 2008, vol.14(21),  
pp.6895-6906. FISHER T.S. et al., Targeting of 4-  
1BB by monoclonal antibody PF-05082566  
enhances T-cell function (см. прод.)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ 4-1ВВ ЧЕЛОВЕКА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Предложено антитело против 4-1ВВ человека и его антигенсвязывающий фрагмент. Изобретение также относится к фармацевтической композиции для лечения злокачественного новообразования, содержащей антитело против 4-1ВВ человека или его фрагмент. Антитело по изобретению обладает улучшенными свойствами относительно

референсного антитела против 4-1ВВ человека, например улучшенной аффинностью связывания, улучшенной индукцией пролиферации Т-клеток и секреции ИФН $\gamma$  Т-клетками, а также улучшенной способностью снижать или устранять пролиферацию злокачественного новообразования in vivo. 2 н. и 12 з.п. ф-лы, 22 ил., 7 табл., 5 пр.

(56) (продолжение):

and promotes anti-tumor activity, Cancer Immunology, Immunotherapy, 2012, vol.61, no.10, pp.1721-1733.

RU 2 725 811 C1

RU 2 725 811 C1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 39/3955 (2020.02); A61P 35/00 (2020.02); C07K 16/2878 (2020.02); C07K 2317/565 (2020.02)*(21)(22) Application: **2019116731, 05.01.2018**(24) Effective date for property rights:  
**05.01.2018**Registration date:  
**06.07.2020**

Priority:

(30) Convention priority:  
**06.01.2017 US 62/443,281**(45) Date of publication: **06.07.2020** Bull. № 19(85) Commencement of national phase: **30.05.2019**(86) PCT application:  
**IB 2018/000043 (05.01.2018)**(87) PCT publication:  
**WO 2018/127787 (12.07.2018)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO  
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**KWON, Byoung S. (KR),  
LEE, Seoung-Joo (KR),  
KIM, Young Ho (KR),  
OH, Ho-Sik (KR),  
LEE, Joong Won (KR)**

(73) Proprietor(s):

**EUTILEX CO., LTD. (KR)**(54) **ANTI-HUMAN 4-1BB ANTIBODIES AND USE THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology. Presented is anti-human 4-1BB antibody and its antigen-binding fragment. Invention also relates to a pharmaceutical composition for treating a malignant neoplasm containing anti-human 4-1BB antibody or a fragment thereof.

EFFECT: antibody of the invention has improved properties relative to the reference human anti-human 4-1BB antibody, that is improved binding affinity, improved induction of T-cell proliferation and IFN $\gamma$  secretion by T-cells, as well as improved capacity to reduce or eliminate malignant growth in vivo.

14 cl, 22 dwg, 7 tbl, 5 ex

**ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[1] По настоящей заявке испрашивается приоритет патентной заявки США № 62/443281, зарегистрированной 6 января 2017 года, описание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

**УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[2] Злокачественные новообразования остаются одной из основных причин смерти по всему миру. Согласно недавней статистике, 13% населения мира умирает от злокачественных новообразований. По оценкам Международного агентства по изучению рака (IARC) в 2012 году было 14,1 миллионов новых случаев злокачественных новообразований и 8,2 миллионов случаев гибели от злокачественных новообразований по всему миру. Ожидают, что к 2030 году глобальное бремя заболеваний вырастет до 21,7 миллионов новых случаев злокачественных новообразований и 13 миллионов случаев гибели от злокачественных новообразований из-за роста и старения популяции и воздействия факторов риска, таких как курение, неправильное питание и гиподинамия. Кроме того, боль и медицинские затраты на лечение злокачественных опухолей вызывают снижение качества жизни пациентов со злокачественными новообразованиями и их семей. Очевидно, что, прежде всего, злокачественные новообразования являются заболеваниями, для которых необходимо срочно найти улучшенные способы лечения.

**СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[3] Настоящее изобретение относится, в частности, к антителам и их фрагментам, связывающимся с полипептидом 4-1BB человека. В некоторых аспектах антитела против 4-1BB человека и их фрагменты по изобретению являются вариантами референсного антитела против 4-1BB человека, имеющими один или несколько конкретных структурных признаков, не обнаруживаемых в референсном антителе против 4-1BB человека. В настоящем изобретении предусмотрено, что варианты антител против 4-1BB человека по изобретению обладают улучшенными свойствами относительно референсного антитела против 4-1BB человека, у которого отсутствуют один или несколько структурных признаков, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитела против 4-1BB человека и их фрагменты по изобретению обладают одним или несколькими улучшенными свойствами, такими как, например, улучшенная аффинность связывания, улучшенная индукция пролиферации Т-клеток (например, пролиферация CD8<sup>+</sup> Т-клеток), повышенная способность индуцировать продукцию ИФН $\gamma$  Т-клетками (например, пролиферация CD8<sup>+</sup> Т-клеток), улучшенная способность снижать и/или устранять пролиферацию злокачественного новообразования *in vivo* (например, в более низкой дозе).

[4] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает 1, 2 или 3 последовательности CDR тяжелой цепи, представляющие собой или включающие последовательность SEQ ID NO:5-8. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает одну или несколько из: CDR1 тяжелой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID NO:5, CDR2 тяжелой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID NO:6, и CDR3 тяжелой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID NO:7 или 8. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает каждую из: CDR1 тяжелой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID NO:5, CDR2 тяжелой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID NO:6, и CDR3 тяжелой цепи, представляющей собой или включающей

последовательность SEQ ID NO:7 или 8.

[5] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает 1, 2 или 3 последовательности CDR легкой цепи, представляющие собой или включающие последовательность SEQ ID NO: 1-4. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает один или несколько из: CDR1 легкой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID NO:1, CDR2 легкой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR3 легкой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID NO:3 или 4. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает каждую из: CDR1 легкой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID NO:1, CDR2 легкой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID NO:2, и CDR3 легкой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID NO:3 или 4.

[6] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает переменный домен тяжелой цепи, включающий CDR1 тяжелой цепи, представляющую собой или включающую последовательность SEQ ID NO:5, CDR2 тяжелой цепи, представляющую собой или включающую последовательность SEQ ID NO:6, и CDR3 тяжелой цепи, представляющую собой или включающую последовательность SEQ ID NO:7 или 8, и/или переменный домен легкой цепи, включающий CDR1 легкой цепи, представляющую собой или включающую последовательность SEQ ID NO:1, CDR2 легкой цепи, представляющую собой или включающую последовательность SEQ ID NO:2, и CDR3 легкой цепи, представляющую собой или включающую последовательность SEQ ID NO:4.

[7] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает переменный домен тяжелой цепи, включающий каркасную область 1 (FR1) тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO:16 или 17. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает переменный домен тяжелой цепи, включающий каркасную область 3 (FR3) тяжелой цепи, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO:18-20. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает переменный домен тяжелой цепи, включающий каркасную область 1 (FR1) тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO:16 или 17, и каркасную область 3 (FR3) тяжелой цепи, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO:18-20.

[8] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела имеет значительную гомологию по отношению к антителу или фрагменту антитела, включающему переменный домен тяжелой цепи, представляющий собой или включающий последовательность, выбранную из SEQ ID NO:11-14. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает переменный домен тяжелой цепи, представляющий собой или включающий последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4% или 99,5% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO:11-14. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает переменный домен тяжелой цепи, представляющий собой или включающий последовательность, выбранную из SEQ ID NO:11-14.

[9] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела имеет значительную гомологию по отношению к антителу или фрагменту антитела, включающему вариабельный домен легкой цепи, представляющий собой или включающий последовательность SEQ ID NO:9 или 10. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает вариабельный домен легкой цепи, представляющий собой или включающий последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4% или 99,5% идентичную последовательности SEQ ID NO:9 или 10. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает вариабельный домен легкой цепи, представляющий собой или включающий последовательность SEQ ID NO:9 или 10.

[10] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела имеет значительную гомологию по отношению к антителу или фрагменту антитела, включающему вариабельный домен тяжелой цепи, представляющий собой или включающий последовательность, выбранную из SEQ ID NO:11-14, и вариабельный домен легкой цепи, представляющий собой или включающий последовательность SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает вариабельный домен тяжелой цепи, представляющий собой или включающий последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4% или 99,5% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO:11-14, и вариабельный домен легкой цепи, представляющий собой или включающий последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4% или 99,5% идентичную последовательности SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает вариабельный домен тяжелой цепи, представляющий собой или включающий последовательность, выбранную из SEQ ID NO:11-14, и вариабельный домен легкой цепи, представляющий собой или включающий последовательность SEQ ID NO:10.

[11] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека по изобретению или его фрагмент является агонистическим антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека по изобретению или его фрагмент отличается лучшей агонистической активностью, чем гуманизированное антитело против 4-1BB человека 94G1 (то есть, антитело, включающее вариабельные домены легкой цепи и тяжелой цепи SEQ ID NO:9 и 11, соответственно). В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека по изобретению или его фрагмент отличается улучшенной аффинностью связывания по сравнению с гуманизированным антителом против 4-1BB человека 94G1 (то есть, антителом, включающим вариабельные домены легкой цепи и тяжелой цепи SEQ ID NO:9 и 11, соответственно).

[12] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека по изобретению или его фрагмент представляет собой или содержит гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека по изобретению или его фрагмент включает константный домен иммуноглобулина человека, где константный домен выбран из IgG1 или его варианта, IgG2 или его варианта, IgG4 или его варианта, IgA или его варианта, IgE или его варианта, IgM или его варианта и IgD или его варианта. В некоторых вариантах осуществления антитело

против 4-1ВВ человека по изобретению или его фрагмент представляет собой или содержит IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления IgG1 представляет собой или содержит последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO:22 или 23.

5 [13] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека по изобретению или его фрагмент является моноклональным антителом.

[14] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека по изобретению или его фрагмент является полноразмерным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека по изобретению или его  
10 фрагмент является Fab-фрагментом, Fab'-фрагментом, F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом, Fv-фрагментом, Fv-фрагментом, соединенным дисульфидными связями, scFv-фрагментом, однодоменным антителом, Humabody, нанотелом или диателом.

[15] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека по изобретению или его фрагмент имеет аффинность связывания ( $K_D$ ) с молекулой 4-1ВВ  
15 человека от  $1 \times 10^{-7}$  до  $1 \times 10^{-12}$  М. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека по изобретению или его фрагмент имеет аффинность связывания ( $K_D$ ) с молекулой 4-1ВВ человека от  $1 \times 10^{-8}$  до  $1 \times 10^{-12}$  М. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека по изобретению или его фрагмент  
20 имеет аффинность связывания ( $K_D$ ) с молекулой 4-1ВВ человека от  $1 \times 10^{-9}$  до  $1 \times 10^{-12}$  М. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека по изобретению или его фрагмент имеет аффинность связывания ( $K_D$ ) с молекулой 4-1ВВ человека от  $1 \times 10^{-10}$  до  $1 \times 10^{-12}$  М.

25 [16] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека по изобретению или его фрагмент связывается с эпитопом во внеклеточном домене полипептида 4-1ВВ человека. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека по изобретению или его фрагмент связывается с эпитопом во внеклеточном домене 4-1ВВ человека. В некоторых вариантах осуществления связывание  
30 антитела против 4-1ВВ человека по изобретению или его фрагмента устранено в результате одной или нескольких мутаций в положениях N30, D38, N39 и R41 SEQ ID NO:44.

[17] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека по изобретению или его фрагмент не связывается или слабо связывается с  
35 непринадлежащим примату полипептидом 4-1ВВ. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека по изобретению или его фрагмент не связывается или слабо связывается с полипептидом 4-1ВВ собаки.

[18] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитело против 4-1ВВ или  
40 антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к векторам, включающим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, включающим вектор и/или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело  
45 против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин выбрана из клетки бактерии, дрожжей, насекомого или млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка выбрана из группы, состоящей из *E. coli*, *P. pastoris*, Sf9, COS, HEK293, CHO и лимфоцита млекопитающего.

[19] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим нуклеиновую кислоту и/или вектор, кодирующий антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель.

[20] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения индивида, включающим введение индивидууму композиции, содержащей, или с помощью которой доставляют, антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения индивида, включающим введение индивидууму композиции, содержащей, или с помощью которой доставляют, нуклеиновую кислоту и/или вектор, кодирующий антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет злокачественное новообразование или риск развития злокачественного новообразования.

[21] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам индукции иммунного ответа у индивида, включающим введение индивидууму композиции, содержащей, или с помощью которой доставляют, антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам индукции иммунного ответа у индивида, включающим введение индивидууму композиции, содержащей, или с помощью которой доставляют, нуклеиновую кислоту и/или вектор, кодирующий антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет злокачественное новообразование или риск развития злокачественного новообразования.

[22] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам повышения иммунного ответа у индивида, включающим введение индивидууму композиции, содержащей, или с помощью которой доставляют, антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам повышения иммунного ответа у индивида, включающим введение индивидууму композиции, содержащей, или с помощью которой доставляют, нуклеиновую кислоту и/или вектор, кодирующий антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет злокачественное новообразование или риск развития злокачественного новообразования.

[23] В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование у индивидуума, подлежащее лечению способом по настоящему изобретению, выбрано из рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака шейки матки, рака толстого кишечника, рака эндометрия, рака пищевода, рака маточной трубы, рака желчного пузыря, злокачественного новообразования желудочно-кишечного тракта, рака головы и шеи, гемобластома, рака гортани, рака печени, рака легких, лимфомы, меланомы, мезотелиомы, рака яичников, первичного рака брюшины, рака слюнных желез, саркомы, рака желудка, рака щитовидной железы, рака поджелудочной железы и рака предстательной железы.

[24] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит, или с помощью нее доставляют, антитело против 4-1BB человека по изобретению или его

антигенсвязывающий фрагмент в дозе от 0,01 мг/кг до 100 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит, или с помощью нее доставляют, антитело против 4-1ВВ человека или его антигенсвязывающий фрагмент в дозе приблизительно 0,01 мг/кг, 0,025 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,075 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 8 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг, 50 мг/кг, 50 мг/кг, 70 мг/кг, 80 мг/кг, 90 мг/кг или 100 мг/кг.

[25] В некоторых вариантах осуществления антитела против 4-1ВВ человека и/или их фрагменты и/или композиции, содержащие их, отличаются индукцией повышенной пролиферации Т-клеток (например, пролиферации CD8<sup>+</sup> Т-клеток) и/или повышенной секреции ИФН $\gamma$  Т-клетками (например, CD8<sup>+</sup> Т-клетками) у индивидуума.

[26] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам, включающим введение индивидууму композиции, содержащей, или с помощью которой доставляют, антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент индивидууму, которому вводили или будут вводить одно или несколько дополнительных противоопухолевых терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам, включающим введение индивидууму композиции, содержащей, или с помощью которой доставляют, антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент индивидууму, которого подвергали или будут подвергать воздействию одного или нескольких из ионизирующей радиации, химиотерапевтического средства, антитела и клеточного терапевтического средства, таким образом, что индивидуума подвергают лечению обоими средствами.

[27] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам, включающим введение композиции, содержащей, или с помощью которой доставляют, антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент, индивидууму, которому вводили или будут вводить один или несколько из ингибитора иммунных контрольных точек, ИЛ-12, ГМ-КСФ, средства против CD4, фторурацила, доксорубина, иринотекана, паклитаксела, цисплатина или циклофосамида.

[28] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам, включающим введение композиции, содержащей, или с помощью которой доставляют, антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент, индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую ингибитор иммунных контрольных точек, таким образом, что индивидуума подвергают лечению обоими средствами. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является средством, ингибирующим передачу сигнала PD-1. В некоторых вариантах осуществления средство, ингибирующее передачу сигнала PD-1, является антителом против PD-1. В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 является ниволумабом, пембролизумабом, атезолизумабом, дурвалумабом или авелумабом.

[29] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам определения дозы антитела против 4-1ВВ или его антигенсвязывающего фрагмента для терапевтического лечения индивида. В некоторых вариантах осуществления такой способ включает (i) измерение секретируемого ИФН-гамма в биологическом образце индивидуума, где индивидууму вводили композицию, содержащую, или с помощью которой доставляют, количество антитела против 4-1ВВ или антигенсвязывающего фрагмента, представленного в настоящем описании; и (ii) сравнение измерения секретируемого ИФН-гамма с референсным значением и, если измерение секретируемого ИФН-гамма выше или ниже референсного значения, коррекцию количества антитела против 4-1ВВ или его антигенсвязывающего фрагмента,

подлежащего введению, и, таким образом, определение дозы для терапевтического лечения индивидуума. В некоторых вариантах осуществления референсное значение включает индексное значение, включающее значение, полученное с помощью одного или нескольких здоровых индивидуумов, значение, полученное с помощью одного или нескольких индивидуумов с диагностированным злокачественным новообразованием, или значение, полученное с помощью алгоритма прогнозирования риска злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления биологический образец является образцом цельной крови, плазмы или сыворотки. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет злокачественное новообразование или риск развития злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование выбрано из рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака шейки матки, рака толстого кишечника, рака эндометрия, рака пищевода, рака маточной трубы, рака желчного пузыря, злокачественного новообразования желудочно-кишечного тракта, рака головы и шеи, гемобластоза, рака гортани, рака печени, рака легких, лимфомы, меланомы, мезотелиомы, рака яичников, первичного рака брюшины, рака слюнных желез, саркомы, рака желудка, рака щитовидной железы, рака поджелудочной железы и рака предстательной железы.

[30] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам повышения секреции ИФН $\gamma$  клеткой *in vivo* или *in vitro*, включающим приведение клетки в контакт с антителом против 4-1BB или антигенсвязывающим фрагментом, представленным в настоящем описании.

[31] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам достижения пролиферации *ex vivo* или выделения активированных Т-клеток, включающим приведение популяции Т-клеток в контакт с антителом против 4-1BB или антигенсвязывающим фрагментом, представленным в настоящем описании, и, таким образом, повышение пролиферации активированных Т-клеток.

[32] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам выделения антиген-специфических активированных Т-клеток, включающим одну или несколько стадий: (а) культивирования мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) в среде вместе с пептидом интересующего эпитопа и ИЛ-2; (б) индукции экспрессии 4-1BB в культивируемых клетках посредством добавления пептида интересующего эпитопа; (с) приведения культивируемых клеток в контакт с поверхностью, покрытой антителом против 4-1BB или антигенсвязывающим фрагментом, представленным в настоящем описании, где культивируемые клетки, экспрессирующие 4-1BB, прикрепляются к покрытой поверхности; и (д) удаления неприкрепившихся клеток и, таким образом, выделения антиген-специфических активированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления активированные Т-клетки являются CD8<sup>+</sup> Т-клетками.

[33] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения или профилактики злокачественного новообразования у индивида, включающим введение индивидууму композиции, включающей терапевтически эффективное количество активированных Т-клеток, полученных любым способом, представленным в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование выбрано из рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака шейки матки, рака толстого кишечника, рака эндометрия, рака пищевода, рака маточной трубы, рака желчного пузыря, злокачественного новообразования желудочно-кишечного тракта, рака головы и шеи, гемобластоза, рака гортани, рака

печени, рака легких, лимфомы, меланомы, мезотелиомы, рака яичников, первичного рака брюшины, рака слюнных желез, саркомы, рака желудка, рака щитовидной железы, рака поджелудочной железы и рака предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления композиция включает по меньшей мере  $10^9$  клеток, по меньшей мере  $10^{10}$  клеток или более  $10^{10}$  активированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления активированные Т-клетки являются  $CD8^+$  Т-клетками.

[34] Кроме того, настоящее изобретение, в частности, относится к технологиям характеристики антител против 4-1BB человека и/или их фрагментов, как представлено в настоящем описании, и/или композиций, содержащих их. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам характеристики антител против 4-1BB человека и/или их фрагментов и/или композиций, содержащих их, связывающихся с клетками AML (например, HL60). В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам характеристики антител против 4-1BB человека и/или их фрагментов и/или композиций, содержащих их, осуществляемым посредством ELISA, иммуногистохимии, анализов связывания Вiasore, масс-спектрометрии, изоэлектрофокусирования (IEF), хроматографии и/или вестерн-блоттинга.

[35] Настоящее изобретение относится к различным технологиям, относящимся к получению или производству антител против 4-1BB человека и/или их фрагментов, как представлено в настоящем описании, и/или композиций, содержащих указанные антитела или их фрагменты.

[36] В рамках изобретения термин "приблизительно" и "приблизительно" используют в качестве эквивалентов. Любые публикации, патенты или патентные заявки, процитированные в настоящем описании, включены в него в полном объеме в качестве ссылки. Любые числительные, используемые в настоящей заявке с термином "приблизительно" или без него, предназначены для охвата любых нормальных отклонений, понятных специалисту в этой области.

[37] Другие признаки, объекты и преимущества настоящего изобретения очевидны из следующего подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание, хоть в нем и представлены варианты осуществления настоящего изобретения, приведено исключительно в иллюстративных целях, а не для ограничения. Различные изменения и модификации в объеме изобретения будут очевидны специалистам в этой области из подробного описания.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

[38] В настоящее описание включены чертежи, состоящие из следующих фигур, представленных исключительно в иллюстративных целях, а не для ограничения. Изложенные выше и другие объекты, аспекты, признаки и преимущества настоящего изобретения будут более очевидными и понятными со ссылкой на следующее описание в комбинации с сопутствующими фигурами, на которых:

[39] На **фиг. 1А** показаны конструкции внеклеточного домена (ECD) 4-1BB человека. Сверху приведена схема полноразмерного ECD 4-1BB (167 аминокислот), а ниже представлены различные фрагменты ECD 4-1BB: R1 (аминокислоты 1-55), R2 (аминокислоты 56-110), R3 (аминокислоты 110-167), R1.1 (аминокислоты 1-45), R1.2 (аминокислоты 1-35), R1.3 (аминокислоты 11-55), R1.4 (аминокислоты 21-55), R1.5 (аминокислоты 1-25) и R1.6 (аминокислоты 1-30). Каждую из этих конструкций ECD 4-1BB подвергали слиянию с GST. На **фиг. 1В** показан вестерн-блоттинг, на котором представлено связывание примера гуманизированного антитела против 4-1BB со слитыми конструкциями ECD 4-1BB, как представлено на **фиг. 1А**. Как показано, пример

гуманизированного антитела против 4-1ВВ связывается с полноразмерным слитым полипептидом ECD 4-1ВВ и со слитым полипептидом R1, но не со слитыми полипептидами R2 или R3. Маркеры молекулярной массы приведены в кДа слева.

[40] На **фиг. 2А** показан гель ПААГ после электрофореза в присутствии SDS экстрактов целых клеток, экспрессирующих ECD 4-1ВВ слитые конструкции. Слитые конструкции, как представлено выше на **фиг. 2А**, экспрессировали в клетках *E. coli* BL21, индуцированных с использованием 1 мМ IPTG, и экстракты целых клеток анализировали с помощью 12% геля ПААГ после электрофореза в присутствии SDS. Как показано, все слитые конструкции (ECD, R1, R1.1, R1.2, R1.3, R1.4, R1.5 и R1.6) демонстрировали устойчивую экспрессию белка. На **фиг. 2В** показан вестерн-блоттинг, на котором представлено связывание примера гуманизированного антитела против 4-1ВВ с полноразмерным слитым полипептидом ECD 4-1ВВ и слитыми полипептидами R1.1, R1.2, R1.3, и R1.6, но не слитыми полипептидами R1.4 или R1.5. Иммуноблоттинг осуществляли с использованием примера антитела против 4-1ВВ человека. Маркеры молекулярной массы приведены в кДа слева.

[41] На **фиг. 3** показана аффинность связывания моноклональных антител против 4-1ВВ с рекомбинантным антигеном 4-1ВВ человека, измеряемая посредством ELISA. Значения OD<sub>450 нм</sub> отложены по оси у, и увеличивающиеся концентрации антител против 4-1ВВ (в мкг/мл) отложены по оси х. ВВК-4 (круги) является антителом мыши против 4-1ВВ человека, 94G1 (квадраты), 94К (направленные вверх треугольники), 94KV (ромбы), 94KVT (звезды) и EU101 (направленные вниз треугольники) являются примерами гуманизированных вариантов антител против 4-1ВВ.

[42] На **фиг. 4** показано связывание моноклональных антител против 4-1ВВ с экспрессирующими 4-1ВВ Т-клетками Jurkat (Jurkat 8-1). Значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) отложены по оси у и Log<sub>10</sub> концентрации антитела (в мкг/мл) отложен по оси х. ВВК-4 (круги) является антителом мыши против 4-1ВВ человека, 94G1 (квадраты), 94К (направленные вверх треугольники), 94KV (ромбы), 94KVT (звезды) и EU101 (направленные вниз треугольники) являются примерами гуманизированных вариантов антител против 4-1ВВ.

[43] На **фиг. 5** показана таблица, в которой представлены аффинности связывания *in vitro* вариантов антител против 4-1ВВ с 4-1ВВ. Аффинность связывания измеряли с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR, Biacore 3000). 94G1 и EU101 являются примерами гуманизированных вариантов антител против 4-1ВВ.

[44] На **фиг. 6** показано связывание моноклональных антител против 4-1ВВ с экспрессирующими 4-1ВВ CD8<sup>+</sup> Т-клетками. CD8<sup>+</sup> Т-клетки выделяли из РВМС человека и активировали с помощью антитела против CD3 в течение 2 дней. 4-1ВВ-РЕ является примером коммерчески доступного антитела против 4-1ВВ, ВВК-4 является антителом мыши против 4-1ВВ человека, 94G1, 94К, 94KV, 94KVT и EU101 являются примерами гуманизированных вариантов антител против 4-1ВВ. На графике на нижней панели отражены значения, представленные для каждого антитела в данных FACS на верхних панелях.

[45] На **фиг. 7** показан график количественного анализа пролиферации *in vitro* CD8<sup>+</sup> Т-клеток, обработанных антителами против 4-1ВВ. Пролиферирующие CD8<sup>+</sup> Т-клетки не обрабатывали антителами, обрабатывали только IgG человека, ВВК-4 или примером гуманизированного варианта антитела против 4-1ВВ: 94G1, 94К, 94KV, 94KVT и EU101 и обрабатывали WST-1 (водорастворимой солью тетразолия) для окрашивания пролиферирующих (то есть, метаболически активных) клеток.

[46] На **фиг. 8** показан график количественного анализа секреции ИФН $\gamma$  *in vitro* CD8<sup>+</sup> Т-клетками, обработанными антителами против 4-1ВВ. CD8<sup>+</sup> Т-клетки выделяли из РВМС человека и не обрабатывали антителами, обрабатывали только IgG человека или 1 мкг/мл антитела против 4-1ВВ: ВВК-4, 94G1, 94К, 94KV, 94KVT и EU101. Секрецию ИФН $\gamma$  оценивали в дни 1, 3 и 5.

[47] На **фиг. 9** показаны графики, на которых представлена секреция ИФН $\gamma$  в (А) CD4<sup>+</sup> и (В) CD8<sup>+</sup>. После выделения из РВМС здорового донора активированные Т-клетки, присутствующие в РВМС, оставляли в среде RPMI-1640 с 2% FBS на 24 часа и обрабатывали оставленные РВМС прикрепленным к частицам железа антителом против CD4 или антителом против CD8, и выделяли CD4<sup>+</sup> клетки или CD8<sup>+</sup> клетки с

использованием магнитного сепаратора MACS. Выделенные CD4<sup>+</sup> Т-клетки или CD8<sup>+</sup> Т-клетки обрабатывали активатором Т-клеток, антителом против CD3, для индукции экспрессии 4-1ВВ и обрабатывали EU101 в различных концентрациях (0,5, 1,0, 2,5 и 5,0 мкг/мл) или контрольным IgG человека (5,0 мкг/мл) в течение 3 дней. Через 3 дня получали среду для культивирования без клеток и анализировали флуоресценцию ИФН $\gamma$  человека в среде для культивирования посредством ELISA (eBioscience). Результаты сравнивали со стандартной кривой, предоставленной в наборе для ELISA на ИФН $\gamma$ .

[48] На **фиг. 10А** показан график, на котором представлена антителозависимая цитотоксичность (ADCC) примеров антител против 4-1ВВ человека ВВК4, 94G1, 94KVT и EU101. На **фиг. 10В** показан график, на котором представлена комплементзависимая цитотоксичность (CDC) примеров антител против 4-1ВВ человека ВВК4, 94G1 и EU101.

[49] На **фиг. 11** показаны противоопухолевые эффекты *in vivo* примера антитела против 4-1ВВ человека (EU101) в зависимости от концентрации, измеряемые как размеры опухоли после того, как клетки рака толстого кишечника (HT29) подкожно инъецировали гуманизированным мышам и, когда размеры опухоли достигали от 100 до 200 мм<sup>3</sup>, мышам внутривенно вводили антитело против 4-1ВВ человека (EU101) в дозах 1,0 мг, 5,0 мг и 10,0 мг на 1 кг массы тела каждые 5 дней всего 3 раза (репрезентативные данные).

[50] На **фиг. 12** показаны противоопухолевые эффекты примера антитела против 4-1ВВ человека (EU101) и примера антитела против PD-1 (Keytruda, "KD") в зависимости от концентрации. Противоопухолевые эффекты измеряли как размеры опухоли после подкожной инъекции клеток рака толстого кишечника (HT29) гуманизированным мышам и введения антитела. Когда размеры опухоли достигали от 100 до 150 мм<sup>3</sup>, мышам вводили пример антитела против 4-1ВВ человека (EU101) или пример антитела против PD-1 (Keytruda) посредством интраперитонеальной инъекции в дозе 5,0 мг и 10,0 мг на 1 кг массы тела каждые 5 дней всего 3 раза.

[51] На **фиг. 13** показаны сравнительные противоопухолевые эффекты отдельного лечения и комбинированного лечения примером антитела против 4-1ВВ человека (EU101) и примером антитела против PD-1 (Keytruda). Противоопухолевые эффекты измеряли как размеры опухоли после подкожной инъекции клеток рака толстого кишечника (HT29) гуманизированным мышам и введения антитела. Когда размеры опухоли достигали от 300 до 450 мм<sup>3</sup>, пример антитела против 4-1ВВ человека (EU101) вводили в дозе 2,5 мг/кг в случае отдельного лечения, пример антитела против PD-1 (Keytruda) вводили в дозе 2,5 мг/кг в случае отдельного лечения, и 2,5 мг/кг EU101 + 2,5 мг/кг Keytruda вводили в случае комбинированного лечения. Введение осуществляли посредством интраперитонеальной инъекции мышам каждые три дня всего три раза.

[52] На **фиг. 14А** показаны количества  $CD4^+$  Т-клеток и  $CD8^+$  Т-клеток человека, циркулирующих в крови мыши или находящихся в 1 грамме опухолевой ткани через 34 дня после введения примера антитела против 4-1ВВ человека (EU101) и примера антитела против PD-1 (Keytruda), отдельно и в комбинации, у гуманизированных мышей, которым имплантировали опухоль, как представлено на **фиг. 13**. Количество инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в опухоли измеряли посредством вычисления соотношений общих количеств клеток посредством измерения долей (%)  $CD4^+$  Т-клеток и  $CD8^+$  Т-клеток с использованием проточного цитометра. Проточную цитометрию осуществляли для измерения долей (%)  $CD4^+$  Т-клеток и  $CD8^+$  Т-клеток после окрашивания клеток FITC-меченым антителом против CD4, флуоресцентным BV510-меченым антителом против CD8 и флуоресцентным APC-су7-меченым антителом против CD45, и клетки, положительные по маркеру клеток крови человека CD45, отделяли с помощью программы проточной цитометрии (гейтирования). На **фиг. 14В** показано соотношение Treg ( $CD4^+Foxp3^{high}$  Т-клеток) и  $CD8^+ИФН\gamma^+$  Т-клеток, измеряемое посредством вычисления пропорционального соотношения  $CD8^+ИФН\gamma^+$  Т-клеток и Treg ( $CD4^+Foxp3^{high}$  Т-клеток) с использованием проточного цитометра после окрашивания клеток флуоресцентно меченым APC-су7 антителом против CD45, флуоресцентно меченым BV510 антителом против CD8, флуоресцентно меченым FITC антителом против CD4, флуоресцентно меченым PE антителом против ИФН $\gamma$  и флуоресцентно меченым APC антителом против Foxp3.

[53] На **фиг. 15А** и **фиг. 15В** показаны результаты анализа ИФН $\gamma$  в сыворотке и опухолевой жидкости после отдельного и комбинированного лечения примером антитела против 4-1ВВ человека (EU101) и примером антитела против PD-1 (Keytruda). После вскрытия, которому подвергали мышей из всех исследуемых групп, представленных на **фиг. 15А** и **15В**, 10 мкл сыворотки и 100 мкл опухолевой жидкости анализировали с использованием наборов для ELISA на ИФН $\gamma$  человека и TGF- $\beta$  человека.

[54] На **фиг. 16А** показаны доли антиген-специфических  $CD8^+$  Т-клеток (доля 4-1ВВ $^+CD8^+$  Т-клеток: 43,2%, доля  $CD8^+$  Т-клеток: 58,6%), измеряемых перед пэннингом с использованием примера антитела против 4-1ВВ человека (EU101). На **фиг. 16В** показаны доли антиген-специфических  $CD8^+$  Т-клеток (доля pCMV $^+CD8^+$  Т-клеток: 60,0%, доля  $CD8^+$  Т-клеток: 79,3%), измеряемых после пэннинга с использованием примера антитела против 4-1ВВ человека (EU101).

#### **КОНКРЕТНЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

[55] В следующем описании широко используют ряд терминов, используемых в области рекомбинантной ДНК и иммунологии. Для обеспечения более четкого и последовательного понимания описания и формулы изобретения, включая объем таких терминов, представлены следующие определения.

[56] **Приблизительно:** Термин "приблизительно" при использовании в настоящем описании по отношению к значению относится к значению, схожему в этом контексте с упомянутым значением. В основном, специалистам в этой области, знакомым с контекстом, будет понятна соответствующая степень отклонения, предусмотренная термином "приблизительно" в этом контексте. Например, в некоторых вариантах осуществления термин "приблизительно" может включать диапазон значений, составляющих в пределах 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее от упомянутого значения.

[57] **Введение:** В рамках изобретения термин "введение", как правило, относится к введению композиции индивидууму или системе для доставки средства, являющегося композицией или включенного в композицию. Специалистам в этой области будет известно множество путей, которые в соответствующих обстоятельствах можно использовать для введения индивидууму, например, человеку. Например, в некоторых вариантах осуществления введение может быть глазным, пероральным, парентеральным, местным и тому подобное. В некоторых конкретных вариантах осуществления введение может являться бронхиальным (например, посредством бронхиальной инстилляции), буккальным, дермальным (которое может представлять собой или включать, например, одно или несколько из местного введения в дерму, интрадермального, интердермального, трансдермального введения и тому подобное), энтеральным, внутриартериальным, интрадермальным, внутрижелудочным, интрамедуллярным, внутримышечным, интраназальным, интраперитонеальным, интратекальным, внутривенным, внутрижелудочковым введением, введением в конкретный орган (например, внутрипеченочным введением), мукозальным, назальным, пероральным, ректальным, подкожным, сублингвальным, местным, трахеальным (например, посредством интратрахеальной инстилляции), вагинальным, витреальным введением и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления введение может включать только однократную дозу. В некоторых вариантах осуществления введение может включать использование фиксированного количества доз. В некоторых вариантах осуществления введение может включать дозирование, являющееся прерывистым (например, множество доз, разделенных во времени) и/или периодическим (например, отдельные дозы, разделенные общим периодом времени) дозированием. В некоторых вариантах осуществления введение может включать непрерывное введение дозы (например, перфузию) в течение, по меньшей мере, выбранного периода времени.

[58] **Аффинность:** Как известно в этой области, "аффинность" является мерой силы, с которой конкретный лиганд связывается со своим партнером. Аффинности можно измерять различными способами. В некоторых вариантах осуществления аффинность измеряют посредством количественного анализа. В некоторых таких вариантах осуществления концентрация партнера по связыванию может быть фиксированной в избытке относительно концентрации лиганда для имитации физиологических условий. Альтернативно или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления концентрацию партнера по связыванию и/или концентрацию лиганда можно варьировать. В некоторых таких вариантах осуществления аффинность можно сравнивать с референсом в сравнимых условиях (например, концентрациях).

[59] **Агонист:** Специалистам в этой области будет понятно, что термин "агонист" можно использовать для обозначения средства, условия или события, наличие, уровень, степень, тип или форма которого коррелирует с повышенным уровнем или активностью другого средства (то есть, средства, подвергаемого агонистическому действию). В основном, агонист может являться или включать средства любого химического класса, включая, например, низкомолекулярные соединения, полипептиды, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, металлы и/или любые другие вещества, демонстрирующие соответствующую активирующую активность. В некоторых вариантах осуществления агонист может быть прямым (в случае чего он оказывает свое влияние непосредственно на свою мишень); в некоторых вариантах осуществления агонист может являться непрямым (в случае чего он оказывает свое влияние иным образом, чем связывание со своей мишенью; например, посредством взаимодействия с регулятором мишени, таким образом, что изменяют уровень или активность мишени).

[60] **Животное:** В рамках изобретения термин относится к любому члену царства Животные. В некоторых вариантах осуществления термин "животное" относится к людям любого пола и на любой стадии развития. В некоторых вариантах осуществления термин "животное" относится к неотносящимся к человеку животным на любой стадии развития. В определенных вариантах осуществления неотносящееся к человеку животное представляет собой млекопитающего (например, грызуна, мышь, крысу, кролика, обезьяну, собаку, кошку, овцу, крупный рогатый скот, примата и/или свинью). В некоторых вариантах осуществления животные включают, в качестве неограничивающих примеров, млекопитающих, птиц, пресмыкающихся, амфибий, рыб, насекомых и/или червей. В некоторых вариантах осуществления животное может являться трансгенным животным, генетически сконструированным животным и/или клоном.

[61] **Антагонист:** Специалистам в этой области будет понятно, что в рамках изобретения термин "антагонист" можно использовать для обозначения средства, условия или события, наличие, уровень, степень, тип или форма которого коррелирует со сниженным уровнем или активностью другого средства (то есть, ингибируемого средства или мишени). В основном, антагонист может являться или включать средство любого химического класса, включая, например, низкомолекулярные соединения, полипептиды, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, металлы и/или любое другое вещество, демонстрирующее соответствующую ингибиторную активность. В некоторых вариантах осуществления антагонист может являться прямым (в случае чего он оказывает свое влияние непосредственно на свою мишень); в некоторых вариантах осуществления антагонист может являться непрямым (в случае чего он оказывает свое влияние иным образом, чем связывание со своей мишенью; например, посредством взаимодействия с регулятором мишени, таким образом, что изменяют уровень или активность мишени).

[62] **Антитело:** В рамках изобретения термин "антитело" относится к полипептиду, включающему канонические элементы последовательности иммуноглобулина, достаточные для обеспечения специфического связывания с конкретным антигеном-мишенью. Как известно в этой области, интактные антитела в том виде, в котором они продуцируются в природе, являются тетрамерными средствами массой приблизительно 150 кДа, состоящими из двух идентичных полипептидов тяжелой цепи (приблизительно 50 кДа каждая) и двух идентичных полипептидов легкой цепи (приблизительно 25 кДа каждая), связывающихся друг с другом с образованием того, что, как правило, обозначают как "Y-образная" структура. Каждая тяжелая цепь состоит по меньшей мере из четырех доменов (каждый составляет приблизительно 110 аминокислот в длину): аминоконцевой вариабельный (VH) домен (находящийся на концах Y-образной структуры), затем три константных домена: CH1, CH2 и карбокси-концевой CH3 (находящийся на основании стебля Y-образной структуры). Короткая область, известная как "S-область", соединяет вариабельные и константные области тяжелой цепи. "Шарнирная область" соединяет домены CH2 и CH3 с остальной частью антитела. Две дисульфидные связи в этой шарнирной области соединяют два полипептида тяжелой цепи друг с другом в интактном антителе. Каждая легкая цепь состоит из двух доменов - аминоконцевого вариабельного (VL) домена с последующим карбокси-концевым константным (CL) доменом, разделенными друг с другом другой "S-областью". Тетрамеры интактного антитела состоят из двух димеров тяжелая цепь-легкая цепь, в которых тяжелые и легкие цепи соединены друг с другом одной дисульфидной связью; две другие дисульфидные связи соединяют шарнирные области тяжелой цепи друг с

другом, таким образом, что димеры соединены друг с другом, и образуется тетрамер. Продуцирующиеся в природе антитела также являются гликозилированными, как правило, в домене СН2. Каждый домен в природном антителе имеет структуру, отличающуюся "иммуноглобулиновым изгибом", образованным двумя бета-  
5 складчатыми слоями (например, 3-, 4- или 5-цепочечными слоями), упакованными относительно друг друга в сжатый антипараллельный бета-баррель. Каждый  
вариабельный домен содержит три гипервариабельные петли, известные как "определяющие комплементарность области" (CDR1, CDR2 и CDR3), и четыре до  
10 некоторой степени инвариантные "каркасные" области (FR1, FR2, FR3 и FR4). Когда природные антитела сворачиваются, области FR образуют бета-складчатые слои,  
представляющие собой структурный каркас для доменов, и петлевые области тяжелых и легких цепей объединяются в трехмерном пространстве таким образом, что они  
образуют один гипервариабельный антигенсвязывающий участок, находящийся на  
15 конце Y-образной структуры. Fc-область природных антител связывается с элементами системы комплемента, а также с рецепторами на эффекторных клетках, включая,  
например, эффекторные клетки, опосредующие цитотоксичность. Как известно в этой области, аффинность и/или другие свойства связывания Fc-областей по отношению к  
Fc-рецепторам можно модулировать посредством гликозилирования или другой  
20 модификации. В некоторых вариантах осуществления антитела, продуцируемые и/или используемые в соответствии с настоящим изобретением, включают гликозилированные Fc-домены, включая Fc-домены с модифицированным или достигнутым посредством  
конструирования гликозилированием. В целях по настоящему изобретению, в определенных вариантах осуществления любой полипептид или комплекс полипептидов,  
включающий достаточные последовательности иммуноглобулиновых доменов,  
25 обнаруживаемые в природных антителах, можно обозначать как "антитело" и/или использовать как "антитело" независимо от того, является ли полипептид природно  
продуцируемым (например, продуцируемым организмом, реагирующим на антиген) или получаемым с помощью рекомбинантного конструирования, химического синтеза  
или другой искусственной системы или методологии. В некоторых вариантах  
30 осуществления антитело является поликлональным; в некоторых вариантах осуществления антитело является моноклональным. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет последовательности константной области, характерные  
для антител мыши, кролика, примата или человека. В некоторых вариантах осуществления элементы последовательности антитела являются гуманизированными,  
35 приматизированными, химерными и тому подобное, как известно в этой области. Кроме того, в рамках изобретения термин "антитело" может относиться к соответствующим  
вариантам осуществления (если не указано иначе или иное не очевидно из контекста), к любым из известных в этой области или разработанных конструкций или форматов  
для использования структурных и функциональных признаков антитела в  
40 альтернативном представлении. Например, в вариантах осуществления антитело, используемое в соответствии с настоящим изобретением, находится в формате,  
выбранном, в качестве неограничивающих примеров, из интактных антител IgA, IgG, IgE или IgM; би- или мультиспецифических антител (например, Zybody® и тому  
подобное); фрагментов антител, таких как Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab')2-  
45 фрагменты, Fd'-фрагменты, Fd-фрагменты и выделенные CDR или их наборы; одноцепочечных Fv; продуктов слияния полипептид-Fc; однодоменных антител  
(например, однодоменных антител акулы, таких как IgNAR или их фрагменты); антитела Верблюжьих; маскированных антител (например, Probody®); иммунофармацевтических

средств на основе модульного белка малого размера ("SMIP<sup>TM</sup>"); одноцепочечных или тандемных диател (TandAb®); Humabody, VHH; антикалинов; нанотел, минител; BiTE®; белков с анкириновыми повторами или DARPIN®; авимеров; DART; TCR-подобных антител; аднектинов; аффилинов; трансантител; аффител; TrimerX®; микробелков; 5  
финомеров, центирины и KALBITOR®. В некоторых вариантах осуществления в антителе может отсутствовать ковалентная модификация (например, присоединение гликана), присутствующая в случае природной продукции. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать ковалентную модификацию (например, присоединение 10  
гликана, нагрузки [например, детектируемого вещества, терапевтического вещества, каталитического вещества и тому подобное] или другой боковой группы [например, полиэтиленгликоля и тому подобное]).

[63] **Фрагмент антитела:** В рамках изобретения термин "фрагмент антитела" относится к части антитела или средства-антитела, как представлено в настоящем описании, и, как правило, к части, включающей антигенсвязывающую часть или ее вариабельную 15  
область. Фрагмент антитела можно получать любыми способами. Например, в некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела можно получать ферментативно или химически посредством фрагментации интактного антитела или средства-антитела. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела можно 20  
получать рекомбинантно (то есть, посредством экспрессии сконструированной последовательности нуклеиновой кислоты). В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела можно получать синтетически полностью или частично. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела (в частности, антигенсвязывающий 25  
фрагмент антитела) может иметь длину по меньшей мере приблизительно 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 аминокислот или более, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 200 аминокислот.

[64] **Связывание:** Следует понимать, что в рамках изобретения термин "связывание", как правило, относится к нековалентному связыванию между двумя или более 30  
веществами. "Прямое" связывание включает физический контакт между веществами; не прямое связывание включает физическое взаимодействие посредством физического контакта с одним или несколькими промежуточными веществами. Связывание между 35  
двумя или более веществами, как правило, можно анализировать в любом из множества контекстов, включая ситуацию, когда взаимодействующие вещества исследуют в отдельности или в контексте более сложных систем (например, в состоянии ковалентной или иной связи с веществом-носителем и/или в биологической системе или клетке).

[65] **Злокачественное новообразование:** термины "злокачественное новообразование", "неоплазия", "опухоль" и "карцинома" используют в настоящем описании для 40  
обозначения клеток, демонстрирующих относительно аномальный, неконтролируемый и/или автономный рост, таким образом, что они проявляют фенотип аномального роста, отличающийся значительной утратой контроля над пролиферацией клеток. В некоторых вариантах осуществления опухоль может представлять собой или содержать 45  
клетки, являющиеся предраковыми (например, доброкачественными), злокачественными, преметастазирующими, метастазирующими и/или неметастазирующими. В настоящем описании определены конкретные злокачественные новообразования, в случае которых представленные идеи могут быть особенно значимыми. В некоторых вариантах осуществления соответствующее злокачественное новообразование может являться солидной опухолью. В некоторых вариантах осуществления соответствующее злокачественное новообразование может являться гематологической опухолью. В основном, примеры различных типов злокачественных

новообразований, известных в этой области, включают, например, гемобластозы, включая лейкозы, лимфомы (лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому), миеломы и миелопролиферативные нарушения; саркомы, меланомы, аденомы, карциномы солидной ткани, плоскоклеточные карциномы ротовой полости, горла, гортани и легких, рак печени, злокачественные новообразования мочеполовой системы, такие как рак предстательной железы, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак матки и рак эндометрия и почечноклеточные карциномы, рак костной ткани, рак поджелудочной железы, рак кожи, кожную или внутриглазную меланому, злокачественное новообразование эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак головы и шеи, рак молочной железы, злокачественные новообразования желудочно-кишечного тракта и злокачественные новообразования нервной системы, доброкачественные поражения, такие как папилломы и т.п.

[66] *CDR*: в рамках изобретения термин относится к определяющей комплементарности области в варибельной области антитела. В каждой из варибельных областей тяжелой цепи и легкой цепи существует три CDR, обозначаемые как CDR1, CDR2 и CDR3. Термин "набор CDR" относится к группе из трех или шести CDR, находящихся в одной варибельной области, способной связываться с антигеном, или CDR когнатных варибельных областей тяжелой и легкой цепи, способных связываться с антигеном. В этой области созданы конкретные системы определения границ CDR (например, Kabat, Chothia и тому подобное); специалистам в этой области понятны различия между этими системами, и они способны определять границы CDR до степени, требующейся для понимания и практического осуществления описываемого в заявке изобретения.

[67] *Химиотерапевтическое средство*: В рамках изобретения термин "химиотерапевтическое средство" имеет свое известное в этой области значение, подразумевающее одно или несколько проапоптотических, цитостатических и/или цитотоксических средств, например, конкретно включая средства, используемые и/или рекомендуемые для использования в лечении одного или нескольких заболеваний, нарушений или состояний, ассоциированных с нежелательной пролиферацией клеток. Во многих вариантах осуществления химиотерапевтические средства применимы в лечении злокачественных новообразований. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство может представлять собой или содержать одно или несколько алкилирующих средств, один или несколько антрациклинов, одно или несколько средств, разрушающих цитоскелет (например, средств, воздействующих на микротрубочки, такие как таксаны, майтанзин и их аналоги), один или несколько эпотилонов, один или несколько ингибиторов гистоновых деацетилаз HDAC, один или несколько ингибиторов топоизомераз (например, ингибиторов топоизомеразы I и/или топоизомеразы II), один или несколько ингибиторов киназ, один или несколько аналогов нуклеотидов или аналогов предшественников нуклеотидов, один или несколько пептидных антибиотиков, одно или несколько средств на основе платины, один или несколько ретиноидов, один или несколько алкалоидов барвинка и/или один или несколько аналогов одного или нескольких из следующих средств (то есть, обладающих соответствующей антипролиферативной активностью). В некоторых конкретных вариантах осуществления химиотерапевтическое средство может представлять собой или содержать один или несколько из актиномина, полностью транс-ретиноевой кислоты, ауристатины, азациитидина, азатиоприна, блеомицина, бортезомиба, карбоплатина, капецитабина, цисплатина, хлорамбуцила, циклофосфамида, куркумина, цитарабина, даунорубицина, доцетаксела, доксифлуридина, доксорубицина, эпирубицина,

эпотилона, этопозиды, фторурацила, гемцитабина, гидроксимочевины, идарубицина, иматиниба, иринотекана, майтанзина и/или его аналогов (например, dm1), мехлоретамин, меркаптопурина, метотрексат, митоксантрон, майтанзиноид, оксалиплатина, паклитаксел, пеметрексед, тенипозид, тиогуанин, топотекан, валрубицин, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбин и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство можно использовать в контексте конъюгата антитело-лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство является средством, обнаруживаемым в конъюгате антитело-лекарственное средство, выбранном из группы, состоящей из: hLL1-доксорубин, hRS7-SN-38, hMN-14-SN-38, hLL2-SN-38, hA20-SN-38, hPAM4-SN-38, hLL1-SN-38, hRS7-Pro-2-P-Dox, hMN-14-Pro-2-P-Dox, hLL2-Pro-2-P-Dox, hA20-Pro-2-P-Dox, hPAM4-Pro-2-P-Dox, hLL1-Pro-2-P-Dox, P4/D10-доксорубин, гемтузумаб озогамин, брентуксимаб ведотин, трастузумаб эмтанзин, инотузумаб озогамин, глембатумомаб ведотин, SAR3419, SAR566658, BИВ015, BT062, SGN-75, SGN-CD19A, AMG-172, AMG-595, BAY-94-9343, ASG-5ME, ASG-22ME, ASG-16M8F, MDX-1203, MLN-0264, ADC против PSMA, RG-7450, RG-7458, RG-7593, RG-7596, RG-7598, RG-7599, RG-7600, RG-7636, ABT-414, IMGN-853, IMGN-529, ворсетузумаб мафодотин и лорвотузумаб мертанзин.

[68] **Комбинированное лечение:** В рамках изобретения термин "комбинированное лечение" относится к ситуациям, в которых индивидуум одновременно подвергают воздействию двух или более схем лечения (например, двух или более терапевтических средств). В некоторых вариантах осуществления две или более схемы лечения можно использовать одновременно. В некоторых вариантах осуществления две или более схемы лечения можно использовать последовательно (например, первую схему лечения используют перед введением любых доз из второй схемы лечения). В некоторых вариантах осуществления две или более схемы лечения используют в виде перекрывающихся схем лечения. В некоторых вариантах осуществления использование комбинированного лечения может включать использование одного или нескольких терапевтических средств или способов лечения в отношении индивидуума, для которого используют другие средства или способы лечения.

[69] **Соответствующий:** В рамках изобретения термин "соответствующий" можно использовать для обозначения положения/типа структурного элемента в соединении или композиции при сравнении с подходящим референсным соединением или композицией. Например, в некоторых вариантах осуществления мономерный остаток в полимере (например, аминокислотный остаток в полипептиде или остаток нуклеиновой кислоты в полинуклеотиде) можно идентифицировать как "соответствующий" остатку в подходящем референсном полимере. Например, специалистам в этой области будет понятно, что в целях простоты изложения остатки в полипептиде часто обозначают с использованием канонической системы нумерации на основе референсного родственного полипептида, таким образом, что аминокислота, "соответствующая" остатку в положении 190, например, может не быть конкретно 190-ой аминокислотой в конкретной аминокислотной цепи, а соответствует остатку, обнаруживаемому в положении 190 референсного полипептида; специалистам в этой области понятно, как идентифицировать "соответствующие" аминокислоты. Например, специалистам в этой области известны различные стратегии выравнивания последовательностей, включая программное обеспечение, такое как, например, BLAST, CS-BLAST, CUSASW++, DIAMOND, FASTA, GGSEARCH/GLSEARCH, Genoogle, HMMER, HHpred/HHsearch, IDF, Infernal, KLAST, USEARCH, Parasail, PSI-BLAST, PSI-Search, ScalaBLAST, Sequilab, SAM, SSEARCH,

SWAPHI, SWAPHI-LS, SWIMM, или SWIPE, которые можно использовать, например, для идентификации "соответствующих" остатков в полипептидах и/или нуклеиновых кислот по изобретению.

[70] **Сконструированный**: В основном, термин "сконструированный" относится к 5 чему-то, подвергнутому манипуляциям человеком. Например, полипептид считают "сконструированным", если последовательность полипептида подвергнута манипуляциям человеком. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированный полипептид содержит последовательность, включающую одну или несколько мутаций, делеций и/или инсерций аминокислот, внесенных человеком в 10 референсную последовательность полипептида. Для сравнения, клетку или организм считают "сконструированными", если они подвергнуты манипуляциям таким образом, что изменена генетическая информация (например, встраивают новый генетический материал, ранее не присутствующий в клетке или организме, например, посредством трансформации, скрещивания, соматической гибридизации, трансфекции, трансдукции 15 или другого механизма, или ранее присутствующий генетический материал изменяют или удаляют, например, посредством замены или делеции или с помощью способов скрещивания). Как принято на практике и понятно специалистам в этой области, производные и/или потомство сконструированного полипептида или клетки, как правило, все равно обозначают как "сконструированные" даже притом, что конкретную 20 манипуляцию осуществляли в отношении предшествующего объекта.

[71] **Эпитоп**: В рамках изобретения термин включает любое вещество, специфически распознаваемое иммуноглобулиновым (например, антительным или рецепторным) связывающим компонентом. В некоторых вариантах осуществления эпитоп состоит 25 из множества атомов или групп на антигене. В некоторых вариантах осуществления такие атомы или группы экспонированы на поверхности, когда антиген принимает соответствующую трехмерную конформацию. В некоторых вариантах осуществления такие атомы или группы физически находятся вблизи друг друга в пространстве, когда антиген принимает такую конформацию. В некоторых вариантах осуществления, по 30 меньшей мере, некоторые из таких атомов являются группами, физически отделенными друг от друга, когда антиген принимает альтернативную конформацию (например, является линеаризованным).

[72] **Ex vivo**: В рамках изобретения термин относится к биологическим событиям, происходящим вне контекста многоклеточного организма. Например, в контексте систем на основе клеток термин можно использовать для обозначения событий, 35 происходящих в популяции клеток (например, пролиферации клеток, секреции цитокинов и тому подобное) в искусственной среде.

[73] **Каркас или каркасная область**: В рамках изобретения термин относится к последовательностям вариабельной области за исключением CDR. Т.к. последовательность CDR можно определять с использованием различных систем, 40 каркасную последовательность также можно подвергать соответствующим образом отличающимся интерпретациям. Шесть CDR разделяют каркасные области на тяжелых и легких цепях на четыре подобласти (FR1, FR2, FR3 и FR4) на каждой цепи, где CDR1 находится между FR1 и FR2, CDR2 - между FR2 и FR3, и CDR3 - между FR3 и FR4. Без упоминания конкретной подобласти как FR1, FR2, FR3 или FR4, каркасная область, 45 как указано другими, представляет собой комбинированные FR в вариабельной области одной природной цепи иммуноглобулина. В рамках изобретения FR представляет собой одну из четырех подобластей, FR1, например, представляет собой первую каркасную область, наиболее близкую к аминоконцу вариабельной области и расположенную в

5'-направлении относительно CDR1, и FR представляет собой две или более из подобластей, составляющих каркасную область.

[74] **Гуманизированный:** Как известно в этой области, термин "гуманизированный" является общеупотребительным для обозначения антител (или компонентов антитела), аминокислотная последовательность которых включает последовательности областей  $V_H$  и  $V_L$  из референсного антитела, индуцированного у неявляющихся человеком видов (например, мыши), но также включающего модификации в этих последовательностях относительно референсного антитела, внесенные для того, чтобы сделать их более "подобными человеческим", то есть, более схожими с последовательностями 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 10295 10300 10305 10310 10315 10320 10325 10330 10335 10340 10345 10350 10355 10360 10365 10370 10375 10380 10385 10390 10395 10400 10405 10410 10415 10420 10425 10430 10435 10440 10445 10450 10455 10460 10465 10470 10475 10480 10485 10490 10495 10500 10505 10510 10515 10520 10525 10530 10535 10540 10545 10550 10555 10560 10565 10570 10575 10580 10585 10590 10595 10600 10605 10610 10615 10620 10625 10630 10635 10640 10645 10650 10655 10660 10665 10670 10675 10680 10685 10690 10695 10700 10705 10710 10715 10720 10725 10730 10735 10740 10745 10750 10755 10760 10765 10770 10775 10780 10785 10790 10795 10800 10805 10810 10815 10820 10825 10830 10835 10840 10845 10850 10855 10860 10865 10870 10875 10880 10885 10890 10895 10900 10905 10910 10915 10920 10925 10930 10935 10940 10945 10950 10955 10960 10965 10970 10975 10980 10985 10990 10995 11000 11005 11010 11015 11020 11025 11030 11035 11040 11045 11050 11055 11060 11065 11070 11075 11080 11085 11090 11095 11100 11105 11110 11115 11120 11125 11130 11135 11140 11145 11150 11155 11160 11165 11170 11175 11180 11185 11190 11195 11200 11205 11210 11215 11220 11225 11230 11235 11240 11245 11250 11255 11260 11265 11270 11275 11280 11285 11290 11295 11300 11305 11310 11315 11320 11325 11330 11335 11340 11345 11350 11355 11360 11365 11370 11375 11380 11385 11390 11395 11400 11405 11410 11415 11420 11425 11430 11435 11440 11445 11450 11455 11460 11465 11470 11475 11480 11485 11490 11495 11500 11505 11510 11515 11520 11525 11530 11535 11540 11545 11550 11555 11560 11565 11570 11575 11580 11585 11590 11595 11600 11605 11610 11615 11620 11625 11630 11635 11640 11645 11650 11655 11660 11665 11670 11675 11680 11685 11690 11695 11700 11705 11710 11715 11720 11725 11730 11735 11740 11745 11750 11755 11760 11765 11770 11775 11780 11785 11790 11795 11800 11805 11810 11815 11820 11825 11830 11835 11840 11845 11850 11855 11860 11865 11870 11875 11880 11885 11890 11895 11900 11905 11910 11915 11920 11925 1193

91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или более приблизительно 99% чистыми. В рамках изобретения вещество является "чистым", если оно, по существу, не содержит другие компоненты. В некоторых вариантах осуществления, как будет понятно специалистам в этой области, вещество все равно можно считать "выделенным" или даже "чистым" после комбинирования с другими конкретными компонентами, такими как, например, один или несколько носителей или эксципиентов (например, буферы, растворители, вода и тому подобное); в таких вариантах осуществления процент выделения или чистоты вещества вычисляют без включения таких носителей или эксципиентов. Например, в некоторых вариантах осуществления биологический полимер, такой как полипептид или полинуклеотид, встречающийся в природе, считают "выделенным", если а) благодаря своему происхождению или источнику получения он не ассоциирован с некоторыми или всеми из компонентов, сопутствующих ему в его нативном состоянии в природе; б) он, по существу, не содержит другие полипептиды или нуклеиновые кислоты того же вида, продуцирующего его в природе; с) он экспрессируется или иным образом ассоциирован с компонентами из клетки или другой системы экспрессии, не принадлежащей виду, продуцирующему его в природе. Таким образом, например, в некоторых вариантах осуществления полипептид, синтезируемый химически или в клеточной системе, отличающейся от системы, продуцирующей его в природе, считают "выделенным" полипептидом. Альтернативно или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления полипептид, подвергнутый воздействию одного или нескольких способов очистки, можно считать "выделенным" полипептидом до той степени, до которой он отделен от других компонентов, а) с которыми он ассоциирован в природе и/или б) с которыми он ассоциирован при исходной продукции.

[78] **К<sub>D</sub>**. В рамках изобретения термин относится к константе диссоциации связывающего средства (например, антитела или его связывающего компонента) из комплекса с его партнером (например, эпитопом, с которым связывается антитело или его связывающий компонент).

[79] **Функционально связанный**. В рамках изобретения термин относится к смежному положению, где описанные компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать определенным образом. Контрольный элемент, "функционально связанный" с функциональным элементом, связан таким образом, что экспрессии и/или активности функционального элемента достигают в условиях, совместимых с контрольным элементом. В некоторых вариантах осуществления "функционально связанные" контрольные элементы являются смежными (например, ковалентно связанными) с интересующими кодирующими элементами; в некоторых вариантах осуществления контрольные элементы действуют в транс-положении или иным образом в отношении интересующего функционального элемента.

[80] **Фармацевтическая композиция**. В рамках изобретения термин "фармацевтическая композиция" относится к композиции, в которой активное средство составляют вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. В некоторых вариантах осуществления композиция подходит для введения человеку или животному. В некоторых вариантах осуществления активное средство присутствует в однократной дозе, подходящей для введения по схеме лечения, демонстрирующей статистически значимую вероятность достижения заранее определенного терапевтического эффекта при введении соответствующей популяции.

[81] **Полипептид**. В рамках изобретения термин "полипептид", как правило, имеет

свое известное в этой области значение полимера из по меньшей мере трех аминокислот. Специалистам в этой области будет понятно, что термин "полипептид" должен быть в достаточной степени общим, чтобы включать не только полипептиды, имеющие полную последовательность, приведенную в настоящем описании, но также и полипептиды, представляющие собой функциональные фрагменты (то есть, фрагменты, сохраняющие по меньшей мере одну активность) таких полных полипептидов. Кроме того, специалистам в этой области понятно, что белковые последовательности, как правило, допускают некоторые замены без нарушения активности. Таким образом, любой полипептид, сохраняющий активность и обладающий по меньшей мере приблизительно 30-40% общей идентичности последовательности, зачастую более приблизительно 50%, 60%, 70% или 80%, и дополнительно, как правило, включающий по меньшей мере одну область гораздо большей идентичности, зачастую более 90% или даже 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% в одной или нескольких высококонсервативных областях, как правило, включающих по меньшей мере 3-4 и зачастую до 20 или более аминокислот, по отношению к другому полипептиду того же класса, включен в соответствующий в рамках изобретения термин "полипептид". Полипептиды могут содержать L-аминокислоты, D-аминокислоты или и те, и другие и могут содержать любые из множества модификаций или аналогов аминокислот, известных в этой области. Применимые модификации включают, например, концевое ацетилирование, амидирование, метилирование и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления белки могут содержать природные аминокислоты, неприродные аминокислоты, синтетические аминокислоты и их комбинации. Термин "пептид", как правило, используют для обозначения полипептида, имеющего длину менее приблизительно 100 аминокислот, менее приблизительно 50 аминокислот, менее 20 аминокислот или менее 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления белки являются антителами, фрагментами антител, их биологически активными частями и/или их характерными частями.

[82] **Профилактика:** В рамках изобретения, при использовании в отношении возникновения заболевания, нарушения и/или состояния, термин относится к снижению риска развития заболевания, нарушения и/или состояния и/или задержки дебюта и/или ухудшения тяжести одной или нескольких характеристик или симптомов заболевания, нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления профилактику оценивают в отношении популяции таким образом, что считают, что с помощью средства осуществляют "профилактику" конкретного заболевания, нарушения или состояния, если наблюдают статистически значимое снижение развития, частоты и/или интенсивности одного или нескольких симптомов заболевания, нарушения или состояния в популяции, восприимчивой к заболеванию, нарушению или состоянию.

[83] **Рекомбинантный:** В рамках изобретения термин предназначен для обозначения полипептидов, созданных, сконструированных, полученных, экспрессируемых, производимых и/или или выделенных рекомбинантными способами, таких как полипептиды, экспрессируемые с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, трансфицируемого в клетку-хозяина; полипептиды, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки полипептидов человека; полипептиды, выделенные из животного (например, мыши, кролика, овцы, рыбы и тому подобное), трансгенного или иным образом подвергнутого манипуляциям для экспрессии гена, или генов, или компонентов генов, кодирующих и/или направляющих экспрессию полипептида или одного или нескольких его компонентов, частей, элементов или доменов; и/или полипептиды, полученные, экспрессируемые, созданные или выделенные

любыми другими способами, включающими сплайсинг или лигирование выбранных элементов последовательности нуклеиновой кислоты друг с другом, химический синтез выбранных элементов последовательности и/или иное получение нуклеиновой кислоты, кодирующей и/или направляющей экспрессию полипептида или одного или нескольких его компонентов, частей, элементов или доменов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из таких выбранных элементов последовательности обнаруживают в природе. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из таких выбранных элементов последовательности создают *in silico*. В некоторых вариантах осуществления один или несколько таких выбранных элементов последовательности являются результатом мутагенеза (например, *in vivo* или *in vitro*) известного элемента последовательности, например, из природного или синтетического источника, такого как, например, зародышевая линия интересующего организма (например, человека, мыши и тому подобное).

[84] **Специфическое связывание:** В рамках изобретения термин "специфическое связывание" относится к возможности различения партнеров по связыванию в среде, в которой происходит связывание. Связывающее средство, взаимодействующее с одной конкретной мишенью при наличии других потенциальных мишеней, называют "специфически связывающимся" с мишенью, с которой он взаимодействует. В некоторых вариантах осуществления специфическое связывание оценивают посредством детекции или определения степени ассоциации между связывающим средством и его партнером; в некоторых вариантах осуществления специфическое связывание оценивают посредством детекции или определения степени диссоциации комплекса связывающее средство-партнер; в некоторых вариантах осуществления специфическое связывание оценивают посредством детекции или определения способности связывающего средства конкурировать при альтернативном взаимодействии между его партнером и другим веществом. В некоторых вариантах осуществления специфическое связывание оценивают посредством осуществления такой детекции или определения в диапазоне концентраций.

[85] **Индивидуум:** В рамках изобретения термин "индивидуум" относится к организму, как правило, млекопитающему (например, человеку, в некоторых вариантах осуществления включая пренатальные формы человека). В некоторых вариантах осуществления индивидуум страдает соответствующим заболеванием, нарушением или состоянием. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет предрасположенность к заболеванию, нарушению или состоянию. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума наблюдают один или несколько симптомов или характеристик заболевания, нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления индивидуум не демонстрирует какой-либо симптом или характеристику заболевания, нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является кем-либо с одним или несколькими характерными признаками предрасположенности или риска развития заболевания, нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является пациентом. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является индивидуумом, в отношении которого проводят или проводили диагностику и/или терапию.

[86] **Терапевтическое средство:** В рамках изобретения фраза "терапевтическое средство", в основном, относится к любому средству, вызывающему желаемый фармакологический эффект при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления средство считают терапевтическим средством, если оно демонстрирует статистически достоверный эффект в соответствующей популяции. В некоторых вариантах осуществления соответствующая популяция может являться популяцией

модельных организмов. В некоторых вариантах осуществления соответствующую популяцию можно определять с использованием различных критериев, таких как конкретная возрастная группа, пол, генетический фон, имеющиеся заболевания и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство является 5 веществом, которое можно использовать для облегчения, улучшения, уменьшения, ингибирования, профилактики, задержки дебюта, снижения тяжести и/или снижения частоты одного или нескольких симптомов или признаков заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления "терапевтическое средство" является средством, одобренным или подлежащим одобрению государственным органом 10 до того, как его можно продавать для введения людям. В некоторых вариантах осуществления "терапевтическое средство" является средством, в случае которого необходимо медицинское предписание для введения людям.

[87] *Терапевтически эффективное количество*: В рамках изобретения термин "терапевтически эффективное количество" означает количество, являющееся 15 достаточным для лечения заболевания, нарушения или состояния при введении популяции, страдающей или имеющей предрасположенность к заболеванию, нарушению и/или состоянию в соответствии с терапевтической схемой лечения. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество является количеством, снижающим частоту и/или тяжесть, стабилизирующим одну или несколько 20 характеристик и/или задерживающим дебют одного или нескольких симптомов заболевания, нарушения и/или состояния. Специалистам в этой области будет понятно, что термин "терапевтически эффективное количество", фактически, не требует достижения успешного лечения у конкретного индивидуума. Вернее, терапевтически эффективное количество может являться количеством, обеспечивающим конкретный 25 желаемый фармакологический ответ у значительного количества индивидуумов при введении нуждающимся в таком лечении пациентам. Например, в некоторых вариантах осуществления термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, которое при введении нуждающемуся в этом индивидууму в контексте интенсивной терапии будет блокировать, стабилизировать, уменьшать или реверсировать 30 поддерживающий злокачественное новообразование процесс, происходящий у указанного индивидуума, или будет усиливать супрессирующий злокачественное новообразование процесс у указанного индивидуума. В контексте лечения злокачественных опухолей "терапевтически эффективное количество" является количеством, которое при введении индивидууму с диагностированным злокачественным 35 новообразованием будет предотвращать, стабилизировать, ингибировать или снижать дальнейшее развитие злокачественного новообразования у индивидуума. Особенно предпочтительное "терапевтически эффективное количество" композиции, представленной в настоящем описании, реверсирует (при терапевтическом лечении) развитие злокачественного новообразования, такого как карцинома поджелудочной 40 железы, или помогает достигать или пролонгировать ремиссию злокачественного новообразования. Терапевтически эффективное количество, вводимое индивидууму для лечения злокачественного новообразования у этого индивидуума, может быть тем же или отличаться от терапевтически эффективного количества, вводимого для стимуляции ремиссии или ингибирования метастазирования. Как и для большинства 45 способов терапии злокачественных новообразований, терапевтические способы, представленные в настоящем описании, не следует интерпретировать как "излечение" злокачественного новообразования или ограничивать им; скорее, способы лечения предназначены для использования описываемых композиций для "лечения"

злокачественного новообразования, то есть, для осуществления желаемого или благоприятного изменения здоровья индивидуума, имеющего злокачественное новообразование. Такие благоприятные эффекты понятны специалистам в области онкологии и включают, в качестве неограничивающих примеров, стабилизацию состояния пациента, уменьшение размера опухоли (регрессию опухоли), улучшение показателей жизнедеятельности (например, улучшение функционирования злокачественных тканей или органов), снижение или ингибирование дальнейшего метастазирования, уменьшение оппортунистических инфекций, повышение выживаемости, улучшение двигательной функции, улучшение когнитивной функции, улучшение активности (жизнеспособность, уменьшение дискомфорта), улучшение самочувствия, восстановление нормального аппетита, восстановление здорового увеличения массы и их комбинации. Кроме того, регрессию конкретной опухоли у индивидуума (например, в результате лечения, представленного в настоящем описании) также можно оценивать посредством получения образцов злокачественных клеток из очага опухоли, такой как аденокарцинома поджелудочной железы (например, в течение лечения) и тестирования злокачественных клеток на уровень метаболических и сигнальных маркеров для мониторинга состояния злокачественных клеток для проверки на молекулярном уровне регрессии злокачественных клеток до менее злокачественного фенотипа. Например, о регрессии опухоли, индуцируемой способами по настоящему изобретению, будет свидетельствовать обнаружение снижения любого из проангиогенных маркеров, описанных выше, повышения антиангиогенных маркеров, представленных в настоящем описании, нормализации (то есть, изменение в сторону состояния, обнаруживаемого у нормальных индивидуумов, не страдающих злокачественным новообразованием) метаболических путей, межклеточных путей передачи сигнала или внутриклеточных путей передачи сигнала, проявляющих аномальную активность у индивидуумов с диагностированным злокачественным новообразованием. Специалистам в этой области будет понятно, что в некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество можно составлять и/или вводить в однократной дозе. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество можно составлять и/или вводить во множестве доз, например, как часть схемы лечения.

[88] **Вариант:** В рамках изобретения в контексте молекул, например, нуклеиновых кислот, белков или низкомолекулярных соединений, термин "вариант" относится к молекуле, демонстрирующей значительную структурную идентичность по отношению к референсной молекуле, но структурно отличающейся от референсной молекулы, например, по присутствию или отсутствию или по уровню одного или нескольких химических веществ по сравнению с референсным веществом. В некоторых вариантах осуществления вариант также функционально отличается от референсной молекулы. В основном, то, правильно ли считать конкретную молекулу "вариантом" референсной молекулы, основано на степени структурной идентичности по отношению к референсной молекуле. Как будет понятно специалистам в этой области, любая биологическая или химическая референсная молекула имеет конкретные характерные структурные элементы. По определению, вариант является отдельной молекулой, обладающей одним или несколькими такими характерными структурными элементами, но отличающейся по меньшей мере одним аспектом от референсной молекулы. Например, полипептид может иметь характерный элемент последовательности, состоящий из множества аминокислот, имеющих определенные положения относительно друг друга в линейном или трехмерном пространстве и/или вносящих свой вклад в конкретный структурный

мотив и/или биологическую функцию; нуклеиновая кислота может иметь характерный элемент последовательности, состоящий из множества остатков нуклеотидов, имеющих определенные положения относительно друг друга в линейном или трехмерном пространстве. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида или нуклеиновой кислоты может отличаться от референсного полипептида или нуклеиновой кислоты в результате одного или нескольких различий в аминокислотной или нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида или нуклеиновой кислоты проявляет общую идентичность последовательности по отношению к референсному полипептиду или нуклеиновой кислоте, составляющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% или 99%. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида или нуклеиновой кислоты не имеет по меньшей мере один общий характерный элемент последовательности по отношению к референсному полипептиду или нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления референсный полипептид или нуклеиновая кислота имеет один или несколько видов биологической активности. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида или нуклеиновой кислоты имеет один или несколько общих видов биологической активности с референсным полипептидом или нуклеиновой кислотой.

[89] **Вектор.** В рамках изобретения термин относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Одним из типов векторов является "плазмида", являющаяся замкнутой кольцевой двухцепочечной ДНК, в которую можно лигировать дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в случае которого дополнительные сегменты ДНК можно лигировать в вирусный геном. Конкретные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их встраивают (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный участок начала репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) можно встраивать в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина, и, таким образом, он реплицируется вместе с геномом хозяина. Кроме того, конкретные векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в настоящем описании обозначают как "экспрессирующие векторы". Можно использовать стандартные способы рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов, и культивирования и трансформации ткани и (например, электропорацию, липофекцию). Ферментативные реакции и способы очистки можно осуществлять по инструкциям производителя, или как принято в этой области, или как представлено в настоящем описании. Указанные выше способы, как правило, можно осуществлять в соответствии с общепринятыми способами, хорошо известными в этой области и описанными в различных общих и более специализированных источниках, процитированных и описанных на всем протяжении настоящего описания. См. например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), включенный в настоящее описание в качестве ссылки для любой цели.

#### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРИМЕРОВ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ**

[90] Настоящее изобретение, помимо прочего, относится к 4-1ВВ, являющемуся индуцибельной костимуляторной молекулой, и терапевтическим антителам, связывающимся с ним, сконструированным так, что они имеют улучшенные характеристики по сравнению с референсным антителом против 4-1ВВ. Например, сконструированные антитела, представленные в настоящем описании, модифицированы

для повышения аффинности к антигену относительно аффинности референсного агонистического антитела, специфически распознающего эпитоп во внеклеточном домене 4-1BB человека (патент Кореи № 10-0500286, регистрационный номер: КСТС 0952BP). В частности, как представлено в настоящем описании, авторы настоящего изобретения конструировали референсное гуманизованное антитело против 4-1BB человека 94G1 (патент США № 7932045). Как описано в примерах в настоящем описании, последовательности CDR легкой цепи и тяжелой цепи референсного антитела 94G1 отдельно конструировали для повышения аффинности каждой цепи. Кроме того, как представлено в настоящем описании, примеры сконструированных антител против 4-1BB могут эффективно индуцировать пролиферацию активированных Т-клеток. Примечательно, что примеры сконструированных антител против 4-1BB способны индуцировать неожиданно улучшенную активность CD8<sup>+</sup> Т-клеток благодаря стимуляции, вызванной связыванием гуманизованного антитела 4-1BB с молекулой 4-1BB, и ингибированию индуцированной активацией гибели клеток (AICD). Таким образом, настоящее изобретение относится к сконструированным антителам против 4-1BB человека с улучшенными свойствами по сравнению с референсным антителом, и, кроме того, наблюдали, что эти антитела имели неожиданно полезную активность *in vitro* и *in vivo*.

#### 4-1BB

[91] 4-1BB (также обозначаемый как CD137, TNFRSF9 и тому подобное) является рецептором, принадлежащим к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR). 4-1BB является костимуляторной молекулой, как правило, экспрессирующейся в активированных Т-лимфоцитах и вовлеченной в иммунитет и аутоиммунные заболевания (Kwon et al. *PNAS* 84:2896,1987; Kwon et al. *PNAS* (1989) 86:1963; Son et al. *Journal of Immunological Methods* (2004) 286(1-2):187-201, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). 4-1BB человека является белком из 255 аминокислот (регистрационный номер NM\_001561; NP\_001552). Полная аминокислотная последовательность 4-1BB человека представлена в SEQ ID NO:44. 4-1BB экспрессируется на поверхности клеток в мономерной (30 кДа) и димерной (55 кДа) форме и, вероятно, тримеризуется с лигандом 4-1BB для передачи сигнала.

[92] Существующее представление о 4-1BB позволяет предполагать, что он конститутивно экспрессируется на ряде клеток, хотя и на низком уровне, включая Foxp3<sup>+</sup> Treg и дендритные клетки (DC) (см., Vinay and Kwon (2014) *BMB Rep.* 47(3): 122-129, включенную в настоящее описание в качестве ссылки). Активация с использованием ряда агонистов, таких как цитокины (например, ИЛ-2, ИЛ-4), поликлональные активаторы (например, Con A и РНА), молекулы поверхности клетки (например, CD3 и CD28) и стимуляторы индукции Ca<sup>2+</sup> и активности РКС (например, иономицин и форболмиристатацетат), дополнительно повышают экспрессию 4-1BB.

[93] Многочисленные исследования Т-клеток мыши и человека показывают, что 4-1BB способствует усиленной пролиферации клеток, их выживанию и продукции цитокинов (Croft, 2009, *Nat. Rev. Immunol.* 9:271-285). Исследования показывают, что некоторые агонистические моноклональные антитела против 4-1BB могут повышать экспрессию костимуляторных молекул и значительно усиливать ответы цитолитических Т-лимфоцитов, что приводит к противоопухолевой эффективности в различных моделях. Наблюдали эффективность агонистических моноклональных антител против 4-1BB в условиях профилактики и терапии. Кроме того, в моделях опухолей с монотерапией 4-1BB и комбинированным лечением достигали устойчивых противоопухолевых

протективных ответов Т-клеток памяти (Lynch (2008) *Immunol. Rev.* 22: 277-286). Также показано, что агонисты 4-1ВВ ингибируют аутоиммунные реакции во множестве известных в этой области моделей аутоиммунитета (Vinay (2006) *J. Mol. Med.* 84:726-736). Эта двойная активность 4-1ВВ потенциально может обеспечивать  
 5 противоопухолевую активность, при этом снижая аутоиммунные побочные эффекты, которые могут быть ассоциированы с иммунотерапией.

#### **Антитела против 4-1ВВ и их фрагменты**

[94] Настоящее изобретение относится, по меньшей мере частично, к сконструированным антителам против 4-1ВВ человека и их фрагментам, неожиданно проявляющим превосходные характеристики *in vitro* и/или *in vivo*. Например, конкретные  
 10 антитела по изобретению обладают повышенной аффинностью относительно референсного гуманизованного антитела против 4-1ВВ человека.

[95] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает 1, 2 или 3 последовательности CDR  
 15 тяжелой цепи, представляющих собой или включающих последовательность SEQ ID NO:5-8. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает одну или несколько из: CDR1 тяжелой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID  
 20 NO:5, CDR2 тяжелой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID NO:6, и CDR3 тяжелой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID NO:7 или 8. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает каждую из: CDR1 тяжелой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID  
 25 NO:5, CDR2 тяжелой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID NO:6, и CDR3 тяжелой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID NO:7 или 8.

[96] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает 1, 2 или 3 последовательности CDR  
 30 легкой цепи, представляющих собой или включающих последовательность SEQ ID NO: 1-4. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает одну или несколько из: CDR1 легкой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 легкой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR3 легкой цепи, представляющей собой или включающей последовательность  
 35 SEQ ID NO:3 или 4. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает каждую из: CDR1 легкой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID NO:1, CDR2 легкой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID NO:2, и CDR3 легкой цепи, представляющей собой или включающей последовательность SEQ  
 40 ID NO:3 или 4.

[97] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает переменный домен тяжелой цепи, включающий CDR1 тяжелой цепи, представляющую собой или включающую последовательность SEQ ID NO:5, CDR2 тяжелой цепи, представляющую собой или  
 45 включающую последовательность SEQ ID NO:6, и CDR3 тяжелой цепи, представляющую собой или включающую последовательность SEQ ID NO:7 или 8, и/или переменный домен легкой цепи, включающий CDR1 легкой цепи, представляющую собой или включающую последовательность SEQ ID NO:1, CDR2 легкой цепи, представляющую

собой или включающую последовательность SEQ ID NO:2, и CDR3 легкой цепи, представляющую собой или включающую последовательность SEQ ID NO:4.

5 [98] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает переменный домен тяжелой цепи, включающий CDR2 тяжелой цепи, представляющую собой или включающую последовательность SEQ ID NO:6, где 5-ую аминокислоту аспарагин (N) заменяют глутамином (Q), глутаминовой кислотой (E) или серином (S). В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает переменный домен тяжелой цепи, включающий CDR2 тяжелой цепи, 10 представляющую собой или включающую последовательность SEQ ID NO:6, где 5-ую аминокислоту аспарагин (N) заменяют валином (V), глицином (G) или пролином (P).

[99] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает переменный домен легкой цепи, включающий CDR3 легкой цепи, представляющую собой или включающую 15 последовательность SEQ ID NO:3 или 4, где 6-ая аминокислота в LCDR3 является мутантной.

[100] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает переменный домен тяжелой цепи, включающий каркасную область 1 (FR1) тяжелой цепи, содержащую последовательность 20 SEQ ID NO:16 или 17. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает переменный домен тяжелой цепи, включающий каркасную область 3 (FR3) тяжелой цепи, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO:18-20. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает 25 переменный домен тяжелой цепи, включающий каркасную область 1 (FR1) тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO:16 или 17, и каркасную область 3 (FR3) тяжелой цепи, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO:18-20.

[101] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент антитела имеет значительную гомологию по отношению 30 к антителу или фрагменту антитела, включающему переменный домен тяжелой цепи, представляющий собой или включающий последовательность, выбранную из SEQ ID NO:11-14. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает переменный домен тяжелой цепи, представляющий собой или включающий последовательность, по меньшей мере на 35 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4% или 99,5% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO:11-14. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает переменный домен тяжелой цепи, представляющий собой или включающий последовательность, выбранную из SEQ ID NO:11-14.

40 [102] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент антитела имеет значительную гомологию по отношению к антителу или фрагменту антитела, включающему переменный домен легкой цепи, представляющий собой или включающий последовательность SEQ ID NO:9 или 10. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий 45 фрагмент антитела включает переменный домен легкой цепи, представляющий собой или включающий последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4% или 99,5% идентичный последовательности SEQ ID NO:9 или 10. В некоторых вариантах осуществления

антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает переменный домен легкой цепи, представляющий собой или включающий последовательность SEQ ID NO:9 или 10.

[103] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела имеет значительную гомологию по отношению к антителу или фрагменту антитела, включающему переменный домен тяжелой цепи, представляющий собой или включающий последовательность, выбранную из SEQ ID NO:11-14, и переменный домен легкой цепи, представляющий собой или включающий последовательность SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает переменный домен тяжелой цепи, представляющий собой или включающий последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4% или 99,5% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO:11-14, и переменный домен легкой цепи, представляющий собой или включающий последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4% или 99,5% идентичную последовательности SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент антитела включает переменный домен тяжелой цепи, представляющий собой или включающий последовательность, выбранную из SEQ ID NO:11-14, и переменный домен легкой цепи, представляющий собой или включающий последовательность SEQ ID NO:10.

[104] Аминокислотные последовательности антитела против 4-1BB человека или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению можно заменять посредством консервативной замены. Термин "консервативная замена", используемый в настоящем описании, относится к модификации полипептида, в котором одну или несколько аминокислот заменяют аминокислотой, имеющей схожие биохимические свойства, так, чтобы не вызывать утрату биологической или биохимической функции соответствующего полипептида. Термин "консервативный вариант последовательности" или "консервативная аминокислотная замена", используемый в настоящем описании, представляет собой замену аминокислотного остатка аминокислотным остатком, имеющим схожую боковую цепь. Аминокислотные остатки, имеющие схожую боковую цепь, известны в этой области. Эти остатки включают аминокислоты с основной боковой цепью (например, лизин, аргинин и гистидин), аминокислоты с кислой боковой цепью (например, аспарагиновая кислота и глутамат), аминокислоты с незаряженной полярной боковой цепью (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин и цистеин), аминокислоты с неполярной боковой цепью (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин и триптофан), аминокислоты с бета-разветвленной боковой цепью (например, треонин, валин и изолейцин) и аминокислоты с ароматической боковой цепью (например, тирозин, фенилаланин, триптофан и гистидин). Таким образом, ожидают, что антитело по настоящему изобретению может содержать консервативную аминокислотную замену и все равно обеспечивать активность.

[105] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению может включать константную область, выбранную из константного домена IgG1, константного домена IgG2, гибридного константного домена IgG1/IgG2, константного домена IgG4 человека, константного домена IgA, константного домена IgE, константного домена IgM и константного домена IgD.

[106] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению представляет собой или включает IgA, IgD, IgE, IgM, IgG или их варианты.

5 [107] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека по изобретению включает вариант Fc-области, содержащий мутации и/или замены аминокислот в одном или нескольких положениях 234, 235, 236, 237, 238, 239, 253, 254, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 288, 297, 298, 299, 307, 311, 322, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 434 и 435.

10 [108] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению имеет изотип IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению включает вариант IgG1. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент включает полипептид IgG1, содержащий мутацию аминокислоты в одном или нескольких положениях 233, 234, 235, 236, 265, 297, 329, 331 и 322.

15 [109] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент включает полипептид IgG1, содержащий одну или несколько мутаций в L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент включает полипептид IgG1, содержащий две, три, четыре или более мутаций в L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент включает полипептид IgG1 с мутациями в L234A и L235A.

20 [110] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент включает константную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент включает каппа (κ) и/или лямбда- (λ) легкую цепь и/или ее вариант.

25 [111] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент является моноклональным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент является Fab-фрагментом, Fab'-фрагментом, F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом, Fv-фрагментом, Fv-фрагментом, соединенным дисульфидными связями, scFv-фрагментом, однодоменным антителом, Humabody, нанотелом и/или диателом. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент является моновалентным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент является поливалентным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент является мультиспецифическим антителом (например, биспецифическим антителом).

30 [112] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает способы модификации содержания углеводов в антителе по изобретению посредством добавления или делеции участка гликозилирования. Способы модификации содержания углеводов в антителах хорошо известны в этой области и предусмотрены в изобретении, см., например, патент США № 6218149; EP 0 359 096 B1; публикацию США № US 2002/0028486; WO 03/035835; публикацию США № 2003/0115614; патент США № 6218149; патент США № 6472511; все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В других вариантах осуществления настоящее изобретение

включает способы модификации содержания углеводов в антителе по изобретению посредством делеции одной или нескольких эндогенных молекул углеводов в антителе. В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение включает делецию участка гликозилирования Fc-области антитела посредством модификации положения участка гликозилирования Fc-области антитела посредством модификации положения

5 297 из аспарагина в аланин. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент содержит мутацию N297A в домене СН2. В некоторых вариантах осуществления мутация N297A приводит к агликозилированию, снижающему связывание FcR или C1q. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент

10 содержит тяжелую цепь, содержащую Fc-область, содержащую мутацию N297A и мутацию K322A. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую Fc-область, содержащую мутацию N297A и мутацию D265A. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую

15 цепь, содержащую Fc-область, содержащую мутацию N297A, мутацию D265A и мутацию K322A. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент содержит Fc-область с мутацией L234A и/или мутацией L235A. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент содержит Fc-область с одной или несколькими

20 мутациями, выбранными из L234A, L235A, N297A, D265A и K322A. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент содержит Fc-область с двумя или более мутациями, выбранными из L234A, L235A, N297A, D265A и K322A. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент содержит Fc-область с тремя,

25 четырьмя или пятью мутациями, выбранными из L234A, L235A, N297A, D265A и K322A.

[113] Сконструированные гликоформы могут быть полезными для различных целей, включая, в качестве неограничивающих примеров, повышение или снижение эффекторной функции. Сконструированные гликоформы можно получать любым способом, известным специалисту в этой области, например, с использованием сконструированных штаммов или штаммов с вариантом экспрессии, посредством коэкспрессии с одним или несколькими ферментами, например, DI N-ацетилглюкозаминилтрансферазой III (GnTIII), посредством экспрессии молекулы, содержащей Fc-область, в различных организмах или линиях клеток из различных организмов или посредством модификации углеводов после экспрессии молекулы,

30 содержащей Fc-область. Способы получения сконструированных гликоформ известны в этой области и включают, в качестве неограничивающих примеров, способы, описанные в Umana et al, 1999, *Nat. Biotechnol* 17:176-180; Davies et al., 2001 *Biotechnol Bioeng* 74:288-294; Shields et al, 2002, *J Biol Chem* 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, *J Biol Chem* 278:3466-3473, патенте США № 6602684; патентной публикации США № 10/277370; патентной публикации США № 10/113929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1; технологию POTILLEGENT™ (Biowa, Inc. Princeton, N.J.); технологию конструирования гликозилирования GLYCOMAB™ (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland); каждый из которых

35 включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. См., например, WO 00061739; EA01229125; US 20030115614; Okazaki et al., 2004, *JMB*, 336: 1239-49, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[114] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению является агонистом 4-1ВВ человека.

[115] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению связывается с молекулой 4-1BB человека. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению специфически связывается с молекулой 4-1BB человека.

[116] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент связывается с последовательностью, представляющей собой или включающей последовательность SEQ ID NO:15. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом внеклеточного домена 4-1BB, представляющим собой или включающим последовательность SEQ ID NO:15.

[117] В некоторых вариантах осуществления связывание антитела против 4-1BB человека или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению с внеклеточным доменом 4-1BB человека устраняют посредством одной или нескольких мутаций SEQ ID NO:44, выбранных из N30, D38, N39, R41, A56, G57, R60 или T61.

[118] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению связывается с молекулой 4-1BB человека с аффинностью связывания ( $K_D$ ) от  $1 \times 10^{-7}$  до  $1 \times 10^{-12}$  М. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению связывается с молекулой 4-1BB человека с аффинностью связывания ( $K_D$ ) от  $1 \times 10^{-8}$  до  $1 \times 10^{-12}$  М. Аффинность связывания ( $K_D$ ) можно измерять, например, посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием системы BIACORE.

[119] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению связывается с молекулой 4-1BB человека или ее фрагментом с аффинностью связывания ( $K_D$ ) менее  $1,0 \times 10^{-8}$  М. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению связывается с молекулой 4-1BB человека или ее фрагментом с аффинностью связывания ( $K_D$ ) менее  $1,0 \times 10^{-9}$  М. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению связывается с молекулой 4-1BB человека или ее фрагментом с аффинностью связывания ( $K_D$ ) менее  $1,0 \times 10^{-10}$  М.

[120] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению не связывается или слабо связывается с непринадлежащим примату полипептидом 4-1BB (например, полипептидом 4-1BB собаки, мыши и крысы). В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению эффективно связывается с 4-1BB человека или обезьяны. Эта аффинность связывания позволяет предполагать, что структура и/или последовательность эпитопа для антитела против 4-1BB примата может немного отличаться от эпитопа собаки, мыши и крысы.

[121] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению является агонистическим антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению опосредует активацию Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или

антигенсвязывающий фрагмент по изобретению связывается с CD8<sup>+</sup> и/или CD4<sup>+</sup> Т-клетками, экспрессирующими 4-1ВВ человека.

[122] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению не имеет активность ADCC или имеет низкую активность ADCC. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению не имеет активность CDC или имеет низкую активность CDC. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению не имеет активность ADCC и активность CDC или имеет низкую активность ADCC и активность CDC. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению имеет цитолитическую активность ADCC менее приблизительно 20%, менее приблизительно 10%, менее приблизительно 8% или менее приблизительно 5%. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению имеет цитолитическую активность ADCC менее приблизительно 10%. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению имеет цитолитическую активность CDC менее приблизительно 30%, менее приблизительно 20%, менее приблизительно 10%, менее приблизительно 8% или менее приблизительно 5%. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению имеет цитолитическую активность CDC менее приблизительно 20%.

[123] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению отличается низкой токсичностью (например, низкой степенью гибели клеток после введения). В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению отличается низкой гепатотоксичностью. В некоторых вариантах осуществления индивидуум, которому вводили антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению в терапевтической дозе, имеет уровни одного или нескольких из АЛТ, АСТ и общего билирубина в нормальном диапазоне. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению отличается возможностью лечить пациентов в течение длительных периодов с измеримым облегчением симптомов и низкой и/или приемлемой токсичностью. Низкая или приемлемая иммуногенность и/или высокая аффинность, а также другие подходящие свойства могут вносить свой вклад в достигаемые терапевтические результаты. "Низкую иммуногенность" в настоящем описании определяют как вызывание значительных ответов НАНА, НАСА или НАМА у менее чем приблизительно 75% или предпочтительно менее чем приблизительно 50% пациентов, подвергаемых лечению, и/или вызывание низких титров у пациента, подвергаемого лечению (Elliott et al., *Lancet* 344:1125-1127 (1994), включенный в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

#### **Нуклеиновые кислоты**

[124] Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую антитела против 4-1ВВ человека по изобретению и их фрагменты. Антитела против 4-1ВВ человека и их фрагменты, как представлено в настоящем описании, можно получать из молекул нуклеиновой кислоты с использованием способов молекулярной биологии, известных в этой области. Нуклеиновые кислоты по изобретению включают, например, ДНК и/или РНК.

[125] В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты

включают области, кодирующие антитело против 4-1ВВ человека или его фрагмент (например, 94К, 94КV, 94КVТ, EU101). В некоторых вариантах осуществления такие антитела или их фрагменты будут включать области V<sub>H</sub> и/или V<sub>L</sub>. Антитело против 4-1ВВ человека или его фрагмент можно идентифицировать и/или выбирать по желаемому связыванию и/или функциональным свойствам, и переменные области указанного антитела можно выделять, амплифицировать, клонировать и/или секвенировать. Можно осуществлять модификации в нуклеотидных последовательностях V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, включая добавление нуклеотидных последовательностей, кодирующих аминокислоты и/или несущих участки рестрикции, и/или замены нуклеотидных последовательностей, кодирующих аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты может включать или не включать последовательность интрона.

[126] При необходимости, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие антитело против 4-1ВВ человека и их фрагменты (например, 94К, 94КV, 94КVТ, EU101), можно модифицировать так, чтобы они включали кодоны, оптимизированные для экспрессии в конкретном типе клеток или организме (например, см. патент США № 5670356 и патент США № 5874304). Кодон-оптимизированные последовательности являются синтетическими последовательностями и, предпочтительно, кодируют идентичный полипептид (или биологически активный фрагмент полноразмерного полипептида, имеющего, по существу, ту же активность, что и полноразмерный полипептид), кодируемый кодон-неоптимизированный родительский полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления кодирующая область генетического материала, полностью или частично кодирующая компоненты антитела, может включать измененную последовательность для оптимизации использования кодонов для конкретного типа клеток (например, эукариотической или прокариотической клетки). Например, кодирующую последовательность для гуманизированной переменной области тяжелой (или легкой) цепи, как представлено в настоящем описании, можно оптимизировать для экспрессии в бактериальных клетках. Альтернативно, кодирующую последовательность можно оптимизировать для экспрессии в клетке млекопитающего (например, клетке СНО). Такую последовательность можно описывать как кодон-оптимизированную последовательность.

[127] Конструкции нуклеиновой кислоты по изобретению можно встраивать в экспрессирующий вектор или вирусный вектор способами, известными в этой области, и молекулы нуклеиновой кислоты можно функционально связывать с последовательностью контроля экспрессии. Изобретение также относится к вектору, содержащему любую из описанных выше молекул нуклеиновой кислоты или их фрагментов. Любую из указанных выше молекул нуклеиновой кислоты или их фрагментов можно клонировать в любой подходящий вектор и использовать для трансформации или трансфекции любого подходящего хозяина. Выбор векторов и способов их конструирования общеизвестен специалистам в этой области и описан в технических источниках (см., в основном, "Recombinant DNA Part D", *Methods in Enzymology*, Vol. 153, Wu and Grossman, eds., Academic Press (1987)).

[128] В некоторых вариантах осуществления общеупотребительные способы, такие как, например, электрофорез, осаждение фосфатом кальция, трансфекция с DEAE-декстраном, липофекция и тому подобное, можно использовать для встраивания чужеродной нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина. Желательно, вектор может включать регуляторные последовательности, такие как кодоны инициации и терминации транскрипции и трансляции, специфические для типа хозяина (например, бактерии, гриба, растения или

животного), в которого встраивают вектор, при необходимости, при этом необходимо учитывать, основан ли вектор на ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит регуляторные последовательности, специфические для рода хозяина. Предпочтительно, вектор содержит регуляторные последовательности, специфические для вида хозяина.

[129] В дополнение к системе репликации и встраиваемой нуклеиновой кислоте, конструкция нуклеиновой кислоты может включать один или несколько маркерных генов, делающих возможной селекцию трансформированных или трансфицированных хозяев. Маркерные гены включают гены резистентности к биоцидным средствам, например, резистентности к антибиотикам, тяжелым металлам и тому подобное, комплементации в ауксотрофном хозяине для достижения прототрофии и т.п.

[130] Подходящие векторы включают векторы, созданные для размножения и экспансии, или для экспрессии, или для того и другого. Например, клонирующий вектор выбран из группы, состоящей из серии pUC, серии pBluescript (Stratagene, LaJolla, Calif.), серии pET (Novagen, Madison, Wis.), серии pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) и серии pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.). Также можно использовать векторы на основе бактериофагов, такие как  $\lambda$ GT10,  $\lambda$ GT11,  $\lambda$ ZapII (Stratagene),  $\lambda$ EMBL4 и  $\lambda$ NM1149. Примеры растительных экспрессирующих векторов включают pBI110, pBI101,2, pBI101,3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). Примеры экспрессирующих векторов животных включают pEUK-C1, pMAM и pMAMneo (Clontech). Также можно использовать систему клонирования TOPO (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) по инструкциям производителя.

[131] Экспрессирующий вектор может содержать нативный или ненативный промотор, функционально связанный с выделенной или очищенной молекулой нуклеиновой кислоты, как описано выше. Выбор промоторов, например, сильных, слабых, индуцибельных, тканеспецифический и специфических для стадии развития, известен специалистам в этой области. Аналогично, комбинирование молекулы нуклеиновой кислоты или ее фрагмента, как описано выше, с промотором также входит в объем навыков специалиста в этой области.

[132] Подходящие вирусные векторы включают, например, ретровирусные векторы, парвовирусные векторы, например, векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV), AAV-аденовирусные химерные векторы, аденовирусные векторы и лентивирусные векторы, такие как векторы на основе вируса простого герпеса (HSV). Эти вирусные векторы можно получать стандартными способами рекомбинантной ДНК, описанными, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2d edition*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994).

[133] Ретровирусный вектор получают из ретровируса. Ретровирус является РНК-вирусом, способным инфицировать широкий спектр клеток-хозяев. После инфицирования ретровирусный геном интегрируется в геном клетки-хозяина и реплицируется вместе с ДНК клетки-хозяина, таким образом, непрерывно продуцируя вирусную РНК и любую последовательность нуклеиновой кислоты, встроенную в ретровирусный геном. Таким образом, достигают длительной экспрессии терапевтических факторов при использовании ретровируса. Ретровирусы, рассматриваемые для использования в генной терапии, являются относительно непатогенными, хотя существуют патогенные ретровирусы. При использовании патогенных ретровирусов, например, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) или Т-клеточных лимфотропных вирусов человека (HTLV), следует соблюдать осторожность

при изменении вирусного генома для устранения токсичности для хозяина.

Ретровирусный вектор можно дополнительно подвергать манипуляциям, чтобы сделать вирус дефектным по репликации. В связи с этим, ретровирусные векторы считают особенно пригодными для стабильного переноса генов *in vivo*. Lentivirusные векторы, такие как векторы на основе ВИЧ, являются примером ретровирусных векторов, используемых для доставки генов. В отличие от других ретровирусов, векторы на основе ВИЧ, как известно, встраивают переносимые ими гены в неделящиеся клетки, и, таким образом, их можно использовать в лечении персистирующих форм заболевания.

[134] В такие клонирующие и/или экспрессирующие последовательности можно добавлять дополнительные последовательности для оптимизации их функции при клонировании и/или экспрессии, для облегчения выделения полинуклеотида или для улучшения встраивания полинуклеотида в клетку. Использование клонирующих векторов, экспрессирующих векторов, адаптеров и линкеров хорошо известно в этой области. (См., например, Ausubel, выше; или Sambrook, выше).

[135] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты и векторы по изобретению можно выделять и/или очищать. Изобретение также относится к композиции, содержащей описанную выше выделенную или очищенную молекулу нуклеиновой кислоты, необязательно, в форме вектора. Выделенные нуклеиновые кислоты и векторы можно получать стандартными способами, известными в этой области, включая, например, обработку щелочью/SDS, связывание с CsCl, хроматографию на колонках, электрофорез в агарозном геле и другие способы, хорошо известный в этой области. Композиция может содержать другие компоненты, как представлено в настоящем описании.

[136] В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты встраивают в вектор, способный экспрессировать антитело против 4-1BB человека или его фрагмент при встраивании в подходящую клетку-хозяина. Подходящие клетки-хозяева включают, в качестве неограничивающих примеров, клетки бактерий, дрожжей, насекомых и млекопитающих. Примеры клеток-хозяев включают прокариот (например, *E. coli*) и эукариот (например, клетки COS или CHO). Клетки-хозяева млекопитающих, которые можно использовать, включают клетки Hela 293, H9 и Jurkat человек, клетки NIH3T3 и C127 мыши, Cos 1, Cos 7 и CV 1, клетки QC1-3 перепела, L-клетки мыши и клетки яичника китайского хомяка (CHO) (например, клетки DG44). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин млекопитающего, подходящая для экспрессии антитела, может являться клеткой китайского хомяка (CHO) (например, включая клетки DHFR-CHO, используемые вместе с селективным маркером DHFR), миеломной клеткой NSO, клеткой COS или клеткой SP2.

[137] Для конструирования экспрессирующих векторов, кодирующих антитело против 4-1BB человека или его фрагмент по изобретению под контролем сигналов контроля транскрипции/трансляции, можно использовать любые способы, известные специалисту в этой области для встраивания фрагментов ДНК в вектор. Эти способы могут включать способы рекомбинантной ДНК *in vitro*, способы синтеза и рекомбинацию *in vivo* (см., например, Ausubel, выше; или Sambrook, выше).

#### **Получение антител**

[138] Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению можно получать и/или очищать любым способом, известным в этой области, делающим возможным последующее образование стабильного антитела или фрагмента антитела.

[139] Нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело против 4-1BB человека и/или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, легко можно выделять и секвенировать

общепринятыми способами. Например, можно использовать олигонуклеотидный праймер, сконструированный для специфической амплификации соответствующих кодирующих областей тяжелой цепи и легкой цепи из ДНК гибридомы или фаговой матрицы. Выделенные нуклеиновые кислоты можно встраивать в экспрессирующий вектор, а затем можно получать желаемые моноклональные антитела из подходящей клетки-хозяина (то есть, трансформанта), трансформированной посредством встраивания экспрессирующего вектора в клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления способ получения антитела против 4-1ВВ человека и/или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению может включать амплификацию экспрессирующего вектора, включающего, в качестве неограничивающего примера, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело.

[140] В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин является эукариотической клеткой-хозяином, включая, например, клетки дрожжей, высших растений, насекомых и млекопитающих. В зависимости от хозяина, используемого в рекомбинантном получении, антитела и фрагменты антител по изобретению могут быть гликозилированными или негликозилированными. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный экспрессирующий вектор, кодирующий антитело против 4-1ВВ человека и/или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, встраивают в клетку-хозяина млекопитающего, и антитело можно получать посредством культивирования клетки-хозяина в течение достаточного периода времени для экспрессии антитела. В некоторых вариантах осуществления клетку-хозяина млекопитающего культивируют в течение достаточного периода времени для секреции антитела или фрагмента антитела по изобретению в среде для культивирования.

[141] В некоторых вариантах осуществления экспрессируемое антитело по изобретению можно единообразно очищать после выделения из клетки-хозяина. Выделение и/или очистку антитела по изобретению можно осуществлять общепринятым способом выделения и очистки белка. Например, не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что антитело против 4-1ВВ человека и/или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению можно выделять и очищать из культур рекомбинантных клеток хорошо известными способами, включая, в качестве неограничивающих примеров, очистку с протеином А, очистку с протеином G, осаждение сульфатом аммония или этанолом, экстрагирование кислотой, анионообменную или катионообменную хроматографию, хроматографию с фосфоцеллюлозой, хроматографию с гидрофобными взаимодействиями, аффинную хроматографию, хроматографию на гидроксипатите и лектиновую хроматографию. Для очистки также можно использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию ("ВЭЖХ"). См., например, Colligan, *Current Protocols in Immunology*, или *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001), например, главы 1, 4, 6, 8, 9 и 10, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению можно выделять и/или очищать посредством дополнительного комбинирования фильтрации, суперфильтрации, высаливания, диализа и тому подобное.

[142] Очищенные антитела против 4-1ВВ человека и/или антигенсвязывающие фрагменты по изобретению можно охарактеризовывать посредством, например, ELISA, ELISPOT, проточной цитометрии, иммуноцитологии, анализа BIACORE™, анализа кинетики SAPIDYNE KINEXA™, электрофореза в ПААГ в присутствии SDS и вестерн-блоттинга, или посредством анализа ВЭЖХ, а также с помощью ряда других функциональных анализов, представленных в настоящем описании.

### Терапевтическое применение

[143] В рамках изобретения сконструированные антитела против 4-1ВВ человека и антигенсвязывающие фрагменты могут быть полезными для диагностики, профилактики и/или лечения конкретных заболеваний, таких как, например, злокачественные новообразования. В терапевтических способах можно использовать любые из антител против 4-1ВВ или антигенсвязывающих фрагментов, представленных в настоящем описании. Например, антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению можно использовать в качестве иммунотерапевтических средств, например, в лечении злокачественного новообразования.

[144] Настоящее изобретение относится к способам лечения и/или профилактики злокачественного новообразования, включающим введение индивидууму антитела против 4-1ВВ или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. Способы модуляции или лечения по меньшей мере одного злокачественного новообразования в клетке, ткани, органе, животном или пациенте включают, в качестве неограничивающих примеров, лечение злокачественных новообразований и/или воспалительных заболеваний.

[145] Лечение злокачественных опухолей в контексте настоящего изобретения может быть опосредовано повышением цитотоксических Т-клеток и противоопухолевых цитокинов. Как правило, антиген-специфический клеточный иммунитет вызван цитотоксическими Т-клетками и включает два явления передачи сигнала: первое явление передачи сигнала индуцируется, когда Т-клетка распознает антиген из антигенпрезентирующей клетки с помощью рецептора, и второе явление передачи сигнала индуцируется костимуляторными молекулами. Благодаря первым и вторым стимулам повышается активность Т-клеток и связанных с ними факторов, таким образом, приводя к образованию Т-клеток, специфически функционирующих при лечении злокачественных опухолей, и образованные Т-клетки имеют повышенную цитотоксичность, деление клеток, жизнеспособность клеток и секрецию противоопухолевых цитокинов в результате стимуляции костимуляторными молекулами.

[146] В частности, показано, что стимуляция 4-1ВВ может повышать активность CD8<sup>+</sup> Т-клеток, секрецию противоопухолевых цитокинов, таких как интерферон гамма (ИФН $\gamma$ ), экспрессию антиапоптотических молекул, таких как Bcl-2, BclXL и Bfl-1, и/или ингибировать индуцируемую активацией гибель клеток (AICD). В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению может повышать одно или несколько из активности CD8<sup>+</sup> Т-клеток, секреции противоопухолевых цитокинов, таких как интерферон гамма (ИФН $\gamma$ ), экспрессии антиапоптотических молекул, таких как Bcl-2, BclXL и Bfl-1, и ингибирование индуцируемой активацией гибели клеток (AICD). В некоторых вариантах осуществления терапевтическое лечение антителом против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающим фрагментом по изобретению может снижать и/или ингибировать рост злокачественных клеток.

[147] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу задержки или ингибирования роста опухоли, включающему регуляцию секреции цитокинов *in vivo* или *in vitro* посредством введения антитела против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу снижения опухолевой массы, включающему регуляцию секреции цитокинов *in vivo* или *in vitro* посредством введения антитела против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению.

[148] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к

способу лечения злокачественного новообразования или опухоли посредством мониторинга индивидуума со злокачественным новообразованием или опухолью, подлежащего лечению, включающему: (i) введение индивидууму антитела против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, (ii) выделение биологического образца из индивидуума, (iii) измерение секретируемого количества ИФН $\gamma$  или TGF $\beta$  в образце и оценку пропорционального соотношения и (iv) определение терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента посредством сравнения контрольных образцов из индивидуумов, которым вводили или не вводили антитело против 4-1ВВ человека или его антигенсвязывающий фрагмент.

[149] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения индивида, включающему стадию введения индивидууму композиции, содержащей, или с помощью которой доставляют, антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и/или кодирующую его нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет злокачественное новообразование или риск развития злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу профилактики или лечения злокачественного новообразования или опухоли у пациента, включающему введение терапевтически эффективного количества гуманизованного антитела против 4-1ВВ или его антигенсвязывающего фрагмента пациенту со злокачественным новообразованием или опухолью.

[150] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу индукции иммунного ответа у индивида, включающему стадию введения индивидууму композиции, содержащей, или с помощью которой доставляют, антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и/или кодирующую его нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет злокачественное новообразование или риск развития злокачественного новообразования.

[151] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу усиления иммунного ответа или повышения активности иммунной клетки у индивида, включающему стадию введения индивидууму композиции, содержащей, или с помощью которой доставляют, антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и/или кодирующую его нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет злокачественное новообразование или риск развития злокачественного новообразования.

[152] Злокачественные новообразования, подходящие для лечения способом по изобретению, могут включать, в качестве неограничивающих примеров, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстого кишечника, рак эндометрия, рак пищевода, рак маточной трубы, рак желчного пузыря, злокачественное новообразование желудочно-кишечного тракта, рак головы и шеи, гемобластоз, рак гортани, рак печени, рак легких, лимфому, меланому, мезотелиому, рак яичников, первичный рак брюшины, рак слюнных желез, саркому, рак желудка, рак щитовидной железы, рак поджелудочной железы и рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование для лечения антителом против 4-1ВВ или антигенсвязывающим фрагментом по изобретению может включать, в качестве неограничивающих примеров, карциному, лимфому (например, лимфому Ходжкина и неходжкинские лимфомы), бластому, саркому и лейкоз. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование может включать

плоскоклеточную карциному, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легких, плоскоклеточную карциному легких, рак брюшины, печеночноклеточную карциному, рак желудка, рак поджелудочной железы, глиому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, печеночноклеточную карциному, рак молочной железы, рак толстого кишечника, колоректальный рак, карциному эндометрия или матки, карциному слюнных желез, рак почки, рак предстательной железы, рак женских наружных половых органов, рак щитовидной железы, карциному печени, лейкоз и другие лимфопролиферативные нарушения и различные типы рака головы и шеи.

[153] Композицию, включающую антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, можно вводить в фармацевтически эффективном количестве для лечения злокачественных клеток или их метастазов или ингибирования роста злокачественного новообразования. Для использования в терапевтических способах антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению будут составлять, дозировать и вводить способом, соответствующим добросовестной медицинской практике. Рассматриваемые в этом контексте факторы включают конкретное нарушение, подвергаемое лечению, конкретное млекопитающее, подвергаемое лечению, клиническое состояние пациента, возраст пациента, массу тела пациента, причину нарушения, место доставки средства, способ введения, схему введения и другие факторы, известные врачам-терапевтам.

[154] Настоящее изобретение относится к высокоаффинным антителам против 4-1ВВ человека, которые могут иметь свойства, превосходящие свойства референсного антитела. В рамках изобретения эти антитела могут обладать улучшенной способностью индуцировать активацию Т-клеток и/или секрецию цитокинов, таких как ИФН $\gamma$ . Таким образом, в рамках изобретения антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению можно вводить в дозе ниже дозы референсного антитела.

[155] В некоторых вариантах осуществления композицию, включающую антитело против 4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, можно вводить пациенту, при необходимости, в виде болюса или посредством непрерывной инъекции. В некоторых вариантах осуществления болюсное введение является введением Fab против 4-1ВВ по изобретению, и его можно вводить в дозе от 0,0025 до 100 мг/кг, от 0,025 до 0,25 мг/кг, от 0,010 до 0,10 мг/кг или от 0,10 до 0,50 мг/кг. В случае непрерывной инъекции антитело по настоящему изобретению, представленное в виде Fab-фрагмента, можно вводить в дозе от 0,001 до 100 мг/кг/мин, от 0,0125 до 1,25 мг/кг/мин, от 0,010 до 0,75 мг/кг/мин, от 0,010 до 1,0 мг/кг/мин или от 0,10 до 0,50 мг/кг/мин в течение от 1 до 24 часов, от 1 до 12 часов, от 2 до 12 часов, от 6 до 12 часов, от 2 до 8 часов или от 1 до 2 часов. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению является полноразмерным антителом (имеющим полный константный домен). В некоторых вариантах осуществления полноразмерное антитело вводят в дозе приблизительно от 0,01 до 10 мг/кг, от 1 до 8 мг/кг или от 2 до 6 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления полноразмерное антитело вводят посредством инъекции в течение от 30 до 35 минут. Частота введения может варьироваться в зависимости от тяжести состояния. Например, частота может составлять один раз в 2-7 дней, раз в неделю или раз в 1, 2, 3 или 4 недели.

[156] В некоторых вариантах осуществления композицию можно вводить пациенту посредством подкожной инъекции. В частности, антитело можно вводить пациенту в дозе от 0,1 до 100 мг посредством подкожной инъекции один раз в 2-7 дней, раз в неделю,

раз в две недели или раз в месяц.

#### **Способы комбинированного лечения**

[157] Настоящее изобретение относится к терапевтическим способам, включающим введение антитела против 4-1BB человека или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими средствами.

[158] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с одним или несколькими терапевтическими средствами, одобренными для лечения злокачественного новообразования. Например, показано, что комбинированное лечение антителом против 4-1BB и общепринятым химиотерапевтическим средством цисплатином имеет синергическую активность при уничтожении опухоли и профилактики органо-специфической токсичности (Kim et al., *Cancer Research* (2008) 68(18):7264-9).

[159] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством, выбранным из ингибитора иммунных контрольных точек, интерлейкина 12 (ИЛ-12), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), средства против CD4 и химиотерапевтического средства, таким образом, что индивидуума подвергают лечению обоими средствами.

[160] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую химиотерапевтическое средство, таким образом, что индивидуума подвергают лечению обоими средствами. Терапевтические способы по изобретению могут включать введение любого химиотерапевтического средства, известного в этой области. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент.

[161] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую фторурацил. В некоторых вариантах осуществления фторурацил вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую доксорубицин. В некоторых вариантах осуществления доксорубицин вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую иринотекан. В некоторых вариантах осуществления иринотекан вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую паклитаксел. В некоторых вариантах осуществления паклитаксел вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент.

[162] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую цисплатин. В некоторых вариантах осуществления цисплатин вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую циклофосфамид. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент.

[163] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую ГМ-КСФ, таким образом, что индивидуума подвергают лечению обоими средствами. В некоторых вариантах осуществления ГМ-КСФ вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент.

[164] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую ИЛ-12, таким образом, что индивидуума подвергают лечению обоими средствами. В некоторых вариантах осуществления ИЛ-12 вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент.

[165] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую средство против CD4, таким образом, что индивидуума подвергают лечению обоими средствами. В некоторых вариантах осуществления средство против CD4 вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент.

[166] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую ингибитор контрольных точек (например, ингибитор иммунных контрольных точек), таким образом, что индивидуума подвергают лечению обоими средствами. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек вводят индивидууму, которому вводили или будут вводить композицию, содержащую антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент.

[167] Ингибитор контрольных точек, используемый в комбинации с антителом против 4-1BB человека или антигенсвязывающим фрагментом по изобретению, может являться, например, любым ингибитором иммунных контрольных точек. Примеры ингибиторных молекул контрольных точек включают A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, CD277, IDO, KIR, PD-1, LAG-3, TIM-3, TIGIT и VISTA. Термин "ингибитор иммунных контрольных точек" может относиться к любому соединению, ингибирующему функцию ингибиторного белка иммунных контрольных точек. Ингибирование включает снижение функции и полную блокаду. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом, специфически распознающим белок иммунных контрольных точек. Известен ряд ингибиторов иммунных контрольных точек, и в

ближайшем будущем могут быть разработаны альтернативные ингибиторы иммунных контрольных точек по аналогии с этими известными ингибиторами белков иммунных контрольных точек. Ингибиторы иммунных контрольных точек включают, в качестве неограничивающих примеров, пептиды, антитела, молекулы нуклеиновой кислоты и  
5 низкомолекулярные соединения.

[168] В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является ингибитором CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек является антителом, воздействующим на CTLA-4, таким как, например, ипилимумаб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных  
10 точек воздействует на CD366, являющимся трансмембранным белком, также известным как Т-клеточный белок, содержащий иммуноглобулиновый и муциновый домен-3 (TIM-3). В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является средством, ингибирующим передачу сигнала PD-1.

[169] PD-1 (то есть, белок программируемой гибели клеток-1) является белком,  
15 распределенным по поверхности иммунной клетки, такой как Т- или В-клетка, и также известен как CD279. У человека PD-1 экспрессируется с гена PDCD1, находящегося в положении 2p37.3 на хромосоме 2. Известно, что PD-1 связывается с двумя лигандами, PD-L1 и PD-L2.

[170] В некоторых вариантах осуществления средство против PD-1 вводят пациенту,  
20 которому вводят, вводили или будут вводить антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению вводят пациенту, которому вводят, вводили или будут вводить средство против PD-1.

[171] В некоторых вариантах осуществления средство против PD-L1 вводят пациенту,  
25 которому вводят, вводили или будут вводить антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению вводят пациенту, которому вводят, вводили или будут вводить средство  
30 против PD-L1. В некоторых вариантах осуществления средства, ингибирующие PD-L1, включают, например, AMP-244, MEDI-4736, MPDL328 OA, MHN1.

[172] В некоторых вариантах осуществления средство против PD-1 является средством,  
ингибирующим PD-1. В некоторых вариантах осуществления средство против PD-1 является средством, ингибирующим PD-L1 и/или PD-L2. В некоторых вариантах  
35 осуществления средство-антитело, ингибирующее передачу сигнала PD-1, является моноклональным антителом или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления антитело средство, ингибирующее передачу сигнала PD-1, является антителом против PD-1 или его фрагментом.

[173] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 вводят пациенту,  
40 которому вводят, вводили или будут вводить антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению вводят пациенту, которому вводят, вводили или будут вводить антитело против PD-1. Антитела против PD-1 включают, например, ниволумаб, пембролизумаб,  
45 атезолизумаб, дурвалумаб и авелумаб. Пембролизумаб (Keytruda, Merck) является терапевтическим средством на основе антитела, ингибирующим активность PD-1.

[174] Как описано в примерах в настоящей заявке, введение антитела против 4-1BB человека или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению в комбинации с

антителом против PD-1 может повышать эффективность относительно любого из средств в отдельности, а также может снижать общеизвестные побочные эффекты.

5 [175] В некоторых конкретных вариантах осуществления пембролизумаб вводят пациенту, которому вводят, вводили или будут вводить антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению вводят пациенту, которому вводят, вводили или будут вводить пембролизумаб.

10 [176] В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек (например, средство против PD-1) вводят пациенту в количестве от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек (например, средство против PD-1) вводят пациенту в количестве в диапазоне, ограниченном нижним пределом и верхним пределом, при этом верхний предел больше нижнего предела. В некоторых вариантах  
15 осуществления нижний предел может составлять приблизительно 0,01 мг/кг, 0,025 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,075 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 8 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг, 50 мг/кг, 50 мг/кг, 70 мг/кг, 80 мг/кг или 90 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления верхний предел может составлять приблизительно 0,025 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,075 мг/кг, 0,1 мг/кг,  
20 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 8 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг, 50 мг/кг, 50 мг/кг, 70 мг/кг, 80 мг/кг, 90 мг/кг или 100 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек (например, средство против PD-1) можно вводить пациенту в количестве от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до  
25 приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 4 мг/кг, от приблизительно 3 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг или от приблизительно 3 мг/кг до приблизительно 4 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек (например, средство против  
30 PD-1) можно вводить пациенту в количестве приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг или приблизительно 5 мг/кг.

[177] В некоторых вариантах осуществления лечение с использованием комбинации ингибитора иммунных контрольных точек и антитела против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению может повышать пролиферацию,  
35 миграцию, персистирование и/или цитотоксическую активность CD8<sup>+</sup> Т-клеток у индивидуума.

#### **Применение на основе клеток**

[178] Другим объектом настоящего изобретения является способ достижения пролиферации активированных Т-клеток *ex vivo* посредством введения  
40 гуманизированного антитела против 4-1ВВ или его антигенсвязывающего фрагмента.

[179] В некоторых вариантах осуществления способ достижения пролиферации и/или выделения активированных Т-клеток *ex vivo* включает приведение популяции Т-клеток в контакт с антителом против 4-1ВВ или антигенсвязывающим фрагментом по изобретению и, таким образом, повышение пролиферации активированных Т-клеток.  
45

[180] В некоторых вариантах осуществления способ достижения пролиферации активированных Т-клеток *ex vivo* включает введение антитела против 4-1ВВ или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. В некоторых вариантах осуществления активированные Т-клетки подвергают пролиферации и/или выделяют

из образца мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). PBMC можно получать/выделять известными в этой области способами.

5 [181] В некоторых вариантах осуществления способ пролиферации и/или выделения активированных Т-клеток *ex vivo* включает введение моноклонального антитела против CD3 в среду для культивирования (например, в концентрации по меньшей мере приблизительно 0,5 нг/мл). В некоторых вариантах осуществления способ пролиферации и/или выделения активированных Т-клеток *ex vivo* включает введение ИЛ-2 и/или ИЛ-15 в среду для культивирования (например, в концентрации по меньшей мере приблизительно 10 единиц/мл).

10 [182] В некоторых вариантах осуществления способ выделения антиген-специфических активированных Т-клеток включает (а) культивирование мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) в среде вместе с пептидом интересующего эпитопа и ИЛ-2; (b) индуцирование экспрессии 4-1BB в культивируемых клетках посредством добавления пептида интересующего эпитопа; (с) приведение культивируемых клеток в контакт с поверхностью, покрытой антителом против 4-1BB или антигенсвязывающим фрагментом, где культивируемые клетки, экспрессирующие 4-1BB, прикрепляются к покрытой поверхности; и (d) удаление неприкрепившихся клеток и, таким образом, выделение антиген-специфических активированных Т-клеток.

15 [183] В некоторых вариантах осуществления активированные Т-клетки являются CD8<sup>+</sup> Т-клетками.

[184] В некоторых вариантах осуществления лимфоциты (например, Т-клетки) культивируют при температуре по меньшей мере приблизительно 25°C, предпочтительно - по меньшей мере приблизительно 30°C, более предпочтительно - приблизительно 37°C.

25 [185] В рамках изобретения активированные Т-клетки (например, CD8<sup>+</sup> Т-клетки), полученные способами, представленными в настоящем описании, можно использовать в терапии (например, для лечения злокачественных новообразований).

#### **Клеточная терапия**

30 [186] Настоящее изобретение относится к способам селективного выделения и массового культивирования CD8<sup>+</sup> Т-клеток, распознающих аутологичный антиген злокачественной опухоли (собственный антиген опухоли), например, аутологичный антиген злокачественной опухоли гиперэкспрессированный в злокачественных клетках, но присутствующий в небольшом количестве в нормальных клетках. В рамках изобретения клетки (например, CD8<sup>+</sup> Т-клетки), выделенные этими способами, могут быть применимыми для лечения злокачественного новообразования.

35 [187] В некоторых вариантах осуществления способ лечения и/или профилактики злокачественного новообразования у индивида включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества активированных Т-клеток, полученных способом *ex vivo*, таким как способы, представленные в настоящем описании.

40 [188] После соответствующей реактивации специфические в отношении опухолевого антигена Т-клетки могут распознавать и устранять аутологичные опухолевые клетки. Например, специфические в отношении опухолевого антигена Т-клетки можно получать *ex vivo* способами, представленными в настоящем описании. После адоптивного переноса специфически реактивированные Т-клетки от пациентов со злокачественными новообразованиями могут эффективно приводить к отторжению аутологичных опухолей человек *in vivo*.

45 [189] Настоящее изобретение относится к способам профилактики и/или лечения

злокачественного новообразования и/или опухоли у пациента, включающим введение терапевтически эффективного количества активированных Т-клеток, полученных *ex vivo* посредством введения антитела против 4-1ВВ или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению.

5 [190] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки для использования в терапевтическом способе являются аллогенными (принадлежащими тому же виду, но от другого донора) для индивидуума-реципиента. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки для использования в терапевтическом способе являются аутологичными (донор и реципиент являются одним и тем же индивидуумом). В некоторых вариантах  
10 осуществления Т-клетки для использования в терапевтическом способе являются сингенными (донор и реципиенты являются разными индивидуумами, при этом являясь идентичными близнецами).

[191] В некоторых вариантах осуществления клетки составляют, сначала собирая их из среды для культивирования, а затем промывая и концентрируя клетки в системе  
15 сред и контейнеров, подходящей для введения ("фармацевтически приемлемый" носитель) в терапевтически эффективном количестве. Подходящая инфузионная среда может являться любым изотоническим составом среды, как правило, нормальным физиологическим раствором, Normosol R (Abbott) или Plasma-Lyte A (Baxter), но также можно использовать 5%-ный раствор декстрозы в воде или лактат Рингера.  
20 Инфузионную среду можно дополнять сывороточным альбумином человека.

[192] Терапевтически эффективное количество клеток в композиции составляет по меньшей мере  $10^8$ , как правило, более  $10^8$ , по меньшей мере  $10^9$  клеток и, как правило, более  $10^{10}$ . Количество клеток будет зависеть от конечного использования, для которого  
25 предназначена композиция, а также типа клеток, включенных в нее. Например, если желательны клетки, специфические для конкретного антигена, популяция будет содержать более 70%, как правило, более 80%, 85% и 90-95% таких клеток. Для использования, представленного в настоящем описании, клетки, как правило, находятся в объеме, составляющем литр или менее. В некоторых вариантах осуществления клетки  
30 для введения находятся в объеме менее 500 мл, менее 250 мл или 100 мл или менее. В некоторых вариантах осуществления плотность желаемых клеток, как правило, составляет более  $10^6$  клеток/мл и, как правило, более  $10^7$  клеток/мл, как правило,  $10^8$  клеток/мл или более. Клинически значимое количество иммунных клеток можно  
35 разделять на множество инфузий, в совокупности равных или превышающих  $10^8$  клеток,  $10^9$  клеток,  $10^{10}$  клеток,  $10^{11}$  клеток или  $10^{12}$  клеток.

#### Композиции

[193] Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим антитела и антигенсвязывающие фрагменты, специфически связывающиеся с эпитопом полипептида  
40 4-1ВВ человека. Композиции по изобретению (например, композиции, с помощью которых доставляют антитело против 4-1ВВ человека или фрагмент антитела) могут включать любое подходящее и эффективное количество композиции для использования в доставке антитела против 4-1ВВ человека или фрагмента антитела по изобретению в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в такой модуляции,  
45 лечении или терапии. Настоящее изобретение также относится к композициям, включающим популяции активированных клеток (например, популяцию активированных Т-клеток), полученных способом по изобретению (например, включающим стадию приведения клетки в контакт с антителом против 4-1ВВ человека или фрагментом антитела).

[194] Композиции по изобретению включают фармацевтические композиции, включающие антитело против 4-1ВВ человека или антигенсвязывающий фрагмент, представленный в настоящем описании, и/или популяцию клеток, полученную способом, представленным в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может включать буфер, дилуент, эксципиент или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления композиция, при желании, также может содержать одно или несколько дополнительных терапевтически активных веществ.

[195] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ, антигенсвязывающий фрагмент и/или популяция клеток по изобретению подходят для введения млекопитающему (например, человеку). Хотя описание фармацевтических композиций, представленное в настоящем описании, принципиально направлено на фармацевтические композиции, подходящие для соответствующего этическим нормам введения людям, специалистам в этой области будет понятно, что такие композиции, как правило, подходят для введения животным всех видов. Модификация фармацевтических композиций, подходящих для введения людям, предназначенная для того, чтобы сделать композиции подходящими для введения различным животным, хорошо понятна, и как правило, ветеринар-фармаколог может создавать и/или осуществлять такую модификацию исключительно посредством обычного экспериментирования, если оно вообще имеет место.

[196] В некоторых вариантах осуществления композиции составляют для парентерального введения. Например, фармацевтическую композицию, представленную в настоящем описании, можно предоставлять в стерильной инъекционной форме (например, в форме, подходящей для подкожной инъекции или внутривенной инфузии). Например, в некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции предоставляют в жидкой лекарственной форме, подходящей для инъекции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию предоставляют в виде порошков (например, лиофилизированных и/или стерилизованных), необязательно, под вакуумом, которые можно восстанавливать с использованием водного дилуента (например, воды, буфера, солевого раствора и тому подобное) перед инъекцией. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию разводят и/или восстанавливают в воде, растворе хлорида натрия, растворе ацетата натрия, растворе бензилового спирта, фосфатно-солевом буфере и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления порошок необходимо осторожно смешивать с водным дилуентом (например, не встряхивать).

[197] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ, антигенсвязывающий фрагмент и/или популяцию клеток по изобретению составляют с фармацевтически приемлемым парентеральным носителем. Примерами таких носителей являются вода, физиологический раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и 1-10% сывороточный альбумин человека. Также можно использовать липосомы и неводные носители, такие как жирные масла. Носитель или лиофилизированный порошок может содержать добавки, поддерживающие изотоничность (например, хлорид натрия, маннит) и химическую стабильность (например, буферы и консерванты). В некоторых вариантах осуществления состав стерилизуют известными или подходящими способами.

[198] Составы фармацевтических композиций, представленных в настоящем описании, можно получать любым способом, известным или разработанным в области фармакологии. В основном, такие способы получения включают стадию объединения

активного ингредиента с дилуэнтном или другим эксципиентом и/или одним или несколькими другими вспомогательными ингредиентами, а затем, при необходимости и/или желании, придания формы и/или упаковки продукта в желаемую лекарственную форму в однократной или многократных дозах.

5 [199] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, включающую антитело против 4-1BB, антигенсвязывающий фрагмент и/или популяцию клеток по изобретению, можно включать в контейнер для хранения или введения, например, сосуд, шприц (например, шприц IV) или мешок (например, мешок IV). Фармацевтическую композицию по изобретению можно получать, упаковывать и/или  
10 продавать в нерасфасованной форме, в виде однократной стандартной дозы и/или в виде множества однократных стандартных доз. В рамках изобретения "стандартная доза" является отдельным количеством фармацевтической композиции, содержащей заранее определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента, как правило, равно дозе активного ингредиента, которую будут вводить  
15 индивидууму, и/или удобной части такой дозы, такой как, например, половина или треть такой дозы.

[200] Относительные количества активного ингредиента, фармацевтически приемлемого эксципиента и/или любых дополнительных ингредиентов в фармацевтической композиции по изобретению будет варьироваться в зависимости от  
20 типа, размера и/или состояния индивидуума, подвергаемого лечению, а также от пути введения композиции. В примерах ниже частично описывают дозы примера антитела против 4-1BB человека для грызуна. В этой области известны стандартные способы масштабирования доз для животных. См., например, *J Basic Clin Pharm.* March 2016-May 2016; 7(2): 27-31, включенный в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.  
25 В качестве примера, композиция может содержать от 0,1% и 100% (масс./масс.) активного ингредиента.

[201] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит, или с помощью нее доставляют, антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению в дозе от 0,01 мг/кг до 100 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления  
30 композиция содержит, или с помощью нее доставляют, антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент в дозе в диапазоне, ограниченном нижним пределом и верхним пределом, при этом верхний предел больше нижнего предела. В некоторых вариантах осуществления нижний предел может составлять приблизительно 0,01 мг/кг, 0,025 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,075 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг, 1 мг/кг,  
35 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 8 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг, 50 мг/кг, 50 мг/кг, 70 мг/кг, 80 мг/кг или 90 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления верхний предел может составлять приблизительно 0,025 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,075 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 8 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг, 50 мг/кг, 50 мг/кг, 70 мг/кг, 80 мг/кг,  
40 90 мг/кг или 100 мг/кг.

[202] Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый эксципиент, в рамках изобретения включающий любой и все растворители, дисперсионные среды, дилуэнты или другие жидкие носители, диспергирующие или суспендирующие средства, поверхностно-активные средства,  
45 изотонические средства, загустители или эмульгаторы, консерванты, твердые связывающие средства, смазочные средства и т.п. в соответствии с конкретной желаемой лекарственной формой. В Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006) описывают различные

эксципиенты, используемые в составлении фармацевтических композиций, и известные способы их получения. За исключением случаев, когда любая общепринятая среда-эксципиент несовместима с веществом или его производными, например, приводит к нежелательному биологическому эффекту или иному неблагоприятному взаимодействию с любыми другими компонентами фармацевтической композиции, ее использование входит в объем изобретения.

[203] В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый эксципиент является по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100% чистым. В некоторых вариантах осуществления эксципиент одобрен для использования на людях и животных. В некоторых вариантах осуществления эксципиент одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов. В некоторых вариантах осуществления эксципиент имеет фармацевтическую категорию. В некоторых вариантах осуществления эксципиент соответствует стандартам Фармакопеи США (USP), Европейской фармакопеи (EP), Фармакопеи Великобритании и/или Международной фармакопеи.

[204] Фармацевтически приемлемые эксципиенты, используемые в производстве фармацевтических композиций, включают, в качестве неограничивающих примеров, инертные дилуенты, диспергирующие и/или гранулирующие средства, поверхностно-активные средства и/или эмульгаторы, разрыхлители, связывающие средства, консерванты, буферные средства, смазки и/или масла. Такие эксципиенты, необязательно, можно включать в фармацевтические составы. Эксципиенты, такие как масло какао и воски для суппозиторий, красители, покрывающие средства, подсластители, вкусовые добавки и/или ароматизаторы, могут присутствовать в композиции по решению разработчика рецептур.

[205] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по изобретению содержит один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов (например, консервант, инертный дилуент, диспергирующее средство, поверхностно-активное средство и/или эмульгатор, буферное средство и тому подобное). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит один или несколько консервантов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции не содержат консервант.

[206] В некоторых вариантах осуществления композиция, включающая антитело против 4-1BB человека или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, составлена в виде стабильного состава. В некоторых вариантах осуществления стабильный состав антитела против 4-1BB человека или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению может содержать фосфатный буфер с физиологическим раствором или выбранной солью, а также консервированные растворы и составы, содержащие консервант, а также универсальные консервированные составы, подходящие для фармацевтического или ветеринарного использования. Консервированные составы содержат по меньшей мере один известный консервант, необязательно, выбранный из группы, состоящей из по меньшей мере одного из фенола, m-крезола, p-крезола, o-крезола, хлорокрезола, бензилового спирта, нитрита фенилртути, феноксиэтанола, формальдегида, хлорбутанола, хлорида магния (например, гексагидрата), алкилпарабена (метил-, этил-, пропил-, бутил- и т.п.), хлорида бензалкония, хлорида бензетония, дегидроацетата натрия и тиомерсала или их смесей в жидком дилуенте. Можно использовать любую подходящую концентрацию или смесь, как известно в этой области, такую как 0,001-5%, или любой диапазон или значение в нем, в качестве неограничивающих примеров,

такое как 0,001, 0,003, 0,005, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,3, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или любой диапазон или значение в нем. Неограничивающие примеры не включают консервант, включают

5 0,1-2% *m*-крезола (например, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,1-3% бензилового спирта (например, 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5%), 0,001-0,5% тиомерсала (например, 0,005, 0,01), 0,001-2,0% фенола (например, 0,05, 0,25, 0,28, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,0005-1,0% алкилпарабенов (например, 0,00075, 0,0009, 0,001, 0,002, 0,005, 0,0075, 0,009, 0,01, 0,02, 0,05, 0,075, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 0,9, 1,0%) и т.п.

10 [207] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию предоставляют в форме, которую можно охлаждать и/или замораживать. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию предоставляют в форме, которую нельзя охлаждать и/или замораживать. В некоторых вариантах осуществления восстановленные растворы и/или жидкие лекарственные формы можно хранить в

15 течение конкретного периода времени после восстановления (например, 2 часа, 12 часов, 24 часа, 2 дня, 5 дней, 7 дней, 10 дней, 2 недели, месяц, два месяца или более). В некоторых вариантах осуществления хранение композиций антител в течение периода, превышающего указанное время, приводит к деградации антитела.

[208] Жидкие лекарственные формы и/или восстановленные растворы могут

20 содержать твердые частицы и/или изменять цвет перед введением. В некоторых вариантах осуществления раствор не следует использовать, если он изменил цвет или помутнел, и/или если после фильтрации остались твердые частицы.

[209] Общие положения, касающиеся составления и/или производства фармацевтических средств, можно найти, например, в Remington: The Science and Practice

25 of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

### **Наборы**

[210] Настоящее изобретение также относится к фармацевтической упаковке или набору, содержащему один или несколько контейнеров, наполненных по меньшей мере

30 одним антителом против 4-1ВВ человека или фрагментом антитела, как представлено в настоящем описании. Наборы можно использовать в любом приемлемом способе, включая, например, терапевтические способы, диагностические способы, способы достижения пролиферации и/или выделения клеток и тому подобное. Необязательно, к таким контейнерам можно прилагать уведомление в форме, предписанной

35 государственным органом, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических средств или биологических продуктов, при этом в уведомлении отражено (а) одобрение органом производства, использования или продажи для введения человеку, (b) инструкция по использованию, или и то, и другое.

[211] В некоторых вариантах осуществления набор может включать один или несколько реагентов для детекции (например, детекции антитела против 4-1ВВ человека

40 или фрагмента антитела). В некоторых вариантах осуществления набор может включать антитело против 4-1ВВ человека или фрагмент антитела в детектируемой форме (например, ковалентно связанным с детектируемым веществом).

[212] В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или фрагмент антитела, представленные в настоящем описании, можно включать в набор,

45 используемый для лечения индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления антитело против 4-1ВВ человека или фрагмент антитела, представленные в настоящем описании, можно включать в набор, используемый для пролиферации и/или выделения Т-клеток (например, CD8<sup>+</sup> Т-клеток).

[213] Содержание всех ссылок (включая литературные ссылки, выданные патенты, опубликованные патентные заявки и рассматриваемые патентные заявки), процитированных на всем протяжении настоящей заявки, таким образом, включено в нее в качестве ссылки.

5 [214] Другие признаки изобретения будут очевидны из следующего описания примеров вариантов осуществления. Однако следующие примеры представлены исключительно для иллюстрирования настоящего изобретения, но объем настоящего изобретения ими не ограничен.

### **ПРИМЕРЫ**

10 [215] Настоящее изобретение относится, по меньшей мере частично, к гуманизированным антителам против 4-1ВВ человека и их фрагментам с улучшенными свойствами, имеющими один или несколько структурных признаков, не обнаруживаемых в референсном гуманизованном антителе против 4-1ВВ человека 94G1. 94G1 получали посредством гуманизации антитела мыши против 4-1ВВ человека ВВК-4. Антиген-  
15 распознающие участки (области CDR) определяли с использованием определения петель CDR (*IMGT*: Lefranc, 1997) и модели 3-D (Swiss-Pdb Viewer ([www.expasy.org](http://www.expasy.org))). Получали библиотеку фагового дисплея с разнообразием всего 10 участков, включая 4 участка в аминокислотной последовательности легкой цепи и 6 участков в тяжелой цепи. После пэннинга выбирали приблизительно 14 клонов гуманизованного антитела из 1000  
20 клонов (всего для шести гуманизованных scFv) и из выбранных клонов получали 94G1 (Son et al. *J. Immunol. Methods* (2004) 286: 187-201). Эти гуманизованные антитела, включая 94G1, имели аффинности к антигену 4-1ВВ человека, составлявшие менее 1/10 от аффинности ВВК-4, но были активными *in vitro*. В рамках изобретения структурные варианты 94G1 могут иметь улучшенные свойства. Получение и характеристика  
25 вариантов гуманизованных антител против 4-1ВВ человека и их фрагментов более подробно описаны в следующих примерах.

#### **Пример 1 - Получение гуманизованных антител против 4-1ВВ человека**

[216] В этом примере описывают получение примеров антител против 4-1ВВ человека с улучшенной аффинностью по сравнению с референсным антителом 94G1. 94G1  
30 получали посредством гуманизации антитела мыши против 4-1ВВ человека (ВВК 4), как описано в Son et al. *J. Immunol. Methods* (2004) 286: 187-201, включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В настоящем описании также использовали антиген Н4-1ВВ (регистрационный номер: КСТС 0952ВР), конкретно выделенный из активированных Т-клеток (например, линии активированных Т-клеток) и  
35 неидентифицируемый в нестимулированных Т-клетках. Например, антиген Н4-1ВВ можно выделять из Т-клеток, подвергнутых созреванию с помощью форболмиристатацетата (РМА), иономицина, конканавалина А или средства против CD3i. Этот антиген Н4-1ВВ имеет размер 1,4 т.п.н. и 60% гомологии в отношении 4-1ВВ мыши (Garni-Wagner et al., *Cellular Immunology* (1996) 169: 91-98, включенная в настоящее  
40 описание в качестве ссылки в полном объеме). В этом примере 94G1 распределяли по векторам для легкой цепи и тяжелой цепи, каждый из которых оптимизировали для получения улучшенных гуманизованных антител.

[217] В рамках изобретения подходящий способ получения улучшенных гуманизованных антител против 4-1ВВ человека или их фрагментов включает  
45 однократные, постепенные замены аминокислот и/или их комбинации. Настоящее изобретение относится к различным структурным вариантам гуманизованных антител против 4-1ВВ человека и их фрагментам с одним или несколькими структурными признаками (например, заменами аминокислот), необнаруживаемыми в антителе 94G1.

В рамках изобретения структурные признаки можно комбинировать для постепенного улучшения одного или нескольких свойств антител (например, повышенной аффинности к антигену).

[218] Сначала гуманизованное антитело против 4-1ВВ человека с повышенной аффинностью относительно референсного антитела 94G1 получали посредством изменения области CDR легкой цепи, а не тяжелой цепи. Этот структурный вариант легкой цепи являлся фиксированным, и его комбинировали со структурными вариантами тяжелых цепей гуманизованного антитела против 4-1ВВ человека, например, с мутациями области CDR 94G1. Для получения гуманизованных антител против 4-1ВВ человека с высокой аффинностью и/или другими улучшенными характеристиками включали дополнительные структурные признаки.

### 1.1 Конструирование векторов

[219] Векторы с легкой цепью 94G1 и тяжелой цепью 94G1, соответственно, конструировали посредством изменения рComb3Н-НА для экспрессии в Fab-типе для улучшения тяжелой цепи и легкой цепи гуманизованного антитела в *E. coli* (*J. Immunol Methods* (2008) 329(1-2):176-83; *Virology* (2004) 318: 598). В частности, легкую цепь 94G1 встраивали в вектор, сконструированный посредством изменения метки AP2 (SEQ ID NO:42 - NANNPDWDFNP) с использованием метки flag (SEQ ID NO:43 - DYKDDDDK), и метку flag располагали ниже ее, и вектор содержал последовательность тяжелой цепи человека (регистрационный номер АВ019438), полученную с использованием известных данных из NCBI GenBank, помещенную в качестве константного домена в положении тяжелой цепи. Кроме того, после клонирования последовательности легкой цепи 94G1 в вектор, его переносили в *E. coli* (например, TG1) (F' [traD36 proAB+lacIqlacZΔM15]supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB- hsdSM)5, (rK-mK-)) посредством трансформации с последующей селекцией трансформированного вектора, названного рCOM-Fab-94G1-L, используемого в качестве остова для индукции созревания аффинности легкой цепи (таблица 1). Описанный выше способ осуществляли аналогичным образом для тяжелой цепи 94G1, и подвергнутый селекции вектор назвали рCOM-Fab-94G1-Н. Улучшенную легкую цепь 94/w конструировали как легкую цепь рCOM-Fab-94G1, служащего в качестве остова для получения вариантов тяжелой цепи с улучшенной аффинностью.

[220] Таблица 1 - Аминокислотные последовательности LCDR 94G1 и 94/w

SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность	CDR
SEQ ID NO:1	QTISDY	LCDR 1
SEQ ID NO:2	YAS	LCDR 2
SEQ ID NO:3	QDGHSPPT	LCDR 3
SEQ ID NO:4	QDGHWPPT	LCDR 3.6, вариант 94/w

### 1.2 Созревание аффинности легкой цепи гуманизованного антитела против 4-1ВВ человека

[221] В настоящем описании представлена разработка гуманизованного антитела против 4-1ВВ человека с вариантом легкой цепи, имеющим улучшенную аффинность связывания. Антитело с высокой аффинностью получали посредством изменения LCDR3 (SEQ ID NO:3) легкой цепи 94G1 в контексте вектора рCOM-Fab-94G1-L, описываемого выше, следующим образом. Различные последовательности ДНК, кодирующие легкую цепь, амплифицировали посредством ПЦР с использованием праймеров [с использованием NNS (N: А, Т, С, G; S: С, G)], сконструированных для встраивания 19 различных аминокислот в каждое положение аминокислоты из 9 аминокислот SEQ ID NO:3, составляющих LCDR3-часть легкой цепи 94G1. Амплифицированные продукты лигировали в вектор в положение легкой цепи, а затем с помощью него

трансформировали *E. coli* TG1. Все клоны со структурными вариантами Lcdr3 легкой цепи подвергали заменам в различных формах и собирали для получения смесей девяти положений. Для оценки того, замещено ли каждое положение аминокислоты разными аминокислотами, случайным образом выбирали два клона, измененные в  
 5 соответствующих положениях, и анализировали посредством секвенирования с использованием секвенатора ABI-3730xl, определяя, что аминокислотные остатки в соответствующих положениях были заменены в различных положениях.

[222] Для определения того, имеют ли варианты Fab 94G1 с мутациями в различных положениях Lcdr3 повышенную аффинность антитела, каждую смесь положений  
 10 экспрессировали посредством добавления IPTG (до конечной концентрации 1 мМ) к *E. coli* TG1, а затем антитело Fab, присутствующее в супернатанте, подвергали ELISA. В частности, каждую смесь положений культивировали со встряхиванием в среде 2YT в инкубаторе при 37°C до достижения культурой поглощения 600 нм 0,8 или более, а затем культивировали в течение ночи при 30°C с IPTG (например, в конечной  
 15 концентрации 1 мМ). На следующий день осуществляли ELISA супернатанта, полученного посредством центрифугирования при 12000 об./мин. в течение 10 минут при 4°C. Определяли аффинности связывания для различных вариантов Fab Lcdr3 94G1, разделяя активности связывания каждого клона в отношении Fab против 4-1BB на уровне экспрессии соответствующего мутантного клона. Вариант Lcdr3 94G1 с  
 20 мутацией в положении 6 Lcdr3 (Lcdr3.6) демонстрировал наиболее высокую аффинность связывания.

[223] Затем для определения того, как различные мутации 94G1 в положении Lcdr3.6 влияют на аффинность антитела, из смеси положений pCOM-Fab94G1-Lcdr3.6 выделяли  
 25 25 моноклональных антител и экспрессировали их посредством добавления IPTG (например, в конечной концентрации 1 мМ) к *E. coli* (например, TG1), осуществляли культивирование и ELISA антитела Fab, присутствующего в супернатанте. Аффинности связывания определяли для различных клонов Lcdr3.6 94G1, разделяя активности связывания Fab против 4-1BB каждого клона на уровне их экспрессии.

[224] Вариант Lcdr3.6 94G1 с фенилаланином в положении Lcdr3.6, замещенным  
 30 триптофаном, демонстрировал наиболее высокую аффинность связывания. Антитело Fab, полученное посредством замены константной области тяжелой цепи pCOM-Fab94G1-L тяжелой цепью остова 94G1 на улучшенной легкой цепи 94G1, называли 94/w. Таким образом, вариант 94/w включает улучшенную легкую цепь 94G1, в которой 6-ую аминокислоту Lcdr3 заменяют триптофаном (W) (QDGHSPPT - SEQ ID NO:4),  
 35 и тяжелую цепь 94G1. Для определения аффинности связывания использовали индуцированную IPTG экспрессию в *E. coli* и ELISA Fab 94/w, как описано выше. Используя этот способ, определяли, что антитело Fab 94/w имеет активность связывания, в 3,5 раз превышающую активность 94G1 (антитела Fab) (данные не представлены).

### 1.3 Созревание аффинности CDR тяжелой цепи гуманизованного антитела против 40 4-1BB человека

[225] В настоящем описании представлена разработка гуманизованных антител против 4-1BB человека со структурными вариантами тяжелой цепи, имеющих  
 улучшенную аффинность связывания. Для получения дополнительно улучшенных антител против 4-1BB человека использовали легкую цепь 94/w, как описано выше, а  
 45 тяжелую цепь 94G1 подвергали созреванию аффинности. В таблице 2 ниже представлены аминокислотные последовательности HCDR тяжелой цепи референсного антитела 94G1.

[226] Таблица 2 - Аминокислотные последовательности HCDR 94G1 и 94K

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	CDR
------------	-----------------------------------	-----

SEQ ID NO:5	GYTFSSYW	HCDR 1
SEQ ID NO:6	INPGNGHT	HCDR 2
SEQ ID NO:7	ARSFTTARAFAY	HCDR 3
SEQ ID NO:8	ARSFKTARAFAY	HCDR 3.5, вариант 94K

5 [227] Улучшение тяжелой цепи с использованием 94/w в качестве начальной последовательности осуществляли способами, схожими с описанными для легкой цепи 94G1 выше. В частности, для улучшения тяжелой цепи 94G1 аминокислотные остатки заменяли различными аминокислотами в соответствующих положениях аминокислот HDR2 и/или HCDR3. В случае третьего CDR тяжелой цепи (HCDR3, SEQ ID NO:7)

10 получали клоны со случайными заменами аминокислотных остатков HCDR3 94/w различными аминокислотами, и собирали их для получения 12 смесей положений. Также получали мутантный клон с увеличенной длиной HCDR3. Когда 5-ый аминокислотный остаток HCDR3 заменяли другой аминокислотой, наблюдали повышение аффинности. Затем для определения того, как различные мутации в положении HCDR3.5 влияют на

15 аффинность антитела 94/w, 19 моноклональных антител выделяли из смеси положений, в которой положение HCDR3.5 антитела 94/w подвергали случайной замене. Варианты Fab HCDR3.5 экспрессировали в *E. coli* посредством добавления IPTG (например, в концентрации 1 мМ) и осуществляли ELISA с использованием антитела Fab, присутствующего в супернатанте. Посредством секвенирования определяли, что при

20 замене треонина лизином в положении HCDR3.5 (5-ом положении) (SEQ ID NO:8 - ARSFKTARAFAY) достигали наиболее высокой аффинности, и полученный продукт называли 94K/w.

[228] В случае второй CDR тяжелой цепи (HCDR2) смесь положений получали посредством случайной замены каждой из 9 аминокислот HCDR2 94G1 (SEQ ID NO:6),

25 подвергая ее ELISA. Результаты ELISA свидетельствовали о том, что при изменении аминокислотных остатков во 2-ом, 5-ом и 6-ом положениях аффинность повышалась. Из каждой из смесей положений 94/w HCDR2.2, HCDR2.5 и HCDR2.6 выделяли 22, 19 и 36 моноклональных антител, соответственно, и анализировали активность связывания каждого клона с 4-1ВВ в зависимости от уровня экспрессии Fab. В случае HCDR2.5

30 значение, полученное посредством ELISA, было относительно более высоким, чем в случае замены аспарагина валином (V), глицином (G) или пролином (P). Кроме того, судя по данным секвенирования тяжелых цепей антитела, существовал риск дезамидирования 5-ой аминокислоты, аспарагина (N), HCDR2 (SEQ ID NO:6), а также получали последовательности вариантов HCDR2 с заменами в этом остатке каждым

35 из глутамина (Q), глутаминовой кислоты (E) и серина (S).

[229] ДНК структурных вариантов 94G1 с мутациями в HCDR3 и/или HDR2 тяжелой цепи, полученных, как описано выше, амплифицировали посредством ПЦП с использованием последовательность трех оснований NNS, лигировали с положением тяжелой цепи в векторе, содержащем константный домен легкой цепи 94/w, а затем с его помощью трансформировали *E. coli* TG1 способом, использованным для улучшения легкой цепи, как описано выше.

#### 1.4 Оптимизация каркасных областей тяжелой цепи гуманизированного антитела против 4-1ВВ человека

[230] Также получали варианты тяжелой цепи с оптимизированными каркасными последовательностями. Например, получали каркасные области 1 (FR1) тяжелой цепи, в которых FR1 тяжелой цепи (SEQ ID NO:16) модифицировали таким образом, что 5-ую аминокислоту глутамин (Q) заменяли валином (V). Примеры областей FR1 представлены в таблице 3 ниже.

## [231] Таблица 3 - FR1 тяжелой цепи 94G1 и ее варианты

SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность	
SEQ ID NO:16	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKAS	94G1 FR1
SEQ ID NO:17	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKAS	FR1 Gln 5 Val

[232] Кроме того, получали каркасные области 3 (FR3), в которых FR3 тяжелой цепи (SEQ ID NO:18) модифицировали таким образом, что 10-ую аминокислоту аланин (A) и/или 33-ю аминокислоту серин (S), соответствующие мышинным последовательностям, заменяли валином (V) и треонином (T), соответственно. Примеры областей FR3

## [233] Таблица 4 - FR3 тяжелой цепи 94G1 и ее варианты

SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность	
SEQ ID NO:18	NYNEKFKSRATMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDSAVYYC	94G1 FR3
SEQ ID NO:19	NYNEKFKSRVTMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDSAVYYC	FR3 Ala 10 Val
SEQ ID NO:20	NYNEKFKSRVTMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	FR3 Ala 10 Val; FR3 Ser 33 Thr

### 1.5 Получение переменных областей гуманизованного антитела против 4-1BB человека и полноразмерных антител

[234] Получали переменные области антитела против 4-1BB человека, включающие различные комбинации описанных выше CDR тяжелой цепи и легкой цепи и каркасных областей. Например, получали антитело 94KVT/w Fab-типа, в котором 5-ую аминокислоту треонин в CDR3 тяжелой цепи заменяли лизином (K), и 10-ую аминокислоту FR3 тяжелой цепи аланин и 33-ю аминокислоту FR3 тяжелой цепи серин заменяли валином (V) и треонином (T), соответственно, для получения последовательностей переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, представляющих собой или включающих SEQ ID NO:30 и SEQ ID NO:34, соответственно. Кроме того, получали варианты тяжелой цепи 94KVT, в которых 5-ую аминокислоту HCDR2 (SEQ ID NO:6) аспарагин (N) заменяли глутамином (Q), глутаминовой кислотой (E) или серином (S). Примеры последовательностей переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи представлены в таблице 5 ниже (последовательности CDR подчеркнуты).

## [235] Таблица 5 - Примеры переменных доменов гуманизованного антитела против 4-1BB человека

Антитело	Переменный домен легкой цепи	Переменный домен тяжелой цепи
94G1	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASQTISDYLHWYQQKPDQ APKLLIKYASQSISGIPSRFSGS GSGTDFTFTISSLEAEDAATYY CQDGHSPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:9)	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLS CKASGYTFSSYWMHWVRQAP GQGLEWIGEINPGNGHTNYNEK FKSRATMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDSAVYYCARSFTTARAFA YWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:11)
94w	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASQTISDYLHWYQQKPDQ APKLLIKYASQSISGIPSRFSGS GSGTDFTFTISSLEAEDAATYY CQDGHSPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:10)	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLS CKASGYTFSSYWMHWVRQAP GQGLEWIGEINPGNGHTNYNEK FKSRATMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDSAVYYCARSFTTARAFA YWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:11)
94K/w	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASQTISDYLHWYQQKPDQ APKLLIKYASQSISGIPSRFSGS GSGTDFTFTISSLEAEDAATYY CQDGHSPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:10)	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLS CKASGYTFSSYWMHWVRQAP GQGLEWIGEINPGNGHTNYNEK FKSRATMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDSAVYYCARSFKTARAFA YWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:12)
94KV/w	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASQTISDYLHWYQQKPDQ APKLLIKYASQSISGIPSRFSGS	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLS CKASGYTFSSYWMHWVRQAP GQGLEWIGEINPGNGHTNYNEK

	GSGETDFTFTISSLEAEDAATYY CQDGHSWPPTFGQGTKEIK (SEQ ID NO:10)	FKSRVTMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDSAVYYCARSFKTARAFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:13)
5 94KVT/w, EU101	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASQTISDYLHWYQQKPDQ APKLLIKYASQISGIPSRFSGS GSGETDFTFTISSLEAEDAATYY CQDGHSWPPTFGQGTKEIK (SEQ ID NO:10)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLS CKASGYTFSSYWMHWVRQAP GQGLEWIGEINPGNGHTNYNEK FKSRVTMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDAVYYCARSFKTARAFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:14)

[236] Для преобразования полноразмерных антител против 4-1ВВ человека (полный Ig-тип) Fc-домен соединяли с соответствующим Fab. Например, Fab 94K/w состоял из тяжелой цепи, в которой треонин заменяли лизином в HCDR3.5, и легкой цепи с вариантом 94/w, в котором 6-ую аминокислоту LCDR3 заменяли триптофаном (W), и соответствующие области, полученные из доменов CH2 и CH3 и последовательности IgG1 человека, получали посредством ПЦР так, что они перекрывались, и подвергали их ПЦР с перекрывающимися праймерами для получения полной ДНК IgG, а затем полученную ДНК клонировали в экспрессирующий вектор млекопитающего. Другие полноразмерные гуманизированные антитела против 4-1ВВ человека, представленные в настоящем описании, получали аналогичным образом. Примеры последовательности константной области иммуноглобулина представлены в таблице 6 ниже.

[237] Таблица 6 - Примеры константных доменов иммуноглобулинов

SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность	Описание
20 SEQ ID NO:21	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	Константный домен к- цепи
25 SEQ ID NO:22	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	IgG1
30 SEQ ID NO:23	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	IgG1 вариант (L234; L235; K322)

[238] В рамках изобретения полноразмерное антитело 94KVT/w включает последовательность IgG1, такую как SEQ ID NO:22. Кроме того, получали полноразмерное антитело, обозначаемое в настоящем описании как EU101, включающее описанные выше переменные домены 94KVT/w (SEQ ID NO:10 и 14 для переменных доменов легкой цепи и тяжелой цепи, соответственно), с вариантом константного домена IgG1, включающим 3 мутации: L234, L235 и K322 (SEQ ID NO:23). Таким образом, в примере представлен ряд примеров гуманизированных антител против 4-1ВВ человека и фрагментов антител, сконструированных для потенциального повышения аффинности связывания с антигеном. Эти примеры антител и фрагментов охарактеризованы в следующих примерах.

## Пример 2 - Характеризация связывания гуманизированных антител против 4-1ВВ человека

### 2.1 Определение эпитопа, связывающегося с антителами против 4-1ВВ человека

[239] В рамках изобретения гуманизированные антитела против 4-1ВВ человека, представленные в настоящем описании, могут быть полезными для стимуляции 4-1ВВ. Терапевтическое применение антител по изобретению может включать стимуляцию противоопухолевого иммунитета и/или противовирусного иммунитета. Однако для

клинического применения важно идентифицировать часть 4-1ВВ человека, распознаваемую и/или реагирующую с гуманизированным антителом против 4-1ВВ (то есть, связывающийся эпитоп). Идентифицировали антитела против 4-1ВВ, распознающие различные эпитопы молекулы 4-1ВВ, и можно показать, что эти антитела имеют различные клинические эффекты. (См., например, Kwon et al. Eur. J. Immunogenetics (2002) 29: 449-452, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Эпитопное картирование включает способы идентификации молекулярной детерминанты распознавания антитело-антиген. В этом примере описывают эпитопное картирование примера антитела против 4-1ВВ человека, сконструированного, как описано в примере 1 выше. В частности, в этом примере анализируют связывающийся эпитоп гуманизированного антитела против 4-1ВВ человека с переменными доменами 94KVT/w, EU101.

[240] Антиген 4-1ВВ человека для исследования эпитопа гуманизированного антитела против 4-1ВВ получают из библиотеки кДНК, полученной из лимфоцитов периферической крови человека, полученных, по меньшей мере, некоторыми из авторов настоящего изобретения (См., например, Kwon et al. Cellular Immunology (1996) 169: 91-98; Immunol. Lett. (1995) 45: 67-73; и патент Кореи № 10-0500286, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки). Выбирали кДНК, кодирующую внеклеточный домен (ECD) полученного человеческого гомолога кДНК 4-1ВВ (далее в настоящем описании обозначаемого как H4-1ВВ), подвергали ее слиянию с GST, а затем встраивали в вектор (pGEX-6T) для экспрессии. Линию клеток, продуцирующих слитый полипептид GST-4-1ВВ, представленный в описании, депонировали как часть изобретения по патенту Кореи № 10-0500286, регистрационный номер КСТС 0952BP. Полноразмерная последовательность 4-1ВВ человека представлена ниже как SEQ ID NO:44. Внеклеточный домен 4-1ВВ человека соответствует аминокислотам 1-167 полноразмерной последовательности H4-1ВВ.

[241] SEQ ID NO:44 - Полноразмерная последовательность 4-1ВВ человека  
 MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGG  
 QRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKG  
 CKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPP  
 APAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQE  
 EDGCSCRFPEEEEGGCEL

[242] Для определения эпитопа 4-1ВВ, распознаваемого гуманизированными антителами против 4-1ВВ человека по изобретению, получали конструкции с фрагментами внеклеточного домена 4-1ВВ разного размера (например, R1, R2, R3), слитыми с GST и реплицированными. Схема полипептидов GST-4-1ВВ, используемых в этом примере, представлена на **фиг. 1А.**, и примеры последовательностей праймеров, использованных в настоящем описании для получения различных конструкций внеклеточного домена 4-1ВВ, представлены в таблице 7 ниже. Отдельные рекомбинантные конструкции GST-H-4-1ВВ культивировали с 1 мМ IPTG и продуцировали в клетках *E. coli* BL21DX5 $\alpha$ , слитые полипептиды очищали с использованием глутатион-агарозной колонки.

[243] Таблица 7 - Примеры праймеров, используемых для получения фрагментов внеклеточного домена 4-1ВВ человека, применимых для эпитопного картирования

	Прямой	Обратный
R1	5'-GGATCCACAAGATCATTTGCAG-3' (SEQ ID NO:24)	5'-TTGAGCTCGAGCCTGGTCTGAAAACA-3' (SEQ ID NO:25)
R2	5'-CGCGTGGATCCAAGGAGTGTTCCTCCA-3' (SEQ ID NO: 26)	5'-TTGAGCTCGAGACGTTTCTGATCGTTA-3' (SEQ ID NO:27)

R3	5'-CGCGTGGATCCGGCATCTGTGACCCCT-3' (SEQ ID NO:28)	5'-TTGAGCTCGAGGATCTGCGGAGAGTGT-3' (SEQ ID NO:29)
R1.1	5'-GGATCCACAAGATCATTGCAG-3' (SEQ ID NO:30)	5'-CTCGAGGCATATGTCACAGGT-3' (SEQ ID NO:31)
R1.2	5'-GGATCCACAAGATCATTGCAG-3' (SEQ ID NO:32)	5'-CTCGAGGCTGGAGAACTAT-3' (SEQ ID NO:33)
R1.3	5'-GGATCCTGCCAGCTGGTAC-3' (SEQ ID NO:34)	5'-TTGAGCTCGAGCCTGGTCTGAAAACA-3' (SEQ ID NO:35)
R1.4	5'-GGATCCAGGAATCAGATTTGC-3' (SEQ ID NO:36)	5'-TTGAGCTCGAGCCTGGTCTGAAAACA-3' (SEQ ID NO:37)
R1.5	5'-GGATCCACAAGATCATTGCAG-3' (SEQ ID NO:38)	5'-CTCGAGGCAAATCTGATTCCT-3' (SEQ ID NO:39)
R1.6	5'-GGATCCACAAGATCATTGCAG-3' (SEQ ID NO:40)	5'-CTCGAGTGGAGGACAGGGACT-3' (SEQ ID NO:41)

[244] Образцы очищенных белков получали из трансформированных бактериальных клеток с помощью лизирующего буфера (например, 10 мМ Трис-НСl - рН 7,4, 50 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА, 30 мМ NaF, 0,1 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% Triton X-100, 0,5% Nonidet P-40, 1 мМ PMSF и смесь ингибиторов протеаз). Приблизительно 20 мкг каждого образца слитых полипептидов разводили 4-кратным буфером для образцов с SDS, подвергали электрофорезу в ПААГ в присутствии SDS, а затем переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Millipore, Bedford, MA). На целлюлозных мембранах mAb против 4-1BB человека реагировали с антителом против IgG мыши с пероксидазой хрена (HRP). Связывающиеся антитела определяли по повышенной хемилюминесценции (ECL) (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK).

[245] Как описано выше и показано на **фиг. 1В**, когда каждый из трех неперекрывающихся слитых полипептидов HECD фрагмент 4-1BB-GST, R1, R2 и R3, обрабатывали GST-связывающим, соответственно. С помощью вестерн-блоттинга определяли, что пример гуманизированного антитела против 4-1BB по изобретению (EU101) связывается со слитой конструкцией N-концевого фрагмента (R1) размером приблизительно 32 кДа (аминокислоты 1-55 4-1BB). Кроме того, это связывание являлось специфическим, т.к. не наблюдали связывания с любой из слитых конструкций R2 или R3. См. **фиг. 1В**.

[246] Кроме того, для определения минимального участка связывания гуманизированного антитела против 4-1BB фрагмент внеклеточного домена R1 дополнительно разделяли на 6 фрагментов меньшего размера: полипептидные фрагменты R1.1 (аминокислоты 1-45 4-1BB), R1.2 (аминокислоты 1-35 4-1BB), R1.3 (аминокислоты 11-55 4-1BB), R1.4 (аминокислоты 21-55 4-1BB), R1.5 (аминокислоты 1-25 4-1BB) и R1.6 (аминокислоты 1-30 4-1BB), как показано на **фиг. 1А**, и подвергали их слиянию с GST (глутатион-S-трансферазой, 27 кДа). Примеры пар праймеров, используемых для получения этих конструкций, приведены в таблице 7 выше. Слитые полипептидные конструкции получали в клетках *E. coli* BL21 с помощью индукции IPTG (например, 1 мМ IPTG), и экстракты целых бактериальных клеток анализировали посредством электрофореза в 12%-ном ПААГ в присутствии SDS. Как показано на **фиг. 2А**, с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии SDS подтверждали, что отдельные слитые полипептиды 4-1BB хорошо экспрессировались.

[247] ПААГ переносили на нитроцеллюлозную мембрану и осуществляли иммуноблоттинг с использованием примера антитела против 4-1BB человека EU101. Как показано на **фиг. 2В**, подтверждали, что последовательность аминокислот 10-30 внеклеточного домена H4-1BB важна для связывания примера гуманизированного антитела против 4-1BB. Результаты этого анализа свидетельствовали о том, что пример антитела против 4-1BB человека по изобретению (EU101) связывается с эпитопом 4-1BB человека, последовательность которого представляет собой или включает CRAGTFCDNNRNQICSPCPP (SEQ ID NO:15). Также подтверждали, что последовательность, включающая аминокислоты 35-50 внеклеточного домена 4-1BB, не важна для связывания примера гуманизированного антитела, представленного в настоящем описании (**фиг. 2В**).

## 2.2 Анализ аффинности связывания примеров гуманизированных антител против 4-1ВВ человека с антигеном 4-1ВВ

### Способность примеров антител против 4-1ВВ человека к связыванию

[248] Для исследования способности примеров гуманизированных антител против 4-1ВВ человека, описанных в примере 1, к связыванию с антигеном 4-1ВВ человека (Н4-1ВВ) осуществляли ELISA. Экспрессируемый *E. coli* рекомбинантный 4-1ВВ человека использовали в качестве антигена.

[249] Антитело мыши ВВК-4, референсное гуманизированное антитело 94G1 и примеры сконструированных антител 94К, 94КV, 94КVT и EU101, как описано в примере 1, наносили на 96-луночные планшеты, покрытые рекомбинантным белком внеклеточного домена 4-1ВВ (Н4-1ВВ) с гистидиновой меткой. В примере анализа ELISA на аффинность использовали общий объем 100 мкл при концентрации 1,0 мкг/мл, и реакцию проводили при комнатной температуре в течение 1 часа. При необходимости, также добавляли меченое пероксидазой хрена (HRP) антитело против IgG человека и антитело против mIgG-HRP, распознающее антитело, и позволяли им реагировать при комнатной температуре в течение 40 минут. После промывки, обработки раствором ABTS (Sigma-Aldrich), представляющим собой субстрат для цветной реакции, проводили реакцию при комнатной температуре в течение 30 минут и определяли поглощение при 450 нм для цветной реакции с использованием спектрофотометра для ELISA для анализа активности связывания антител. Результаты представлены на **фиг. 3**. Как показано на **фиг. 3**, с повышением концентрации антитела улучшается связывание между каждым антителом и антигеном 4-1ВВ (Н4-1ВВ). Эти данные подтверждают, что антитела по изобретению специфически связываются с 4-1ВВ.

Связывание примеров антител против 4-1ВВ человека с экспрессируемым клеткой антигеном

[250] Анализировали способность примеров гуманизированных антител против 4-1ВВ человека связываться с антигеном 4-1ВВ человека (Н4-1ВВ) в контексте клетки. Клетки Jurkat 8-1 генетически конструировали для гиперэкспрессии 4-1ВВ. Примеры сконструированных антител 94К, 94КV, 94КVT и EU101, как описано в примере 1, вместе с антителом ВВК-4 мыши и референсным гуманизированным антителом 94G1 оценивали на связывание с клетками Jurkat 8-1 с использованием вторичного антитела против mIgG-HRP или против hIgG-HRP, при необходимости, и анализировали посредством FACS. Как показано на **фиг. 4**, каждое из антител могло эффективно связываться с 4-1ВВ, экспрессируемым клетками Jurkat 8-1, и аффинность 94КVT и EU101 была выше, чем у ВВК-4 и 94G1.

### Аффинность связывания примеров антител против 4-1ВВ человека с антигеном *in vitro*

[251] Аффинность связывания *in vitro* примера сконструированного антитела EU101, как описано в примере 1, вместе с референсным гуманизированным антителом 94G1 определяли посредством анализа Biacore. Антитело против IgG человека иммобилизовали на чипе CM5, и оно связывалось с антителами Fab, полученными, как описано выше, при протекании по поверхности чипа и, в конечном итоге, реагировало с антигеном 4-1ВВ человека (Н4-1ВВ), при этом измеряли активность связывания антитела и антигена (Biacore3000, сенсорный чип CM5). Результаты измерения аффинности связывания показаны на **фиг. 5**. Значения  $K_a$  (1/Мс) и  $K_d$  (1/с) соответствуют тому, как быстро антитело ассоциирует и диссоциирует от антигена, соответственно. Константу диссоциации ( $K_D$ ) получают, разделяя  $K_d$  на  $K_a$  ( $K_d/K_a = K_D$ ).

[252] Снижение константы диссоциации можно интерпретировать как то, что диссоциация происходит при более низкой концентрации, и что аффинность повышается. Как показано на **фиг. 5**, пример сконструированного антитела против 4-1ВВ человека имел улучшенную аффинность связывания относительно референсного 94G1.

5 **Примеры антител против 4-1ВВ человека распознают 4-1ВВ, экспрессируемый активированными CD8<sup>+</sup> Т-клетками**

[253] CD8<sup>+</sup> Т-клетки выделяли из РВМС человека и активировали с использованием 1 мкг/мл антитела против CD3 в течение 2 дней. Оценивали возможность определять  
10 4-1ВВ на поверхности активированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток с помощью гуманизированных антител против 4-1ВВ человека (94К, 94КV, 94КVТ и EU101), описанных в примере 1, относительно примера коммерчески доступного антитела против 4-1ВВ (4-1ВВ-РЕ). Также показана детекция с помощью антитела мыши против 4-1ВВ человека ВВК-4 и референсного гуманизированного антитела 94G1. Обработку антителами против 4-1ВВ  
15 осуществляли в концентрации 25 нг/мл.

[254] Примеры антител определяли с использованием антитела против mIgG-Dylight488 или антитела против hIgG-Dylight488, при необходимости, и анализировали посредством FACS. Результаты представлены на **фиг. 6**. Хотя с помощью референсного  
20 антитела 94G1 определяли 4-1ВВ на 17,93% CD8<sup>+</sup> Т-клеток, каждое из антител 94КVТ и EU101 демонстрировало устойчивую детекцию на 25,3% и 28,33%, соответственно. Как показано, примеры антител 94КVТ и EU101 имели улучшенные связывающие свойства по сравнению с ВВК-4 и 94G1. Таким образом, гуманизированный вариант антитела по изобретению имеет лучшее связывание с активированными Т-клетками *in vitro*.

25 **Пример 3 - Анализ эффективности *in vitro* гуманизированных антител против 4-1ВВ человека**

[255] Ранее показано, что антитела против 4-1ВВ обеспечивают стимуляцию сигнала для костимуляторной молекулы 4-1ВВ, экспрессирующейся в активированных CD8<sup>+</sup>  
30 Т-клетках, для активации CD8<sup>+</sup> Т-клеток, индукции пролиферации и повышения экспрессии цитокинов T<sub>H</sub>1-типа. В этом примере исследовали активность примеров гуманизированных антител против 4-1ВВ человека, описанных в примере 1, в отношении индукции пролиферации CD8<sup>+</sup> Т-клеток и экспрессии цитокинов T<sub>H</sub>1-типа.

35 **3.1 Примеры антител против 4-1ВВ человека индуцируют пролиферацию CD8<sup>+</sup> Т-клеток**

[256] Для оценки пролиферации CD8<sup>+</sup> Т-клеток, клетки окрашивали реагентом для анализа пролиферации клеток WST-1 (водорастворимой солью тетразолия). Меченые  
40 WST-1 CD8<sup>+</sup> Т-клетки получали и активировали с использованием 0,5 мкг/мл антитела против CD3. Активированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки обрабатывали 1,0 мкг/мл антитела изотипического контроля, антитела мыши ВВК-4, референсного антитела 94G1 и примеров гуманизированных антител против 4-1ВВ человека (94К, 94КV, 94КVТ и EU101), описанных в примере 1. Клетки анализировали с использованием системы  
45 MACS, и результаты показаны на **фиг. 7**. Учитывая представленное на **фиг. 7**, подтверждали, что примеры гуманизированных антител против 4-1ВВ человека по изобретению индуцируют пролиферацию CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Кроме того, степень активации

CD8<sup>+</sup> Т-клеток повышается в порядке 94G1<94K/94KV<94KVT/EU101.

### 3.2 Примеры антител против 4-1BB человека стимулируют секрецию цитокинов

[257] ИФН $\gamma$  является типичным цитокином, главным образом, секретирующимся Т-лимфоцитами или естественными киллерами (НК клетка), вызывающим пролиферацию и имеющим противовирусную активность. Кроме того, ИФН $\gamma$  является основным активатором макрофагов и, в частности, основным цитокином, отличительным для Т<sub>H</sub>1-клеток относительно других типов клеток. Секреция ИФН $\gamma$  играет основную роль в активации цитотоксических Т-клеток, фагоцитов и В-клеток. Таким образом, эффективность противоопухолевого средства можно оценивать по повышенному количеству Т<sub>H</sub>1-индуцирующего ИФН $\gamma$ . По этой причине, измерение секреции ИФН $\gamma$  по специфической стимуляции может являться оптимальным стандартом, который можно использовать в качестве количественного критерия функционального изменения Т-клеток.

[258] CD8<sup>+</sup> Т-клетки выделяли из РВМС человека и обрабатывали 0,5 мкг/мл mAb против CD3, а затем не обрабатывали антителом или обрабатывали 1,0 мкг/мл антитела против 4-1BB: ВВК-4, 94G1, 94K, 94KV, 94KVT и EU101. Секрецию ИФН $\gamma$  анализировали в дни 1, 3 и 5. Результаты представлены на **фиг. 8**. Как можно видеть на **фиг. 8**, секреция ИФН $\gamma$  повышалась во всех обработанных антителом против 4-1BB образцах, и это повышение коррелировало с длительностью обработки антителом. При обработке антителом 94KVT и EU101 достигали уровня секреции, в 13 раз превышающего уровни в контрольной группе в день 5. Таким образом, примеры гуманизированных антител 94KVT и EU101 могут индуцировать секрецию ИФН $\gamma$  более эффективно, чем референсное антитело 94G1.

### 3.3 Повышение уровня ИФН $\gamma$ при обработке активированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток или CD8<sup>+</sup> Т-клеток примером антитела против 4-1BB человека

[259] Получали кровь из трех здоровых доноров, полученные из нее РВМС выделяли посредством центрифугирования в градиенте фиколл-пака и оставляли активные Т-клетки, присутствующие в РВМС, в среде RPMI-1640 с 2% FBS на 24 часа. Оставленные РВМС обрабатывали частицами железа с присоединенным антителом против CD4 или антителом против CD8 и выделяли CD4<sup>+</sup>-клетки или CD8<sup>+</sup>-клетки с использованием магнитного сепаратора для MACS. Выделенные CD4<sup>+</sup> Т-клетки или CD8<sup>+</sup> Т-клетки обрабатывали активатором Т-клеток, антителом против CD3, для индукции экспрессии 4-1BB, а затем обрабатывали EU101 в разных концентрациях (0,5, 1,0, 2,5, и 5,0 мкг/мл) в течение 3 дней. Через 3 дня получали среду для культивирования без клеток, анализировали флуоресценцию ИФН $\gamma$  человека в среде для культивирования посредством ELISA (eBioscience) и сравнивали результаты со стандартной кривой, предоставленной в наборе для ELISA ИФН $\gamma$  (**фиг. 9**).

[260] Как показано на **фиг. 9**, уровни экспрессии ИФН $\gamma$  в CD4<sup>+</sup> Т-клетках и CD8<sup>+</sup> Т-клетках повышались дозозависимым образом. В частности, если использовали 5,0 мкг/мл EU101, уровень экспрессии ИФН $\gamma$  в CD8<sup>+</sup> Т-клетках повышался на 612% по сравнению с повышением на 278% в CD4<sup>+</sup> Т-клетках. В соответствии со специфическим для Т-клеток профилем экспрессии ИФН $\gamma$ , вовлеченного в преобразование Т-клеток в Т<sub>H</sub>1, пример антитела против 4-1BB человека по изобретению EU101 имеет достаточную активность *in vitro*, чтобы предположить, что он может быть эффективным в профилактике и/или лечении злокачественных новообразований.

### 3.4 Измерение активностей ADCC и CDC примера антитела против 4-1ВВ человека

[261] Иммунная система распознает и атакует инфицированные вирусом клетки или злокачественные клетки, и антитела можно использовать для индукции опосредованного цитотоксичностью апоптоза. В случае такой иммунной системы можно использовать два типа механизмов, таких как антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимая цитотоксичность (CDC). В обоих случаях, апоптоз может быть опосредован связыванием антитела с мишенью на поверхности клетки. То есть, если антитело имеет активность ADCC, клетка, распознаваемая антителом, подвергается апоптозу, опосредованному естественными киллерами (NK), и, если антитело имеет активность CDC, цитолиз опосредован белками комплемента. Таким образом, в случае разработки терапевтического средства на основе антагонистического антитела степень цитолиза клеток, распознаваемых антителом, можно определять с помощью анализов активностей ADCC и CDC. Однако мишенью гуманизированного антитела против 4-1ВВ по изобретению являются Т-клетки, а не злокачественные клетки. То есть, учитывая механизм индукции активации Т-клеток посредством связывания с антителом против 4-1ВВ как агонистическим антителом, антитело, не имеющее активности ADCC и CDC, может являться предпочтительным для терапевтического применения.

[262] В настоящем описании в случае анализа ADCC РВМС человека выделяли посредством центрифугирования с фиколлом с использованием той же разницы плотности. РВМС инкубировали в RPMI (Thermo Fisher Scientific) и 10% FBS с ИЛ-2 (100 ед./мл) в качестве ночной культуры. Клетки-мишени (4-1ВВ-экспрессирующие линии клеток) собирали, ресуспендировали в 1 мл среды для культивирования и метили 5 мкМ CFSE при 37°C в течение 5 мин. Клетки-эффекторы/мишени по изобретению промывали в соотношении 10:1, подсчитывали и распределяли. Для анализа антитело по изобретению получали в конечной концентрации 10 нМ (1,5 мкг/мл) и культивировали на планшете при 37°C в течение 4 часов. В каждую лунку добавляли 5 мкл 7-AAD и переносили в пробирку для FACS, а затем образец анализировали посредством FACS с использованием BD FACScan. Измеряли количество нежизнеспособных клеток-мишеней (CFSE<sup>+</sup> 7-AAD<sup>+</sup>) и жизнеспособных клеток-мишеней (CFSE<sup>+</sup> 7-AAD<sup>-</sup>). ADCC оценивали по количеству жизнеспособных клеток среди всех клеток (фиг. 10А).

[263] Анализ комплементзависимой цитотоксичности (CDC) осуществляли аналогично анализу ADCC, описанному выше, с использованием результатов FACS в качестве значения показаний при считывании, при этом указанные выше клетки-мишени инкубировали с антителами против 4-1ВВ на льду в течение 30 мин, а затем добавляли дополненную сыворотку человека в конечной концентрации 20% при 37°C в течение 30 минут. Затем каждый из полученных образцов переносили в пробирку для FACS и анализировали посредством FACS с использованием BD FACScan (фиг. 10В). Результаты, показанные на фиг. 10А и фиг. 10В подтверждали, что пример гуманизированного антитела 4-1ВВ EU101 почти не имел эффектов ADCC и CDC. Таким образом, можно сказать, что пример антитела EU101 по изобретению имеет благоприятные свойства ADCC и CDC в качестве агонистического антитела и является хорошим кандидатом для лечения злокачественных новообразований *in vivo*.

#### Пример 4 - Подтверждение эффективности *in vivo* примера гуманизированного антитела против 4-1ВВ человека

[264] Антитело против 4-1ВВ человека EU101 по изобретению демонстрировало дозозависимый эффект в примере *in vitro* и значительно превосходящий эффект относительно общепринятого антитела. Этот пример предназначен для проверки того, можно ли использовать антитело против 4-1ВВ человека EU101 в отдельности или в

комбинации с другой композицией для диагностики, профилактики или лечения злокачественного новообразования или опухоли *in vivo* и для эффективного ингибирования роста опухоли.

4.1 Приживление мононуклеарных клеток периферической крови человека у NOD-  
 scid IL2Rgamma<sup>null</sup> мыши и противоопухолевая активность антитела против 4-1BB  
 человека

[265] Периферическую венозную кровь, полученную из здорового донора HLA-A24-  
 типа, обрабатывали гепарином и подвергали центрифугированию в градиенте фиколл-  
 пака (GE Healthcare, Piscataway, NJ) для сбора PBMC. PBMC промывали средой RPMI-  
 1640 и  $3 \times 10^6$  клеток интраперитонеально инъецировали мышам с иммунодефицитом,  
 то есть, мышам NSG (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ; NOD-scid IL2rγ<sup>null</sup>, Jackson  
 Laboratory).

[266] Анализ гуманизированных мышей осуществляли посредством проточной  
 цитометрии для проверки того, присутствуют ли Т-клетки человека в крови мыши,  
 полученной из ретроорбитального синуса мыши через 5 недель после приживления  
 PBMC человека. Мышей NSG возрастом 7 недель (Jackson Laboratory, Barharbor, ME)  
 подвергали индукции в свободных от патогенов (SPF) условиях.

[267] Осуществляли проточную цитометрию для проверки соотношений CD4 и CD8  
 после окрашивания клеток на маркеры клеток крови человека, например, с  
 использованием флуоресцентно меченого APC-су7 антитела против CD45, флуоресцентно  
 меченого FITC антитела против CD4 и флуоресцентно меченого BV510 антитела против  
 CD8. После ретроорбитального забора крови у каждой мыши анализировали Т-клетки  
 человека в образцах крови мыши для проверки того, прижились ли клетки иммунной  
 системы человека у мыши. Опухолевые клетки человека получали в HLA-типированной  
 гуманизированной модели мыши и в спину каждой мыши подкожно инъецировали  
 $1 \times 10^7$  клеток. Когда размер опухоли достигал от 100 до 200 мм<sup>3</sup>, внутривенно вводили  
 препарат примера антитела против 4-1BB человека (EU101) в количестве 1,0 мг, 5,0 мг  
 или 10,0 мг на 1 кг массы тела раз в день каждые 5 дней, всего 3 раза. В качестве  
 контроля использовали IgG человека. Объем опухоли (мм<sup>3</sup>) каждой мыши измеряли  
 каждые 3 дня (фиг. 11). Результаты, представленные на фиг. 11, подтверждали, что размер  
 опухоли у мышей, которым вводили пример антитела против 4-1BB человека (EU101),  
 снижался относительно мышей, которым вводили IgG человека, и, кроме того, это  
 снижение было пропорциональным концентрации антитела. В частности, регрессия  
 опухоли в группе, которой вводили 5 мг/кг антитела, происходила быстро. В течение  
 недели после введения дозы 5 мг/кг размер опухоли у гуманизированных мышей  
 стабилизировался, и рост опухоли прекращался. Таким образом, пример антитела  
 EU101 по изобретению демонстрировал противоопухолевый эффект *in vivo*.

[268] Таким образом, описанные выше результаты свидетельствуют о том, что пример  
 антитела против 4-1BB человека (EU101), специфически распознающий эпитоп (SEQ  
 ID NO:15) H4-1BB, благодаря улучшенным характеристикам, таким как, например,  
 улучшенная аффинность, демонстрирует превосходные эффекты в модели мыши *in  
 vivo*. Таким образом, этот пример позволяет предполагать, что антитело по изобретению  
 можно использовать в качестве противоопухолевого средства в более низкой дозе, чем  
 референсное антитело.

4.2 Эффекты ингибирования роста опухоли с использованием примера антитела  
 против 4-1BB человека и средства против PD-1

Сравнение эффектов, вызываемых индивидуальным введением примера антитела

против 4-1BB человека (EU101) и примера средства против PD-1 после инъекции опухолевого материала гуманизированным мышам

[269] Гуманизированных мышей получали способом, описанным в примере 4.1 выше. Для осуществления эксперимента, подтверждающего повышение противоопухолевого эффекта в зависимости от доз примера антитела против 4-1BB человека (EU101) и примера средства против PD-1 (Keytruda) (приобретенного в MSD, GER), полученным ранее гуманизированным мышам подкожно инъецировали  $1 \times 10^7$  клеток совпадающей по типу HLA-A линии клеток колоректальной аденокарциномы человека HT29. Когда объем инъецируемой опухоли достигал от 100 до 150 мм<sup>3</sup>, мышей разделяли всего на 5 групп по три мыши, и для сравнения эффекта EU101 в отношении ингибирования опухоли каждую группу мышей подвергали воздействию каждого из трех условий введения (контроль: IgG, исследуемая группа 1: 5 мг/кг, и исследуемая группа 2: 10 мг/кг) с 5-дневными интервалами 3 раза, и те же действия осуществляли в случае средства против PD-1 (фиг. 12). В результате эксперимента, в случае EU101 и Keytruda (средства против PD1) объемы опухолей снижались дозозависимым образом. Однако, на фиг. 12 показано, что 5 мг/кг EU101 не оказывали влияния на рост опухоли, но при введении 5 мг/кг и 10 мг/кг EU101 наблюдали дозозависимую противоопухолевую активность. Кроме того, подтверждали, что EU101 демонстрировал более высокую эффективность в более низкой дозе, чем Keytruda (средство против PD-1), и достигали полной блокады роста опухоли, особенно при введении 5 мг/кг EU101.

Введение гуманизированным мышам комбинации EU101 и средства против PD-1 после инъекции опухолевого материала

[270] Т.к. сигналы коингибиторных рецепторов (PD-1 и CTLA-4) и костимуляторный (CD137) Т-клеточный сигнал отличаются при выполнении одной и той же задачи ингибирования роста опухоли, можно ожидать, что стимуляция двух рецепторов будет приводить к синергическому эффекту (Chen *et al.*, *Cancer Immunol. Res.* (2015) 3:149-160; Bartkowiak *et al.*, *Front. Oncol.* (2015) 5: 117, включенные в настоящее описание в качестве ссылки). Кроме того, при иммунотерапии PD1 есть вероятность эффекта лечения злокачественных новообразований в некоторых из популяций пациентов со злокачественными новообразованиями, но в более обширных популяциях пациентов все равно может потребоваться проведение низкодозового комбинированного лечения с использованием разных противоопухолевых средств. Для исследования противоопухолевого эффекта, вызываемого комбинированным лечением с использованием примера антитела против 4-1BB человека (EU101) и примера средства против PD-1 (Keytruda), несущих опухоли гуманизированных мышей подвергали комбинированному лечению EU101 и Keytruda. Гуманизированных мышей получали способом, описанным в примере 4.1.

[271] Для идентификации гуманизированных мышей осуществляли ретроорбитальный забор крови. Клетки карциномы толстого кишечника HT29 подкожно инъецировали мышам HLA-A24, поддерживая нормальные условия при дозе  $1 \times 10^7$  клеток/мышь. Когда размер опухоли достигал от 300 до 450 мм<sup>3</sup>, эксперимент осуществляли следующим образом.

[272] Как видно из этого примера, хотя не замедляли рост опухоли при использовании отдельной инъекции в минимальной или меньшей концентрации (EU101: 2,5 мг/кг, Keytruda (приобретенный в MSD, GER): 2,5 мг/кг), опухоль подвергалась значительной регрессии при комбинированном лечении EU101 и Keytruda. Этот результат свидетельствует о том, что примеры антител против 4-1BB человека, представленные

в настоящем описании (например, EU101), являются хорошими кандидатами для комбинированного лечения с использованием различных противоопухолевых средств, включая комбинации с одним или несколькими ингибиторами иммунных контрольных точек (фиг. 13).

5 Анализы инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в нормальной ткани и ткани колоректальной аденокарциномы человека после индивидуального и комбинированного  
лечения с использованием примера антитела против 4-1BB человека и примера средства  
против PD-1

[273] После индивидуального введения примера антитела против 4-1BB человека  
 10 (EU101) и примера средства против PD-1 (Keytruda) (приобретенного в MSD, GER) и  
 комбинированного введения EU101 и Keytruda гуманизированным мышам с  
 имплантированными клетками HT29, в день, когда прекращали анализ эффектов, мышей  
 из всех групп анатомировали для разделения опухоли и крови. После обработки  
 15 отделенной опухоли коллагеназой IV при 37°C в течение 30 минут клетки в опухолевой  
 ткани подвергали диссоциации механическим способом, а затем промывали 1-кратным  
 PBS. РВМС выделяли из крови посредством центрифугирования в градиенте фикола,  
 и отделенные опухолевые клетки и РВМС подвергали следующему эксперименту.  
 Эритроциты (RBC) удаляли из промытых клеток с использованием лизирующего буфера  
 для RBC, а затем промывали 1-кратным PBS. Клеточный детрит удаляли из промытых  
 20 клеток с использованием 40-мкм нейлонового клеточного фильтра для получения  
 отдельных клеток и отдельные клетки промывали 1-кратным PBS, а затем подсчитывали  
 Т-клетки, полученные из каждой группы, с использованием цитометра.

[274] Отдельные Т-клетки окрашивали на маркеры клеток крови человека, например,  
 с помощью антитела против CD45 (флуоресцентно меченого APC-су7), флуоресцентно  
 25 меченого FITC антитела против CD4 человека и флуоресцентно меченого BV510 антитела  
 против CD8 человека, а затем подвергали анализу FACS. Анализ FACS осуществляли  
 с учетом долей (%) субпопуляций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток, гейтированных в группе CD45<sup>+</sup>  
 клеток (фиг. 14А).

[275] В частности, для идентификации субпопуляции Treg среди выделенных Т-клеток  
 30 поверхности клеток окрашивали на маркеры клеток крови человека, например, с  
 помощью антитела против CD45 (флуоресцентно меченого APC-су7), флуоресцентно  
 меченого FITC антитела против CD4 человека и флуоресцентно меченого PE-су5 антитела  
 против CD25 человека, и осуществляли внутриклеточное и внутриядерное окрашивание  
 на клеточный фактор транскрипции Foxp3 (флуоресцентно меченое APC антитело  
 35 против Foxp3 человека) с использованием набора Foxp3/Transcription Factor Staining  
 Buffer Set (eBioscience). При анализе FACS группу CD45 отделяли для гейтирования R1,  
 группу CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> отделяли для гейтирования R2, и измеряли долю (%) группы  
 Foxp3<sup>high</sup> в группах R1 и R2. Для идентификации ИФНγ<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток в выделенных  
 40 клетках поверхности клеток окрашивали на маркеры клеток крови, например, с  
 помощью флуоресцентно меченого APC-су7 антитела против CD45 человека и  
 флуоресцентно меченого BV510 антитела против CD8 человека, фиксировали с помощью  
 2% PFA и проводили реакцию с 0,5% раствором сапонина и флуоресцентно меченым  
 PE-су7 антителом против ИФНγ человека. Затем ИФНγ<sup>+</sup> клетки в группе CD8<sup>+</sup> Т-клеток  
 45 измеряли с помощью анализа FACS. Долю клеток определяли способом, описанным  
 выше, и вычисляли соотношение CD8<sup>+</sup>ИФНγ<sup>+</sup> и Treg, как показано на фиг. 14В.

[276] В соответствии с результатами в этом примере, в отличие от индивидуального  
 введения, комбинированное введение EU101 и Keytruda значительно повышало

инфильтрацию опухолевой ткани Т-лимфоцитами. Кроме того, наблюдали следующие результаты комбинированной обработки. Когда комбинированной обработке подвергали РВМС в здоровой гуманизированной мышши в качестве контроля, количество лимфоцитов повышалось приблизительно в 3 раза, и инфильтрирующие лимфоциты на 1 г опухоли повышались в 76 раз. Это означает, что большинство опухолеспецифических лимфоцитов активировались и рекрутировались в опухолевую ткань для уничтожения клеток-мишеней. В частности, когда в группе комбинированного лечения измеряли РВМС, как показано на **фиг. 14А**, CD4<sup>+</sup> Т-клетки не повышались значительно, но цитотоксические CD8<sup>+</sup> Т-клетки повышались приблизительно в 5 раз. Кроме того, в группе комбинированного лечения наблюдали 100-кратное повышение количества CD8<sup>+</sup> Т-клеток на 1 г опухолевой ткани. Кроме того, в результате также значительно повышалась доля CD8<sup>+</sup> Т-клеток, секретирующих ИФН $\gamma$ , и регуляторных Т-клеток (**фиг. 14В**). То есть, можно сказать, что комбинированно лечение с использованием EU101 и средства против PD-1 приводит к значительному повышению эффекторных Т-клеток, и, таким образом, эффективно осуществляют ингибирование опухоли.

Анализ ИФН $\gamma$  в сыворотке или опухолевой жидкости, полученной из ткани колоректальной аденокарциномы человека после индивидуального и комбинированного лечения с использованием примера антитела против 4-1ВВ человека (EU101) и примера средства против PD-1 (Keytruda)

[277] После индивидуального введения и комбинированного введения примера антитела против 4-1ВВ человека (EU101) и примера средства против PD-1 (Keytruda) гуманизированным мышшам с имплантированными клетками HT29. В день прекращения анализов эффектов мышей из всех групп анатомировали для отделения опухоли и крови. Для отделения опухолевой жидкости, присутствующей в выделенной опухоли, 300 мкл 1-кратного PBS инъецировали в верхнюю часть опухолевой мембраны с использованием шприца емкостью 1 см<sup>3</sup> и получали протекающий раствор из нижней части опухолевой мембраны с использованием инсулинового шприца. Кроме того, в случае диссоциации опухолевой ткани, полученный раствор добавляли для диссоциации опухолевой ткани, а затем хранили. Кроме того, хранили сыворотку, полученную при отделении РВМС от крови посредством центрифугирования в градиенте фиколла. Хранящуюся сыворотку и опухолевую жидкость разводили и фильтровали с использованием фильтра 0,22 мкм (производитель: Corning). Использовали 10 мкл сыворотки для каждой группы и использовали 100 мкл опухолевой жидкости для измерения ИФН $\gamma$  человека и TGF- $\beta$  человека с использованием набора Ready-SET-Go для ELISA ИФН $\gamma$  человека (eBioscience) и набора Ready-SET-Go для ELISA TGF бета 1 человека (eBioscience). Результаты анализировали, сравнивая со стандартной кривой, предоставленной в каждом наборе для ELISA.

[278] В результате, по сравнению с индивидуальным введением EU101 и Keytruda, при комбинированном введении концентрация интерферона в сыворотке в группе мышей с опухолями была наиболее высокой. Т.к. механизм действия EU101 можно объяснить корреляцией ИФН $\gamma$  и противоопухолевого эффекта, оценивали уровни экспрессии ИФН $\gamma$  и TGF- $\beta$  в сыворотке здорового донора и в группе мышей с опухолями, которых подвергали комбинированному лечению. Относительно описанного в примере для сыворотки здорового донора, в группе комбинированного лечения, показанной на **фиг. 15А**, ИФН $\gamma$  повышался приблизительно в 16 раз, но цитокин, секретируемый клетками Treg, TGF- $\beta$ , снижался приблизительно на 65%. Кроме того, как показано на

фиг. 15В, концентрация ИФН $\gamma$  в опухолевой жидкости при комбинированном введении была гораздо более высокой (приблизительно в 213 раз), чем в контроле. В результате, благодаря EU101, в частности, по сравнению с контрольной группой, в группе комбинированного введения наблюдали значительное повышение секреции ИФН $\gamma$ .

5 Таким образом, можно подтвердить, что противоопухолевый эффект, вызванный улучшенным гуманизированным антителом против 4-1ВВ по изобретению, приводит к эффективной инфильтрации опухоли эффекторными Т-клетками, напрямую связанными с апоптозом злокачественных клеток, и значительному специфическому эффекту в опухолевой ткани по сравнению с группой, которую не подвергали введению.  
10 Другими словами, в настоящем описании подтверждено, что EU101 в качестве противоопухолевого средства обладает оптимальными условиями для апоптоза злокачественных клеток. Как правило, у пациентов со злокачественными новообразованиями противоопухолевые цитокины и противоопухолевый клеточный иммунитет значительно снижены, но можно ожидать, что EU101 будет индуцировать  
15 повышение противоопухолевых цитокинов и противоопухолевый клеточный иммунитет, что приведет к значительному терапевтическому эффекту.

[279] Таким образом, пример антитела против 4-1ВВ человека EU101 демонстрирует противоопухолевый эффект, опосредованный высокой экспрессией ИФН $\gamma$ , и такой эффект является дозозависимым, в связи с этим, концентрацию ИФН $\gamma$  в сыворотке  
20 пациента со злокачественным новообразованием можно использовать в качестве биомаркера для диагностики и оценки опухоли. Таким образом, в соответствии с эффективным лечением злокачественного новообразования или опухоли с помощью комбинированного введения EU101 и средства против PD-1 и прогнозированием с помощью измерения концентрации ИФН $\gamma$ , ожидают, что лечение будет более  
25 эффективным для каждого пациента.

**Пример 5 - Разделение и массивная пролиферация 4-1ВВ<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т-клеток *ex vivo* с использованием примера гуманизированного антитела против 4-1ВВ человека**

[280] Авторы настоящего изобретения использовали экспрессию 4-1ВВ в антиген-специфических активированных CD8<sup>+</sup> Т-клетках для выделения и очистки 4-1ВВ<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>  
30 Т-клеток, специфических для различных антигенов, с использованием антитела против 4-1ВВ (патент Кореи № 10-1503341). Следующий эксперимент осуществляли для исследования того, применимо ли также антитело EU101, представленное в настоящем описании, для выделения и массовой пролиферации антиген-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток.  
35

[281] Конструирование РВМС из периферической крови пациента со злокачественным новообразованием осуществляли, как описано в примере 4.1. Однако в этом примере специфические по антигену злокачественного новообразования недифференцированные Т-клетки можно получать способом, описанным в патентной заявке Кореи № 10-2016-  
40 0165224, поданной авторами настоящего изобретения. В этом примере для эффективного отделения 4-1ВВ<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток и массового получения 4-1ВВ<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток с высокой чистотой использовали способ пэннинга с помощью антитела против 4-1ВВ человека (EU101). 10 мкг/мл антитела против 4-1ВВ человека (EU101), разведенного в PBS, добавляли в колбу емкостью 10 мл, а затем хранили при 4°C в течение от 20 до 24 часов.  
45 После хранения удаляли супернатант, содержащий антитело, и, без промывания, к клеточным осадкам в колбе емкостью 10 мл добавляли раствор BSA, растворенного в количестве 2,5% в PBS, а затем хранили при 4°C в течение от 20 до 24 часов. Затем удаляли раствор BSA и каждую колбу дважды промывали 15 мл PBS. Полученные

ранее клетки суспендировали в среде X-VIVO 10, добавляли в покрытую антителом EU101 колбу, а затем инкубировали при 37°C в инкубаторе с CO<sub>2</sub> в течение 1 часа. После инкубации удаляли супернатант и клеточные осадки дважды промывали 10 мл среды RPMI1640 для удаления не связавшихся специфически клеток. В колбу добавляли 1% собственной сыворотки и среду X-VIVO 10, содержащую 1000 ME/мл ИЛ-2, а затем культивировали в течение 14 дней. В примере некоторые клетки собирали, а затем окрашивали для измерения чистоты и фенотипов выделенных клеток. Как показано на **фиг. 16А и 16В**, подтверждали, что до пэннинга с использованием антитела 94 kvt доля антиген-специфических 4-1ВВ<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток повышалась на 43,2% (доля CD8<sup>+</sup> Т-клеток: 58,6%), а после пэннинга с использованием антитела EU101 доля антиген-специфических рCMV<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток повышалась на 60,0% (доля CD8<sup>+</sup> Т-клеток: 79,3%). Это означает, что антиген-специфические 4-1ВВ<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клетки можно выделять с высокой чистотой при использовании EU101. Антиген-специфические 4-1ВВ<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клетки, выделенные, как описано выше, легко можно подвергать массовой продукции способом, описанным в патентной заявке Кореи № 10-2016-0165224, поданной авторами настоящего изобретения.

[282] Из представленного выше описания специалистам в этой области будет понятно, что настоящее изобретение можно реализовать в различных конкретных формах без изменения технической идеи или важных характеристик настоящего изобретения. Однако настоящее изобретение не ограничено конкретными примерами вариантов осуществления, и следует понимать, что все модификации или модифицированные формы, предусмотренные значением и диапазоном формулы изобретения, и их эквиваленты входят в объем настоящего изобретения.

[283] Антитела против 4-1ВВ человека по изобретению демонстрируют ряд благоприятных свойств, таких как, например, аффинность, превосходящая аффинность референсного антитела, и/или их можно использовать в отдельности или в комбинации с другим противоопухолевым средством для диагностики, профилактики или лечения злокачественного новообразования или опухоли или для ингибирования роста злокачественного новообразования.

[284] Настоящее изобретение описано выше со ссылкой на примеры, но специалистам в этой области будет понятно, что настоящее изобретение можно изменять и модифицировать в различных формах без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения, описанного в сопутствующей формуле изобретения.

### **ЭКВИВАЛЕНТЫ**

[285] Специалистам в этой области будут понятны многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, или они могут определить их с использованием не более чем рутинного экспериментирования. Объем настоящего изобретения не ограничен представленным выше описанием, а изложен в формуле изобретения.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ЮТАЙЛЕКС КО., ЛТД.

<120> АНТИТЕЛА ПРОТИВ 4-1ВВ ЧЕЛОВЕКА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

<130> FE18042WO

<140> PCT/IB2018/000043

<141> 2018-01-05

<150> 62/443,281

<151> 2017-01-06

<160> 44  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1  
<211> 6  
5 <212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность  
<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид  
<400> 1  
10 Gln Thr Ile Ser Asp Tyr  
1 5  
<210> 2  
<211> 3  
<212> БЕЛОК  
15 <213> Искусственная последовательность  
<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид  
<400> 2  
Tyr Ala Ser  
20 1  
<210> 3  
<211> 9  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность  
25 <220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид  
<400> 3  
Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro Thr  
1 5  
30 <210> 4  
<211> 9  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность  
<220>  
35 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид  
<400> 4  
Gln Asp Gly His Ser Trp Pro Pro Thr  
1 5  
<210> 5  
40 <211> 8  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность  
<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид  
45 <400> 5  
Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp  
1 5  
<210> 6

<211> 8  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 5 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид  
 <400> 6  
 Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr  
 1 5  
 <210> 7  
 10 <211> 12  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид  
 15 <400> 7  
 Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr  
 1 5 10  
 <210> 8  
 <211> 12  
 20 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид  
 <400> 8  
 25 Ala Arg Ser Phe Lys Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr  
 1 5 10  
 <210> 9  
 <211> 107  
 <212> БЕЛОК  
 30 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид  
 <400> 9  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly  
 35 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 40 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro  
 45 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105  
 <210> 10

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

5 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 10

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
10          20          25          30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35          40          45
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50          55          60
15 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65          70          75          80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Trp Pro Pro
          85          90          95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
20          100         105

```

<210> 11

<211> 119

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

25 <220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 11

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
30 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45
Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
35          50          55          60
Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
40 Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
          100         105         110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 12

45 <211> 119

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>





<211> 38  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 5 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид  
 <400> 18  
 Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Arg Asp Thr  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp  
 10                   20                   25                   30  
 Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   35  
 <210> 19  
 <211> 38  
 15 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид  
 <400> 19  
 20 Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp  
                   20                   25                   30  
 Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 25                   35  
 <210> 20  
 <211> 38  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 30 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид  
 <400> 20  
 Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr  
 1                   5                   10                   15  
 35 Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp  
                   20                   25                   30  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   35  
 <210> 21  
 40 <211> 107  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 21  
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 45 1                   5                   10                   15  
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
                   20                   25                   30  
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

RU 2725 811 C1

		35		40		45											
	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	
		50					55					60					
	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	
5	65					70					75					80	
	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	
					85						90				95		
	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
				100					105								
10	<210>	22															
	<211>	330															
	<212>	BEJOK															
	<213>	Homo sapiens															
	<400>	22															
15	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	
	1				5					10					15		
	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
				20					25					30			
	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
20			35					40					45				
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
		50					55						60				
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
	65					70					75					80	
25	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
				85							90				95		
	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
				100					105					110			
	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
30			115					120						125			
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
		130					135						140				
	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
	145					150					155					160	
35	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
				165							170					175	
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
				180					185					190			
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
40			195					200						205			
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
		210					215					220					
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	
	225					230						235				240	
45	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
				245						250					255		
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
				260					265						270		

RU 2 725 811 C1

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

5 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 23

10 <211> 330  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

15 <400> 23

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

20 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

25 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

30 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

35 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

40 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Ala Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

45 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

RU 2 725 811 C1

	260		265		270	
	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe					
	275		280		285	
	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn					
5	290		295		300	
	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr					
	305		310		315	320
	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
		325		330		
10	<210> 24					
	<211> 21					
	<212> ДНК					
	<213> Искусственная последовательность					
	<220>					
15	<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер					
	<400> 24					
	ggatccaca gatcattgca g					21
	<210> 25					
	<211> 27					
20	<212> ДНК					
	<213> Искусственная последовательность					
	<220>					
	<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер					
	<400> 25					
25	ttgagctcga gcctggctcct gaacaaca					27
	<210> 26					
	<211> 27					
	<212> ДНК					
	<213> Искусственная последовательность					
30	<220>					
	<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер					
	<400> 26					
	cgcgtggatc caaggagtgt tcctcca					27
	<210> 27					
35	<211> 27					
	<212> ДНК					
	<213> Искусственная последовательность					
	<220>					
	<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер					
40	<400> 27					
	ttgagctcga gacgtttctg atcgta					27
	<210> 28					
	<211> 27					
	<212> ДНК					
45	<213> Искусственная последовательность					
	<220>					
	<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер					
	<400> 28					

cgcgtggatc cggcatctgt cgaccct 27  
 <210> 29  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 5 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер  
 <400> 29  
 ttgagctcga ggatctgcgg agagtgt 27  
 10 <210> 30  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 15 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер  
 <400> 30  
 ggatccacaа gatcattgca g 21  
 <210> 31  
 <211> 21  
 20 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер  
 <400> 31  
 25 ctcgaggcat atgtcacagg t 21  
 <210> 32  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 30 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер  
 <400> 32  
 ggatccacaа gatcattgca g 21  
 <210> 33  
 35 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер  
 40 <400> 33  
 ctcgaggctg gaaaaactat 20  
 <210> 34  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 45 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер  
 <400> 34

	ggatcctgcc cagctggtac	20
	<210> 35	
	<211> 27	
	<212> ДНК	
5	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер	
	<400> 35	
	ttgagctcga gcctggcct gaаааса	27
10	<210> 36	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
15	<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер	
	<400> 36	
	ggatccagga atcagatttg c	21
	<210> 37	
	<211> 27	
20	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер	
	<400> 37	
25	ttgagctcga gcctggcct gaаааса	27
	<210> 38	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
30	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер	
	<400> 38	
	ggatccасаа gatcattgса g	21
	<210> 39	
35	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер	
40	<400> 39	
	ctcgaggсаа atctgattcc t	21
	<210> 40	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
45	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер	
	<400> 40	

ggatccaca gatcattgca g  
 <210> 41  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 5 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер  
 <400> 41  
 ctcgagtgga ggaacagggac t 21  
 10 <210> 42  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 15 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид  
 <400> 42  
 Asn Ala Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro  
 1 5 10  
 <210> 43  
 20 <211> 8  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид  
 25 <400> 43  
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 1 5  
 <210> 44  
 <211> 255  
 30 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 44  
 Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu  
 1 5 10 15  
 35 Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro  
 20 25 30  
 Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys  
 35 40 45  
 Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile  
 40 50 55 60  
 Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser  
 65 70 75 80  
 Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly  
 85 90 95  
 45 Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu  
 100 105 110  
 Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln  
 115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys  
 130 135 140  
 Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro  
 145 150 155 160  
 5 Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala  
 165 170 175  
 Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu  
 180 185 190  
 Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu  
 10 195 200 205  
 Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe  
 210 215 220  
 Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly  
 225 230 235 240  
 15 Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
 245 250 255

(57) Формула изобретения

1. Антитело против 4-1ВВ человека или его антигенсвязывающий фрагмент,  
 20 содержащее:

(a) CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:5,  
 CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:6, и  
 CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:7 или 8; и

(b) CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:1,  
 25 CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:2, и  
 CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:4.

2. Антитело против 4-1ВВ человека или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1,  
 которое содержит:

(a) каркасную область 1 (FR1) тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ  
 30 ID NO:16 или 17; и/или

(b) каркасную область 3 (FR3) тяжелой цепи, содержащую последовательность любой  
 из SEQ ID NO:18-20.

3. Антитело против 4-1ВВ человека или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1  
 или 2, которое содержит любое из следующего:

(a) переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность, которая  
 35 по меньшей мере на 98% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO:11-  
 14;

(b) переменный домен легкой цепи, содержащий последовательность, которая по  
 меньшей мере на 98% идентична последовательности SEQ ID NO:10; или

(c) переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность, которая  
 40 по меньшей мере на 98% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO:11-  
 14, и переменный домен легкой цепи, содержащий последовательность, которая по  
 меньшей мере на 98% идентична последовательности SEQ ID NO:10.

4. Антитело против 4-1ВВ человека или его антигенсвязывающий фрагмент по  
 45 любому из пп.1-3, которое содержит любое из следующего:

(a) переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность, выбранную  
 из SEQ ID NO:11-14;

(b) переменный домен легкой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO:

10; или

(с) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность, выбранную из SEQ ID NO:11-14, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO:10.

5 5. Антитело против 4-1ВВ человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, которое имеет аффинность связывания (KD) с молекулой 4-1ВВ человека от  $1 \times 10^{-7}$  до  $1 \times 10^{-12}$  М.

10 6. Антитело против 4-1ВВ человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, которое связывается с эпитопом во внеклеточном домене полипептида 4-1ВВ человека.

7. Антитело против 4-1ВВ человека или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, где связывание с эпитопом во внеклеточном домене 4-1ВВ человека нейтрализовано в результате одной или нескольких мутаций в положениях N30, D38, N39 и R41 SEQ ID NO:44.

15 8. Антитело против 4-1ВВ человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, которое представляет собой или содержит гуманизированное антитело.

20 9. Антитело против 4-1ВВ человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, которое содержит константный домен иммуноглобулина, где константный домен выбран из IgG1, IgG2, IgG4, IgA, IgE, IgM и IgD.

10. Антитело против 4-1ВВ человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, которое представляет собой или содержит IgG1 человека.

25 11. Антитело против 4-1ВВ человека или его антигенсвязывающий фрагмент по п.10, где IgG1 представляет собой или содержит последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO:22 или 23.

12. Антитело против 4-1ВВ человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, которое является моноклональным антителом.

30 13. Антитело против 4-1ВВ человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12, где фрагмент антитела является Fab-фрагментом, Fab'-фрагментом, F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом или scFv-фрагментом.

14. Фармацевтическая композиция для лечения злокачественного новообразования у пациента, содержащая:

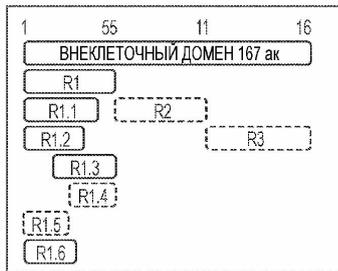
35 (а) терапевтически эффективное количество антитела против 4-1ВВ человека или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-13; и

(b) фармацевтически приемлемый носитель.

40

45

ФИГ.1А



ECD

R1 (1-55 ак)

R2 (56-110 ак)

R3 (110-167 ак)

R1.1 (1-45 ак)

R1.2 (1-35 ак)

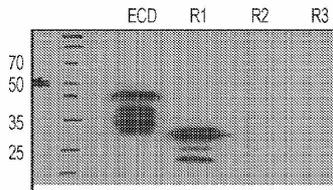
R1.3 (11-55 ак)

R1.4 (21-55 ак)

R1.5 (1-25 ак)

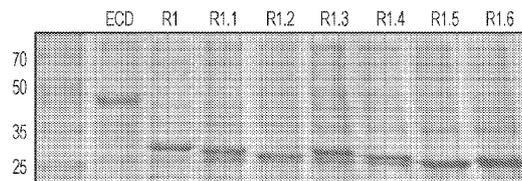
R1.6 (1-30 ак)

ФИГ.1В

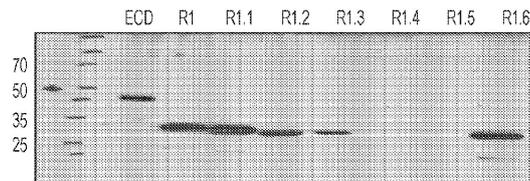


2/17

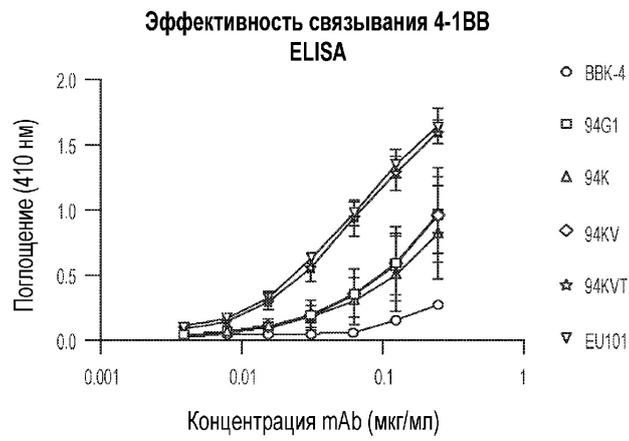
ФИГ.2А



ФИГ.2В

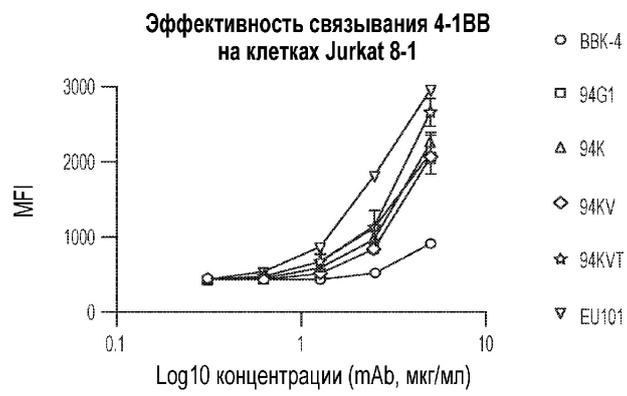


ФИГ.3



4/17

ФИГ.4



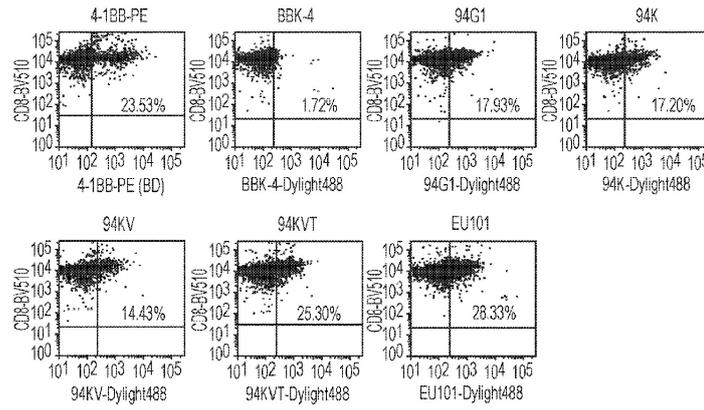
5/17

ФИГ.5

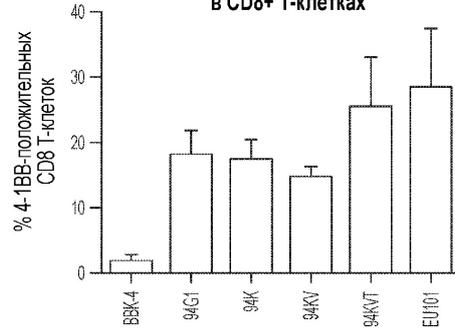
Антитело	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	KD (M)
EU101	1.57e10	1.8e-5	6.36e-11
94G1	1.66e9	1.18e-4	6.02e-10

6/17

ФИГ.6

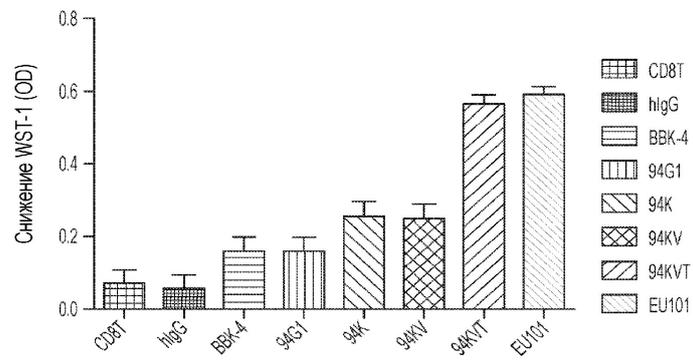


Эффективность связывания 4-1ВВ  
в CD8<sup>+</sup> Т-клетках

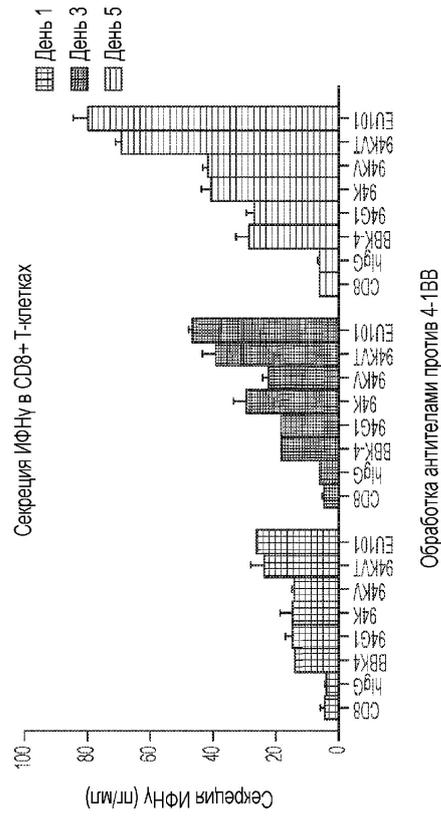


7/17

ФИГ.7

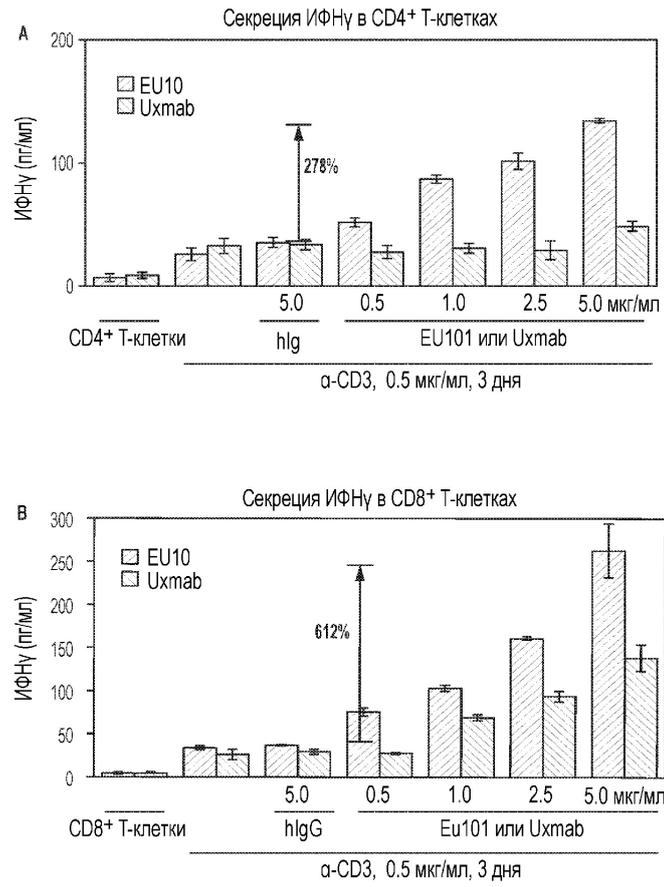


ФИГ. 8



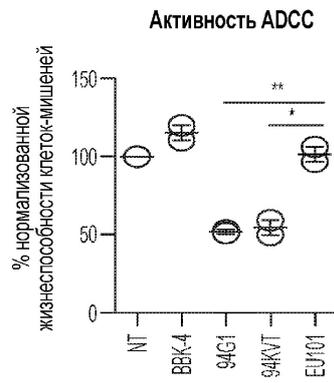
9/17

ФИГ.9



10/17

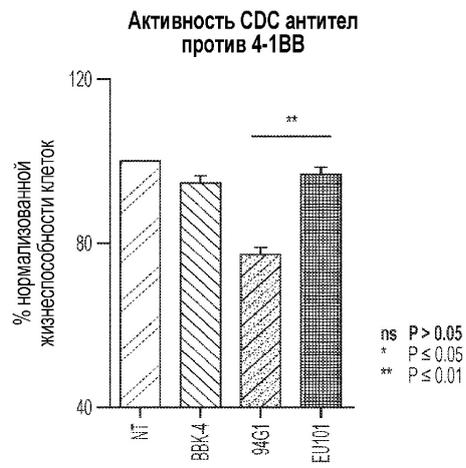
ФИГ.10А



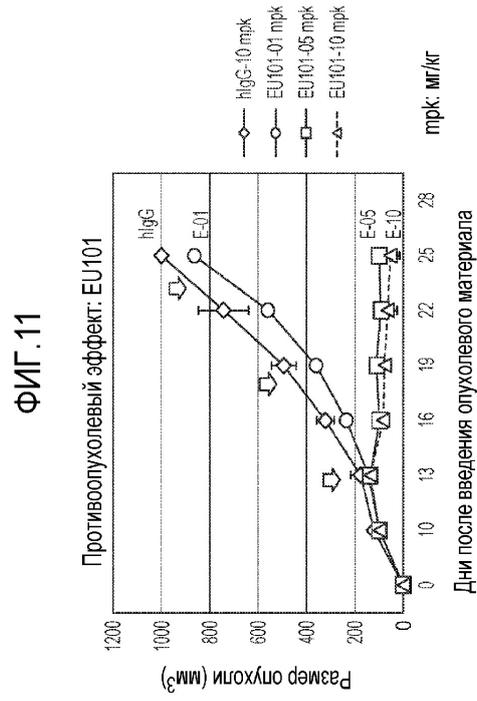
ns  $P > 0.05$       ВВК-4: IgG2a мыши  
 \*  $P \leq 0.05$       94G1, 94KVT: IgG1 человека  
 \*\*  $P \leq 0.01$       EU101: сконструированный IgG1

11/17

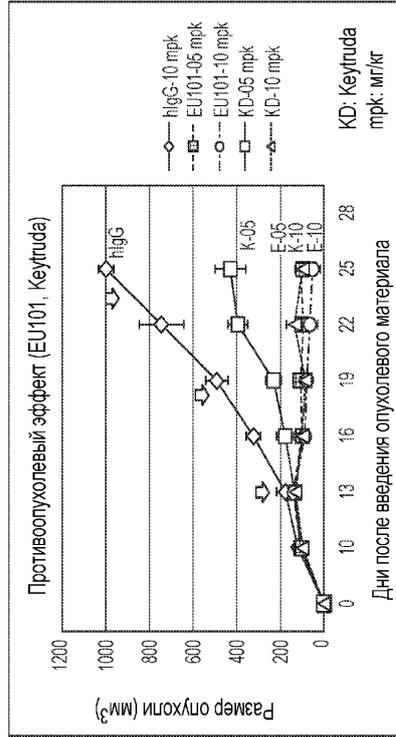
ФИГ.10В



12/17



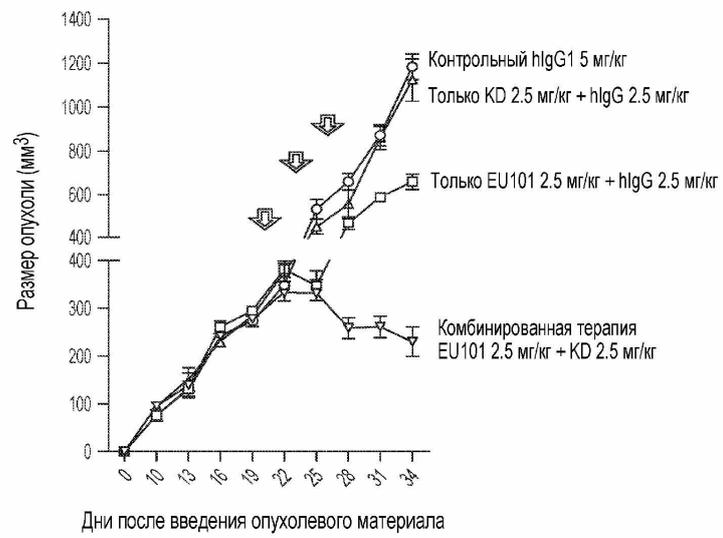
ФИГ. 12



14/17

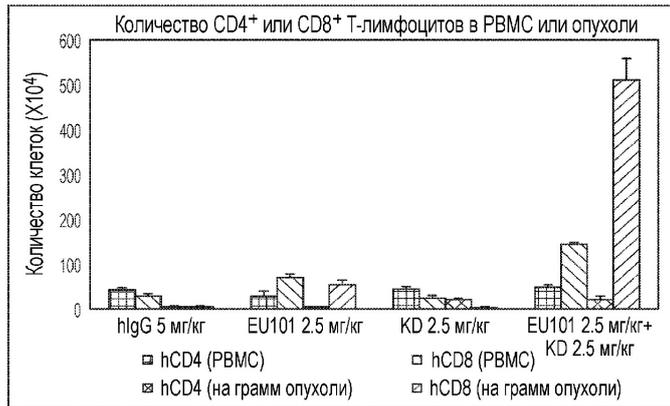
ФИГ.13

Комбинированная терапия: EU101 и KD

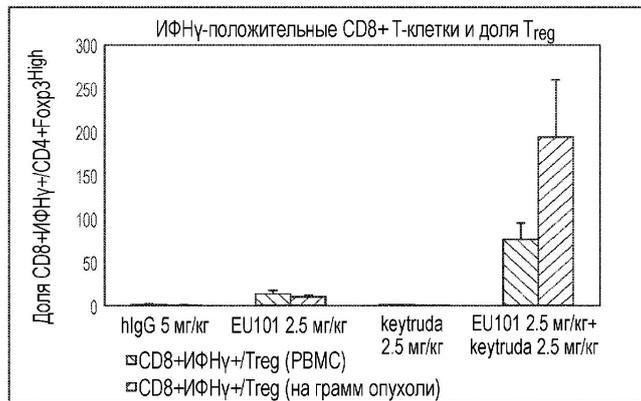


15/17

ФИГ.14А

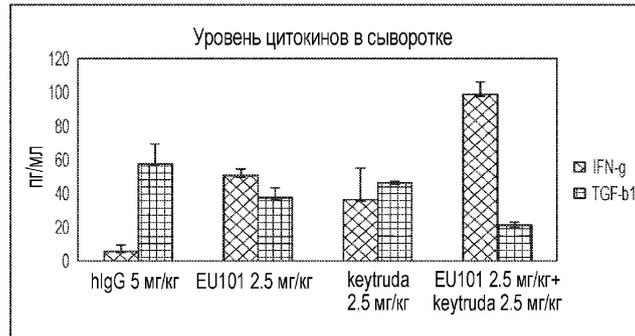


ФИГ.14В

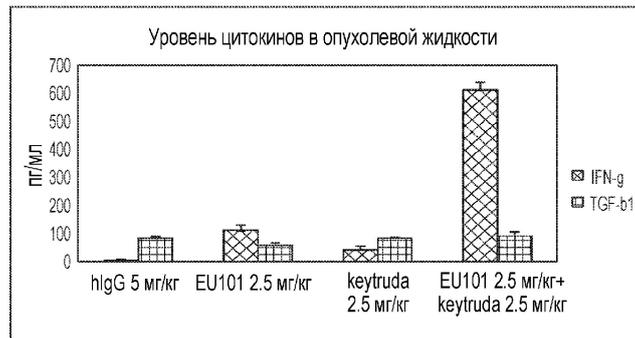


16/17

ФИГ.15А

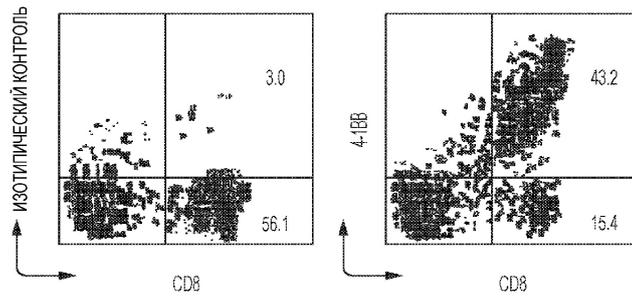


ФИГ.15В



17/17

ФИГ.16А



ФИГ.16В

