

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/2818 (2024.08); C07K 16/283 (2024.08); C07K 16/2878 (2024.08); C07K 2317/30 (2024.08); C07K 2317/31 (2024.08); C07K 2317/34 (2024.08); C07K 2317/73 (2024.08); A61K 2039/505 (2024.08); A61P 31/00 (2024.08); A61P 35/00 (2024.08)

(21)(22) Заявка: 2021115554, 01.11.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
01.11.2019Дата регистрации:  
01.11.2024

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
01.11.2018 EP 18203993.3

(43) Дата публикации заявки: 01.12.2022 Бюл. № 34

(45) Опубликовано: 01.11.2024 Бюл. № 31

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 01.06.2021(86) Заявка РСТ:  
EP 2019/080004 (01.11.2019)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2020/089474 (07.05.2020)Адрес для переписки:  
191036, Санкт-Петербург, а/я 24,  
"НЕВИНПАТ"

(72) Автор(ы):

ФРЕНДЕУС, Бьёрн (SE),  
ТЕЙГЕ, Ингрид (SE),  
МОРТЕНССОН, Линда (SE),  
ХОЛЬМКВИСТ, Петра (SE),  
СЕММРИХ, Моника (SE)

(73) Патентообладатель(и):

БИОИНВЕНТ ИНТЕРНЭШНЛ АБ (SE)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: WO 2014124134 A1, 14.08.2014. WO  
2016187068 A1, 24.11.2016. WO 2017083525 A1,  
18.05.2017. WO 2017197331 A2, 16.11.2017. WO  
2017220711 A1, 28.12.2017. RU 2401842 C2,  
20.10.2010.

## (54) НОВЫЕ МОЛЕКУЛЫ АНТАГОНИСТИЧЕСКИХ АНТИ-TNFR2-АНТИТЕЛ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биотехнологии. Представлены: молекула антагонистического антитела, которая специфически связывается с TNFR2 на клетке-мишени, благодаря чему блокирует связывание TNF-α с TNFR2 и блокирует передачу сигнала через TNFR2; выделенная нуклеотидная последовательность, кодирующая молекулу антитела; плазмида для экспрессии антитела, содержащая нуклеотидную последовательность; вирус для экспрессии и внеклеточного

высвобождения антитела, содержащий нуклеотидную последовательность или плазмиду, и клетка в качестве носителя для доставки антитела, а также их применение в медицине в лечении рака или инфекции, вызванной внутриклеточным патогеном. Также раскрыты фармацевтическая композиция для лечения рака или инфекции, вызванной внутриклеточным патогеном, у пациентов и способы лечения рака и инфекции, вызванной внутриклеточным патогеном, у пациентов. Изобретение может

применяться при лечении рака или инфекций,  
вызванных внутриклеточными патогенами. 12 н.

и 36 з.п. ф-лы, 21 ил., 11 табл., 7 пр.

R U 2 8 2 9 5 8 7 C 2

R U 2 8 2 9 5 8 7 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

*C07K 16/28* (2006.01)*A61K 39/00* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)*A61P 31/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C07K 16/2818* (2024.08); *C07K 16/283* (2024.08); *C07K 16/2878* (2024.08); *C07K 2317/30* (2024.08); *C07K 2317/31* (2024.08); *C07K 2317/34* (2024.08); *C07K 2317/73* (2024.08); *A61K 2039/505* (2024.08); *A61P 31/00* (2024.08); *A61P 35/00* (2024.08)

(21)(22) Application: **2021115554, 01.11.2019**

(24) Effective date for property rights:  
**01.11.2019**

Registration date:  
**01.11.2024**

Priority:

(30) Convention priority:  
**01.11.2018 EP 18203993.3**

(43) Application published: **01.12.2022 Bull. № 34**(45) Date of publication: **01.11.2024 Bull. № 31**(85) Commencement of national phase: **01.06.2021**

(86) PCT application:  
**EP 2019/080004 (01.11.2019)**

(87) PCT publication:  
**WO 2020/089474 (07.05.2020)**

Mail address:  
**191036, Sankt-Peterburg, a/ya 24, "NEVINPAT"**

(72) Inventor(s):

**FRENDEUS, Bjorn (SE),  
TEIGE, Ingrid (SE),  
MARTENSSON, Linda (SE),  
HOLMKVIST, Petra (SE),  
SEMMRICH, Monika (SE)**

(73) Proprietor(s):

**BIOINVENT INTERNATIONAL AB (SE)**(54) **NOVEL MOLECULES OF ANTAGONIST ANTI-TNFR2 ANTIBODIES**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: disclosed are an antagonist antibody molecule which specifically binds to TNFR2 on a target cell, thereby blocking TNF- $\alpha$  binding with TNFR2 and blocks signal transmission through TNFR2; an isolated nucleotide sequence encoding an antibody molecule; an antibody expression plasmid comprising a nucleotide sequence; a virus for expression and extracellular release of an antibody containing a nucleotide sequence or a plasmid, and a cell as a carrier for antibody

delivery, as well as their use in medicine in the treatment of cancer or infection caused by an intracellular pathogen. Also disclosed are a pharmaceutical composition for treating cancer or an infection caused by an intracellular pathogen in patients and methods of treating cancer and an infection caused by an intracellular pathogen in patients.

EFFECT: invention can be used in treating cancer or infections caused by intracellular pathogens.

48 cl, 21 dwg, 11 tbl, 7 ex

## Область техники

Данное изобретение относится к новым молекулам антагонистических антител, которые специфически связываются с рецептором второго типа фактора некроза опухоли (TNFR2) на клетках-мишенях, благодаря чему блокируют связывание лиганда TNF- $\alpha$  с TNFR2, и которые также блокируют передачу сигналов через TNFR2, при этом указанные молекулы антител также связываются с Fc-рецептором посредством своего Fc-участка. Изобретение также относится к применению указанных молекул в медицине, например, для лечения рака или инфекций, вызванных внутриклеточным патогеном.

## Уровень техники

Рецептор второго типа фактора некроза опухоли (TNF) (TNFR-2, TNFR2 или TNFR1I), также известный как член 1B суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF1B) и CD120b, представляет собой мембранный рецептор, связывающий фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$  или TNF $\alpha$ ). Он обнаруживается, например, на поверхности Т-клеток, моноцитов и макрофагов, и может активировать пролиферацию клеток, экспрессирующих рецептор TNFR2, через ядерный фактор каппа В (NF- $\kappa$ B). Примечательно, что уровень экспрессии TNFR2 сильно повышается при раке и, в частности, на инфильтрирующих опухоль иммунных клетках, например, регуляторных Т-клетках (Treg-клетках), цитотоксических эффекторных CD8<sup>+</sup> Т-клетках и различных субпопуляциях миелоидных клеток.

TNFR2 рассматривался в качестве перспективного объекта для иммунотерапии рака, и был описан высокий уровень его экспрессии на поверхности, среди прочего, внутриопухолевых Treg-клеток и многих опухолевых клеток человека (Williams GS et al, *Oncotarget*. 2016; 7(42): 68278–68291; Vanamee ES et al, *Trends in Molecular Medicine*, 2017, vol. 23, issue 11, 1037-1046, *Frontiers in Immunology*, November 2017 | Volume 8 | Article 1482, *Sci Signal*. 2018 Jan 2;11(511)).

Регуляторные Т-клетки (которые также могут называться Treg-клетками, Treg или T<sub>reg</sub>, и которые ранее были известны как клетки Т-супрессоры или супрессорные регуляторные Т-клетки) составляют субпопуляцию Т-клеток, способных подавлять другие иммунные клетки в нормальных и патологических иммунных условиях. Treg представляют собой CD4-положительные клетки (CD4<sup>+</sup> клетки). Существуют и другие CD4<sup>+</sup> Т-клетки, которые не являются Treg-клетками; однако Treg-клетки могут быть отличимы от не-Treg CD4<sup>+</sup> клеток в том, что Treg-клетки также являются FOXP3-положительными (FOXP3<sup>+</sup>), тогда как не-Treg CD4<sup>+</sup> клетки являются FOXP3-отрицательными (FOXP3<sup>-</sup>). Treg-клетки также могут быть отличимы от не-Treg CD4<sup>+</sup> клеток в том смысле, что Treg-клетки также имеют фенотип CD25<sup>+</sup>CD127<sup>neg/low</sup>, в то время как не-Treg CD4<sup>+</sup> клетки имеют фенотип либо CD25-CD127<sup>+</sup>, либо CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>.

TNFR2 также рассматривался в связи с аутоиммунными заболеваниями (Faustman DL et al, *Front Immunol*. 2013; 4: 478, *Clin Transl Immunology*. 2016 Jan 8; 5(1), *J Neurosci*. 2016 May 4; 36(18):5128-43) and inflammatory diseases (Ait-Ali D et al, *Endocrinology*. 2008 Jun; 149(6):2840-52, *Sci Rep*. 2016 Sep 7;6:32834).

Анти-TNFR2 антитела разных типов и с различными характеристиками также были описаны ранее. Например, в работе Williams et al (*Oncotarget*. 2016 Oct 18; 7 (42): 68278-68291) описываются как блокирующие лиганд, так и неблокирующие лиганд агонистические антитела.

В документе WO 2014/124134 раскрывается применение агониста TNFR2, такого как



агонистическое анти-TNFR2 антитело и/или активатор NF-κB для получения *in vitro* композиции, обогащенной CD4+CD25<sup>hi</sup> Treg-клетками. Утверждается, что композиция пригодна для лечения иммунологических нарушений или инфекционных заболеваний у пациентов. Кроме того, в документе WO 2014/124134 описываются антитела-антагонисты TNFR2, которые могут связывать один или два эпитопа TNFR2. Первый из этих эпитопов содержал последовательность QTAQMCCSKCSPGQNAKVFC, а второй эпитоп содержал одну определенную аминокислоту в одном определенном положении аминокислоты TNFR человека; второй эпитоп может содержать последовательность RLCAPLRKCRPGF. Утверждается, что такие антагонисты TNFR2 пригодны для получения композиций, обогащенных лимфоцитами и истощенных Treg-клетками. В выданном патенте США № 9821010, происходящем от данной заявки РСТ, антагонистическое антитело характеризовалось способностью избирательно связываться с эпитопом в последовательности KQEGCRLCAPLRKCRPGFVG, например, эпитопом, содержащим последовательность RLCAPLRKCRPGF. Утверждается, что антагонисты TNFR2 и композиции, полученные с применением антагонистов TNFR2, являются пригодными для лечения пролиферативных нарушений, например, рака, или инфекционных заболеваний.

В документе WO 2016/187068 описываются антитела, способные антагонизировать члены суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей, такие как TNFR2. Утверждается, что антитела пригодны для модуляции Treg-клеток, например, в иммунотерапии для лечения пролиферативных нарушений и инфекционных заболеваний. В частности, в указанном документе описываются антитела-антагонисты TNFR2, связывающиеся со специфическими эпитопами TNFR2 человека, и представлен ряд специфических последовательностей определяющих комплементарность участков (CDR) таких антител. Утверждается, что данные в документе WO 2016/187068 демонстрируют то, что, вероятно, за модуляцию роста Treg-клеток отвечает скорее специфическое связывание Fab-участков антител-антагонистов TNFR2 с TNFR2, а не неспецифическое связывание Fc-участков таких антител.

В документе WO 2017/040312 описываются анти-TNFR2 антитела и, в частности, агонистические анти-TNFR2 антитела, которые способны стимулировать передачу сигналов через TNFR2 и оказывать влияние на распространение или пролиферацию Treg-клеток. В документе WO 2017/040312 описываются антитела, которые специфически связываются с эпитопом, содержащим последовательность KCSPG, а не с эпитопом, содержащим последовательность KCRPG, что в результате исключает описанные выше антитела из документа US 9821010, или, в качестве альтернативы, не связываются с другим членом суперсемейства TNFR. Утверждается, что агонистические антитела пригодны при лечении иммунологических заболеваний. В документе WO 2017/040312 также описывается полная последовательность TNFR2 человека.

В документе WO 2017/083525 обсуждаются фармакологические композиции, содержащие анти-TNFR2 антитела, и их применение при лечении нарушений, связанных с TNF-α и/или TNFR2, например рака. В документе WO 2017/083525 также рассматриваются антитела, содержащие Fc-домен IgG1 человека, который является нулевым для связывания с Fcγ-рецептором, а также подавление экспансии Treg.

В документе WO 2017/197331 описываются антитела-антагонисты TNFR2, содержащие определяющий комплементарность регион тяжелой цепи 3, имеющий специфические последовательности, и обсуждается снижение или ингибирование пролиферации Treg-клеток и/или стимулирование пролиферации эффекторных Т-клеток.

Fc-рецепторы представляют собой мембранные белки, которые обнаруживаются на

клеточной поверхности иммунных эффекторных клеток, включая моноциты, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, тучные клетки, базофилы, эозинофилы, а также клетки натуральных киллеров и В-лимфоциты. Название происходит от специфичности их связывания с Fc-участком антител. Fc-рецепторы находятся на клеточной мембране, также известной как плазматическая мембрана или цитоплазматическая мембрана. Fc-рецепторы можно подразделить на активирующие Fc $\gamma$ R и ингибирующие Fc $\gamma$ R, которые, как известно, координируют клеточную активацию посредством связывания Fc-участка агрегированного иммуноглобулина G и передачи активирующих или ингибирующих сигналов в клетку через внутриклеточные активационный тирозинсодержащий мотив иммунорецепторов (ITAM) или ингибирующий тирозинсодержащий мотив иммунорецепторов (ITIM). Связывание агрегированного иммуноглобулина или иммунных комплексов с помощью FcR может опосредовать интернализацию антитела в клетку и может приводить к антитело-опосредованному фагоцитозу, антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности или презентации антигена или перекрестной презентации антигена. Также известно, что FcR опосредуют или усиливают перекрестное связывание рецепторов, связываемых с антителами, на клеточной поверхности. Такое перекрестное связывание, как известно, требуется для образования способности у некоторых (Li et al. 2011. 'Inhibitory Fc $\gamma$  receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies', *Science*, 333: 1030-4; White et al. 2011. 'Interaction with Fc $\gamma$ RIIB is critical for the agonistic activity of anti-CD40 monoclonal antibody', *J Immunol*, 187: 1754-63), но не у всех (Richman et al. 2014. 'Anti-human CD40 monoclonal antibody therapy is potent without FcR crosslinking', *Oncoimmunology*, 3: e28610) антител активировать передачу сигналов в клетках-мишенях и может потребоваться либо не потребоваться для достижения терапевтических эффектов.

Подгруппой Fc-рецепторов являются Fc $\gamma$ -рецепторы (Fc-гамма-рецепторы, Fc $\gamma$ R, Fc $\gamma$ R), которые специфичны для антител IgG. Существует два типа Fc $\gamma$ -рецепторов: активирующие Fc $\gamma$ -рецепторы (также именуемые активационными Fc $\gamma$ -рецепторами) и ингибирующие Fc $\gamma$ -рецепторы. Активирующие и ингибирующие рецепторы передают свои сигналы через активационные тирозинсодержащие мотивы иммунорецепторов (ITAM) или ингибирующие тирозинсодержащие мотивы иммунорецепторов (ITIM) соответственно. В человеческом организме Fc $\gamma$ RIIb (CD32b) является ингибирующим Fc $\gamma$ -рецептором, тогда как Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RIIa (CD32a), Fc $\gamma$ RIIc (CD32c) и Fc $\gamma$ RIIIa (CD16a) являются активирующими Fc $\gamma$ -рецепторами. Fc $\gamma$ RIIIb является гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-закрепленным рецептором, экспрессируемым на нейтрофилах, у которого отсутствует мотив ITAM, но благодаря его способности сшивать липидные рафты и задействовать другие рецепторы он также считается активирующим. У мышей активирующими рецепторами являются Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIII и Fc $\gamma$ RIV.

Хорошо известно, что антитела могут модулировать активность иммунных клеток посредством взаимодействия с Fc $\gamma$ -рецепторами. В частности, то, как иммунные комплексы антител модулируют активацию иммунных клеток, определяется относительным задействованием их активирующих и ингибирующих Fc $\gamma$ -рецепторов. Различные изотипы антител связываются с активирующими и ингибирующими Fc $\gamma$ -рецепторами с различной аффинностью, что приводит к различным значениям A:I (отношения активации к ингибированию) (Nimmerjahn et al.; *Science*. 2005 Dec 2; 310 (5753):1510-2).

Связываясь с ингибирующими Fc $\gamma$ -рецепторами, антитело может ингибировать,

блокировать и/или снижать функции эффекторных клеток. Связываясь с ингибирующими FcγR, антитела могут также стимулировать активацию клеток за счет агрегации нацеленных на антитела сигнальных рецепторов на клетке-мишени (Li et al. 2011.

'Inhibitory Fcγ receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies', Science, 333: 1030-4; White et al. 2011. 'Interaction with FcγRIIB is critical for the agonistic activity of anti-CD40 monoclonal antibody', J Immunol, 187: 1754-63; White et al. 2014. 'Fcγ receptor dependency of agonistic CD40 antibody in lymphoma therapy can be overcome through antibody multimerization', J Immunol, 193: 1828-35).

Связываясь с активирующими Fcγ-рецепторами, антитело может активировать функции эффекторных клеток и тем самым запускать такие механизмы, как антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), высвобождение цитокинов и/или антителозависимый эндоцитоз, а также нетоз (то есть активацию и высвобождение нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET)) в случае нейтрофилов. Связывание антител с активирующими Fcγ-рецепторами также может приводить к увеличению некоторых маркеров активации, таких как CD40, МНСII, CD38, CD80 и/или CD86.

Новые данные, опубликованные в числе прочих авторами данного изобретения, демонстрируют критическую и дифференцированную зависимость терапевтической эффективности от связывания агонистов Т-клеточного CD8 и Treg-истощающих анти-4-1BB антител соответственно с активирующими и ингибирующими FcγR (Buchan et al., 'Antibodies to Costimulatory Receptor 4-1BB Enhance Anti-tumor Immunity via T Regulatory Cell Depletion and Promotion of CD8 T Cell Effector Function', Immunity 2018 49(5):958-970). Более того, что важно, одновременное введение агонистов Т-клеточного CD8 и Treg-истощающих анти-4-1BB антител, оптимизированных для связывания соответственно с активирующими и ингибирующими FcγR, приводило к ослаблению терапевтической активности. Эти данные демонстрируют критическую важность разработки антител с соответствующим и индивидуализированным участием активирующих и ингибирующих FcγR для получения максимальной терапевтической активности антител с различным механизмом действия. В то же время они демонстрируют, что неоптимальное задействие активирующих и ингибирующих FcγR может серьезно снижать терапевтическую эффективность.

Эти данные были неожиданными, поскольку они противоречили результатам, полученным для антител к другим членам TNFSR, особенно для иммуностимулирующих анти-CD40 антител, которые демонстрируют в качестве обязательного требования задействие ингибирующего, а не активирующего FcγR (Li et al. 2011. 'Inhibitory Fcγ receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies', Science, 333: 1030-4; White et al. 2011. 'Interaction with FcγRIIB is critical for the agonistic activity of anti-CD40 monoclonal antibody', J Immunol, 187: 1754-63). Взятые в совокупности, такие результаты демонстрируют, что FcγR-зависимость может варьироваться между антителами к разным мишеням одного и того же суперсемейства рецепторов, и даже между разными типами антител к одной и той же мишени таким образом, который трудно предсказать, но который может иметь решающее значение для понимания и использования при разработке антител для терапевтического применения.

Сущность изобретения

В ходе работы, приведшей к данному изобретению, а также к параллельному изобретению, были идентифицированы две основные различные группы анти-TNFR2 антител с мощным терапевтическим эффектами и отличающимися характеристиками

и механизмами действия.

Авторы изобретения впервые определили мощную терапевтическую активность антагонистических анти-TNFR2 антител, которые блокируют связывание TNF- $\alpha$  с рецептором TNFR2. Было продемонстрировано, что активность таких антител для  
5 получения терапевтической активности *in vivo* зависит от участия Fc $\gamma$ R и, в частности, от связывания с активирующим Fc $\gamma$ R. Было обнаружено, что эта группа или категория мощных терапевтических анти-TNFR2 реагентов характеризуется 1) выраженным блокированием и ингибированием индуцированной TNF- $\alpha$  (лигандом) передачи сигналов через TNFR2, и 2) активностью, зависящей от задействования Fc $\gamma$ R, причем наиболее  
10 значительное преимущество обеспечивается за счет задействования активирующих, а не ингибирующих Fc $\gamma$ R.

Затем изобретатели идентифицировали отдельную группу анти-TNFR2 антител со столь же мощной терапевтической активностью *in vivo*, характеристики которых, однако, во многих отношениях противоположны характеристикам антагонистических  
15 антител TNFR2 блокирующего типа, составляющих первую группу и данное изобретение. Анти-TNFR2 антитела этой второй группы не зависят от блокады TNF- $\alpha$  или ингибирования передачи сигналов через TNFR2 для получения терапевтической активности, но, напротив, характеризуются сильной активацией передачи сигналов через TNFR2. Кроме того, в отличие от блокирующих антител первой группы, агонистические антитела второй группы не проявляют безусловной зависимости от  
20 задействованных пар антитело:Fc $\gamma$ R, даже в случае, когда их активность возрастает для вариантов задействованных пар Fc $\gamma$ R:антитело. Кроме того, в отличие от антагонистических блокирующих антител первой группы, агонистические антитела второй группы проявляют наибольшую активность в вариантах антител с улучшенным  
25 связыванием с ингибирующими по сравнению с активирующими Fc $\gamma$ R.

Данное изобретение относится к первой группе анти-TNFR2 антител, то есть к молекулам антагонистических антител, которые, специфически связываясь с TNFR2, блокируют связывание TNF- $\alpha$  с TNFR2, а также блокируют передачу сигналов через TNFR2. Эти молекулы антител также содержат Fc-участок, связывающийся с Fc-  
30 рецептором, который пригоден для обеспечения Fc $\gamma$ R-зависимой элиминации или функциональной модуляции TNFR2-положительных клеток, в том числе, например, истощения Treg-клеток или модуляции ассоциированных с опухолью макрофагов.

Агонистические антитела, принадлежащие ко второй группе, используются в приведенных ниже примерах для сравнения с молекулами антагонистических  
35 блокирующих антител TNFR2 по данному изобретению. В примерах для сравнения используются также другие антитела с некоторыми характеристиками, аналогичными характеристикам первой или второй группы, или обеих, как поясняется ниже.

В силу сказанного данное изобретение относится к молекулам антагонистических антител, которые специфически связываются с TNFR2 на клетке-мишени, благодаря  
40 чему блокируют связывание TNF- $\alpha$  с TNFR2 и блокируют передачу сигналов через TNFR2, при этом молекулы антител также связываются с Fc $\gamma$ -рецептором посредством своего Fc-участка.

Данное изобретение также относится к конкретным примерам таких новых молекул агонистических и блокирующих анти-TNFR2 антител.

Данное изобретение также относится к выделенным нуклеотидным последовательностям, кодирующим по меньшей мере одну из вышеуказанных молекул  
антител.

Данное изобретение также относится к плазмидам, содержащим по меньшей мере

одну из вышеуказанных нуклеотидных последовательностей.

Данное изобретение также относится к вирусам, содержащим по меньшей мере одну из вышеуказанных нуклеотидных последовательностей или плазмид.

Данное изобретение также относится к клеткам, содержащим по меньшей мере одну из вышеуказанных нуклеотидных последовательностей или по меньшей мере одну из вышеуказанных плазмид, или по меньшей мере один из вышеуказанных вирусов.

Данное изобретение также относится к вышеуказанным молекулам антител, нуклеотидным последовательностям, плазмидам, вирусам и/или клеткам для медицинского применения.

Данное изобретение также относится к вышеуказанным молекулам антител, нуклеотидным последовательностям, плазмидам, вирусам и/или клеткам для применения при лечении рака или инфекций, вызванных внутриклеточным возбудителем.

Данное изобретение также относится к вышеуказанным молекулам антител, нуклеотидным последовательностям, плазмидам, вирусам и/или клеткам для применения при лечении рака или инфекций, вызванных внутриклеточным патогеном.

Данное изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим или состоящим из по меньшей мере одного из вышеуказанных молекул антител, нуклеотидных последовательностей, плазмид, вирусов и/или клеток и, необязательно, фармацевтически приемлемого разбавителя, носителя или наполнителя. Такая фармацевтическая композиция может применяться при лечении рака или инфекций, вызванных внутриклеточным патогеном.

Данное изобретение также относится к способам лечения рака или инфекций, вызванных внутриклеточным патогеном у пациента, включающим введение пациенту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного из вышеуказанных молекул антител, нуклеотидных последовательностей, плазмид, вирусов и/или клеток.

Данное изобретение также относится к молекулам антител, молекулам антител для применения, выделенным нуклеотидным последовательностям, выделенным нуклеотидным последовательностям для применения, плазмидам, плазмидам для применения, вирусам, вирусам для применения, клеткам, клеткам для применения, применениям, фармацевтическим композициям и способам лечения, описываемых в данном документе с учетом прилагаемого описания, примеров и/или фигур.

Подробное описание сущности изобретения

В силу сказанного данное изобретение относится к молекулам антагонистических антител, которые специфически связываются с TNFR2 на клетке-мишени, благодаря чему блокируют связывание TNF- $\alpha$  с TNFR2 и блокируют передачу сигналов через TNFR2, при этом указанные молекулы антител также связываются с Fc $\gamma$ -рецептором посредством своего Fc-участка.

Раскрываемые в данном документе молекулы антагонистических антител блокируют как связывание TNF- $\alpha$  с TNFR2, так и передачу сигналов через TNFR2. То, что молекулы антагонистических антител блокируют связывание TNF- $\alpha$  с TNFR2 означает в данном документе, что молекула антитела, которая связывается с рецептором TNFR2, в результате не позволяет лиганду TNF- $\alpha$  связываться с тем же рецептором. Это подробно показано в Примере 3. То, что раскрываемые в данном документе молекулы антагонистических антител блокируют передачу сигналов через TNFR2, означает, что они блокируют активацию клеток, опосредованную TNFR2. Было наглядно продемонстрировано, что TNF- $\alpha$ -опосредованная передача сигналов через TNFR2 запускает сигнальный каскад, который заканчивается активацией фактора ядерной транскрипции NF $\kappa$ B (Thommesen et al. "Distinct differences between TNF receptor 1- and TNF

receptor 2-mediated activation of NFkappaB". J Biochem Mol Biol. 2005 May 31; 38(3):281-9; Yang et al. "Role of TNF-TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications". Front Immunol. 2018 Apr 19; 9:784). Это, в свою очередь, приводит к активации клетки и синтезу нескольких провоспалительных факторов, одним из которых является интерферон-гамма (IFN- $\gamma$ , interferon-gamma) в клетках натуральных киллеров (NK, natural killers) (Liu et al. "NF- $\kappa$ B signaling in inflammation". Signal Transduct Target Ther. 2017; 2. pii: 17023; Tato et al. "Opposing roles of NF-kappaB family members in the regulation of NK cell proliferation and production of IFN-gamma". Int Immunol. 2006 Apr;18(4):505-13). В данном документе термины «передача сигнала через TNFR2» и «TNFR2-опосредованная активация» используются взаимозаменяемо.

Молекулы антител специфически связываются с TNFR2. Хорошо известно, что антитело специфически связывается или взаимодействует с определенной молекулой-мишенью или антигеном, и это означает, что антитело предпочтительно и избирательно связывает свою мишень, а не молекулу, которая не является мишенью. Термины «молекула антитела, которая специфически связывает TNFR2» или «молекула TNFR2-специфического антитела» означают антитело, которое связывает белок TNFR2 дозозависимым образом, но не связывается с неразличаемым белком. Кроме того, данное антитело связывает клетки, которые эндогенно экспрессируют TNFR2, и это связывание можно заблокировать путем предварительной инкубации тех же клеток с коммерчески доступным реагентом поликлональных антител TNFR2, демонстрируя то, что неспецифическое связывание не может быть обнаружено в случае, когда TNFR2 маскируется поликлональным реагентом. Это показано в Примере 2.

Молекула антитела, которая специфически связывает TNFR2 (или молекула анти-TNFR2 антитела), означает молекулу антитела, которая специфически связывается с по меньшей мере одним эпитопом во внеклеточном домене TNFR2. «Поверхностный антиген» и «эпитоп» представляют собой термины, которые может легко понять специалист в области иммунологии или клеточной биологии.

Способы оценки связывания белков известны специалистам в области биохимии и иммунологии. Специалистам в данной области понятно, что эти методы могут применяться для оценки связывания антитела с мишенью и/или связывания Fc-участка антитела с Fc-рецептором, а также для оценки относительной активности или специфичности, или ингибирования, или предотвращения, или снижения интенсивности таких взаимодействий. Примерами способов, которые могут применяться для оценки связывания белков, являются, например, иммуноанализы, инструментальный комплекс Biacore, вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ (RIA), иммуноферментные анализы (ELISA) и проточная цитометрия на основе сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) (относительно обсуждения специфичности антител см. Fundamental Immunology Second Edition, Raven Press, New York, at pages 332-336 (1989)).

Клетки-мишени, экспрессирующие TNFR2, с которыми связывается блокирующее антитело в соответствии с данным изобретением, включают иммунные клетки и/или опухолевые клетки, рассматриваемые выше и ниже. Эффект связывания молекул антагонистических антител согласно изобретению с TNFR2 может заключаться в изменении состава клеток в пораженной ткани. Такое изменение в составе может происходить за счет изменения количества и/или частоты TNFR2-экспрессирующих клеток в пораженной ткани. Например, эффект при раке включает увеличение количества внутриопухолевых Т-клеток, увеличение значения CD8<sup>+</sup> Т-клетки/Treg-клетки (то есть отношения количества CD8<sup>+</sup> Т-клеток к количеству Treg-клеток) и/или увеличение количества миелоидных клеток, связанных с противоопухолевыми, а не

проопухолевыми характеристиками. Это показано в Примере 5. В некоторых вариантах осуществления изобретения такие эффекты приводят к уменьшению количества тканевых Treg-клеток, увеличению количества CD8<sup>+</sup> эффекторных Т-клеток и изменению состава субпопуляций тканевых миелоидных клеток. Модуляция TNFR2-экспрессирующих клеток в ткани после терапевтической реализации изобретения *in vivo* с помощью суррогата (3-F10) молекул антагонистических антител согласно изобретению подробно показана в Примере 5. Для проверки аналогичных эффектов от молекул антагонистических антител человека согласно изобретению аналогичный эксперимент может быть проведен на мышах, у которых были удалены TNFR2 мыши и которые были сделаны трансгенными по TNFR2 человека. В альтернативном и предпочтительном варианте осуществления, хотя это и требует значительного времени и ресурсов, животных, трансгенных по TNFR2 человека и FcγR человека, можно получать по методике, аналогичной ранее описанной для CD40 и hFcγR (Dahan et al. 2016. 'Therapeutic Activity of Agonistic, Human Anti-CD40 Monoclonal Antibodies Requires Selective FcγR Engagement', Cancer Cell, 29: 820-31). Затем такие гуманизированные по TNFR2 и FcγR мыши могут аналогичным образом применяться для тестирования аналогичных эффектов от молекул антагонистических антител человека согласно изобретению.

В данном контексте термин «пораженная ткань» означает либо опухолевую ткань (то есть все клетки в микроокружении опухоли, включая опухолевые клетки, иммунные клетки, эндотелиальные клетки и стромальные клетки), либо ткань, инфицированную внутриклеточным патогеном.

Для выяснения того, блокирует ли молекула антитела связывание лиганда с TNFR2, можно применять анализ ELISA, определяющий количество лиганда TNF-α, связанного с иммобилизованным рецептором TNFR2 в присутствии антител, специфичных к TNFR2. Блокирующее антитело будет препятствовать связыванию лиганда TNF-α с иммобилизованным рецептором TNFR2. Это подробно показано и объясняется ниже в Примере 3.

Блокирующая молекула антитела согласно изобретению представляет собой полный блокатор, который, кроме того, способен антагонизировать передачу сигнала через TNFR2.

Термин «полный блокатор» определяется в данном документе как молекула антитела, которая снижает связывание TNF-α с TNFR2 на более чем 98%, то есть до 100%, по сравнению со связыванием TNF-α в присутствии только молекулы антитела изотипического контроля. Антитело изотипического контроля представляет собой антитело по отношению к белку или другой структуре, которое не присутствует ни в одной форме при анализе по данному исследованию. Изотипический контроль в идеале имеет аналогичное строение или по меньшей мере Fc-участок, аналогичный участвующим в сравнении антителам. Это хорошо известно специалисту в данной области техники. В примерах, описываемых в данном документе, изотипический контроль имел аналогичное строение, аналогичный Fc-участок и был специфичен для флуоресцеинизотиоцианата (FITC). В некоторых вариантах осуществления изобретения полный блокатор снижает связывание TNF-α на более чем 99,5%.

Другие типы блокаторов представляют собой частичные блокаторы и слабые блокаторы. В контексте данного документа частичный блокатор представляет собой молекулу антитела, которая снижает связывание TNF-α с TNFR2 на 60-98% (например, на 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% или 98% с учетом всех десятичных дробей между ними) по

сравнению со связыванием TNF- $\alpha$  только в присутствии молекулы антитела изотипического контроля, а слабый блокатор представляет собой молекулу антитела, которая снижает связывание TNF- $\alpha$  с TNFR2 менее чем на 60%, например, на 50-59,9% (или на 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% или 59,9% с учетом всех десятичных дробей между ними), по сравнению со связыванием TNF- $\alpha$  в присутствии только молекулы антитела изотипического контроля.

Напротив, молекула неблокирующего антитела TNFR2 представляет собой молекулу антитела, которая снижает уровень связывания TNF- $\alpha$  с TNFR2 на менее чем 50% по сравнению со связыванием TNF- $\alpha$  в присутствии только молекулы антитела изотипического контроля. В некоторых вариантах осуществления изобретения это определяется в высокодозном однократном ELISA или ELISA с титрованием дозы, как показано в Примере 3 и на фиг. 6, 7.

Частично блокирующие, слабые блокирующие и неблокирующие антитела используются в примерах для сравнения с молекулами антагонистических блокирующих антител по данному изобретению.

Некоторые свойства и особенности могут лежать в основе и (совместно) определять биологическую активность антител. Помимо способности блокировать связывание лиганда с рецептором к таким важным свойствам относится способность антитела модулировать передачу сигнала через рецептор, то есть агонизировать или антагонизировать передачу сигналов через рецептор, и зависимость антитела от взаимодействий с Fc $\gamma$ R для получения терапевтической активности.

Вначале была охарактеризована способность антител полного блокирования, частичного блокирования и неблокирования модулировать передачу сигналов TNFR2. Были выявлены два крайних случая.

В первом случае были идентифицированы антитела, которые полностью блокировали связывание лиганда с TNFR2, блокирующие индуцированную TNF- $\alpha$  передачу сигналов через TNFR2, и которые сами не индуцировали передачу сигналов при связывании с клеткой, эндогенно экспрессирующей TNFR2. Эта группа лиганд-блокирующих антагонистических антител составляет основу данного изобретения.

В другом случае были идентифицированы антитела, не блокирующие связывание лиганда с TNFR2, но которые при связывании с клетками, эндогенно экспрессирующими TNFR2, агонизировали рецептор. Эта вторая группа антител составляет отдельное изобретение и включена в данный документ для сравнения.

Антитела и их разновидности, обозначаемые как частично блокирующие агонистические, частично блокирующие неагонистические и полностью блокирующему неантагонистические, были дополнительно идентифицированы, демонстрируя сложную биологию и значительную гетерогенность анти-TNFR2 антител и наглядно показывая, что антитела по данному изобретению образуют уникальную группу.

Для определения того, обладает ли антитело агонистической или антагонистической активностью, можно применять анализ клеток натуральных киллеров (NK), как описывается в Примере 4. Вкратце показано, что NK-клетки отвечают на стимулы IL-2 и IL-12 секретацией IFN- $\gamma$ . Растворимый TNF- $\alpha$  продуцируется эндогенно и присутствует в устойчивых, но субоптимальных концентрациях (~20-100 пг/мл) для передачи сигналов через TNFR2, что указывает на возможность как увеличения, так и уменьшения IFN- $\gamma$  посредством модуляции передачи сигналов через TNFR2. Следовательно, экзогенное добавление TNF- $\alpha$  в оптимальной концентрации при передаче сигнала через TNFR2 увеличивает концентрации IFN- $\gamma$  в этом анализе, также как и инкубация с агонистическим анти-TNFR2 антителом (фиг. 8 C). Напротив, совместная инкубация с анти-TNF- $\alpha$



антителом или описываемыми в данном документе антагонистическими антителами, блокирующими лиганд, снижает высвобождение IFN- $\gamma$  в этом анализе. В результате этот анализ можно применять для идентификации агонистической или антагонистической активности или отсутствия таковой у анти-TNFR2 антител. (TNF $\alpha$  Augments Cytokine-Induced NK Cell IFN $\gamma$  Production through TNFR2. Almishri W. et al. J Innate Immun. 2016; 8: 617-629) Следовательно, в этой экспериментальной установке антагонистическое антитело предотвращает индуцированную TNF- $\alpha$  передачу сигналов в клетках, экспрессирующих TNFR2, при этом само не стимулирует рецептор TNFR2 при связывании с ним. В частности, антагонистические антитела в этом анализе не увеличивают высвобождение IFN- $\gamma$  при связывании с вышеупомянутыми NK-клетками, а вместо этого ингибируют высвобождение IFN- $\gamma$ . Как показано на фиг. 8, полностью блокирующие антитела, описываемые в данном изобретении, не индуцируют передачу сигнала через TNFR2, а вместо этого снижают передачу сигнала через TNFR2 в этом анализе содержащих TNF- $\alpha$  NK-клеток, что приводит к снижению количества высвобождаемого IFN- $\gamma$ . Как показано на фиг. 8 в Примере 4, антитела по данному изобретению могут быть охарактеризованы как лиганд-блокирующие антагонистические анти-TNFR2 антитела. С применением этого анализа антагонистическое антитело определяется как антитело, приводящее к снижению на более чем 30% (например, на 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%) высвобождения IFN- $\gamma$  при условии, что базальный уровень TNF- $\alpha$  в культуре составляет по меньшей мере 20 пг/мл. Поскольку в этом анализе используются первичные клетки от доноров мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) необходимо включать по меньшей мере 4 доноров и для всех доноров рассчитывать средние значения. Клетки от каждого донора, которые должны быть включены в расчет среднего, должны отвечать на обработку положительным контролем (растворимый TNF- $\alpha$ ) с более чем 100% (более чем 2-кратным) повышением уровней IFN- $\gamma$  по сравнению с обработкой изотипическим контролем.

Антагонистическая активность также может быть продемонстрирована с применением IL-2 опосредованной активации Т-клеток памяти. Активация в этом случае измеряется по положительной регуляции маркера активации Т-клеток CD25. С применением такого анализа добавление неблокирующих агонистических антител TNFR2 повышает уровень экспрессии CD25, тогда как блокирующие антагонистические антитела TNFR2 согласно изобретению приводят к более низкой экспрессии CD25 по сравнению с изотипическим контролем. Это справедливо для антител человека по изобретению, а также для суррогатных мышинных антител и показано в примере 4.

Помимо связывания с TNFR2 и, благодаря ему, блокирования связывания TNF- $\alpha$  и передачи сигналов молекулы антител согласно изобретению также связываются с Fc $\gamma$ -рецепторами. Безусловная зависимость терапевтической эффективности от взаимодействий между Fc $\gamma$ R и анти-TNFR2 антителами, принадлежащими к TNF- $\alpha$ -блокирующей антагонистической группе антител по данному изобретению, была продемонстрирована на экспериментальных моделях рака у мышей с применением вариантов антител, которые продуктивно или непродуктивно задействуют связывание Fc $\gamma$ R. Безусловная зависимость максимальной *in vivo* терапевтической активности для таких лиганд-блокирующих антагонистических антител и их предпочтительное связывание/задействование активирующих, а не ингибирующих Fc $\gamma$ R, показаны в Примере 5. Данные, демонстрирующие *in vivo* Fc $\gamma$ R-независимую активность неблокирующих анти-TNFR2 антител-агонистов, и их отличительное предпочтительное задействование ингибирующих, а не активирующих, Fc $\gamma$ R для получения максимальной

терапевтической активности, включены в этот пример только для сравнения и противопоставления. Взятые в совокупности данные демонстрируют, что могут быть получены несколько типов анти-TNFR2 антител. Кроме того, данные демонстрируют, что нетривиально и невозможно предсказать, какие варианты антител будут

5 терапевтически наиболее эффективными, будут ли они основываться на блокирующих, агонистических или антагонистических (внешних или внутренних) свойствах, и будут ли они зависеть от задействования Fc $\gamma$ R, или будут ли они наиболее эффективны в форматах антител, связанных с предпочтительным/сильным связыванием с активирующими или ингибирующими Fc-гамма-рецепторами.

10 Относительно высокая гомология между системами Fc $\gamma$ R мыши и человека объясняет многие общие аспекты консервативных Fc $\gamma$ R-опосредованных механизмов между видами. Однако подклассы IgG мыши и человека различаются по аффинности к своим распознаваемым Fc $\gamma$ R, что становится важным при переносе Fc $\gamma$ R-опосредованных наблюдений в мышечной системе в терапевтические средства на основе IgG человека

15 для выбора антитела, подкласса антител и/или сконструированного варианта подкласса, которые демонстрируют более целесообразное связывание с активирующими по сравнению с ингибирующими Fc $\gamma$ R человека. Аффинность и/или avidность молекул антител человека к индивидуальным рецепторам Fc $\gamma$ R человека можно определить с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В некоторых вариантах

20 осуществления изобретения молекула блокирующего TNFR2 антитела связывается с более высокой аффинностью с активирующими Fc $\gamma$ -рецепторами, чем с ингибирующими Fc $\gamma$ -рецепторами. Выражение «с более высокой аффинностью к активирующим Fc $\gamma$ -рецепторам, чем к ингибирующим Fc $\gamma$ -рецепторам» указывает на варианты, которые связываются с более высокой аффинностью с активирующими Fc $\gamma$ -рецепторами,

25 например, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIA и/или Fc $\gamma$ RI, по сравнению с ингибирующими Fc $\gamma$ -рецепторами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула антитела представляет собой IgG, который может связываться с Fc $\gamma$ -рецепторами посредством нормального взаимодействия между Fc-участком молекулы антитела и Fc $\gamma$ -рецептором.

30 В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула блокирующего TNFR2 антагонистического антитела представляет собой IgG1 человека. Хорошо известно, что IgG1 человека связывается с высокой аффинностью с активирующим Fc $\gamma$ RI человека, и с более низкой и аналогичной аффинностью с активирующими Fc $\gamma$ -рецепторами человека Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIA и с ингибирующим Fc $\gamma$ RIIB человека. Это было

35 продемонстрировано, например, с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула антагонистического блокирующего TNFR2 антитела представляет собой молекулу антитела IgG, демонстрирующую улучшенное связывание с одним или несколькими активирующими

40 Fc-рецепторами, и/или сконструированную для улучшенного связывания с одним или несколькими активирующими Fc $\gamma$ -рецепторами, и/или сконструированную для улучшенного относительного связывания с активирующими рецепторами по сравнению с ингибирующими Fc $\gamma$ -рецепторами. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-TNFR2 антитело представляет собой Fc-сконструированное антитело IgG1 человека.

45 Примеры таких сконструированных вариантов антител включают афукозилированные антитела с селективным улучшенным связыванием антител с Fc $\gamma$ RIIA и антитела, сконструированные путем направленной, мутационной или иной замены аминокислот, приводящей к улучшенному связыванию с одним или несколькими активирующими

Fcγ-рецепторами по сравнению с ингибирующим FcγRIIB. (Richards et al. 2008. 'Optimization of antibody binding to FcγRIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells', Mol Cancer Ther, 7: 2517-27; Lazar et al. 2006. 'Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function', Proc Natl Acad Sci U S A, 103: 4005-10)

5 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело IgG человека, сконструированное для улучшенного связывания с активирующими Fc-гамма-рецепторами, может представлять собой антитело IgG человека, несущее две мутации S239D и I332E или три мутации S239D, I332E и A330L, и/или мутации G236A на своем Fc-участке. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело IgG человека,  
10 сконструированное для улучшенного связывания с активирующими Fc-гамма-рецепторами, может представлять собой афукозилированное антитело IgG человека.

Указанный Fcγ-рецептор, с которым связывается указанный Fc-участок указанных молекул антагонистического блокирующего антитела по данному изобретению, может представлять собой Fcγ-рецептор, экспрессируемый иммунной эффекторной клеткой,  
15 как описывается выше.

Связывание молекулы TNFR2-специфического антитела с поверхностными рецепторами TNFR2 на клетке-мишени и одновременное задействование FcγR той же клеткой или иммунной эффекторной клеткой, находящейся в непосредственной близости, может приводить к истощению или функциональной модуляции TNFR2-положительных  
20 клеток-мишеней, с которыми связывается молекула антитела. В контексте данного документа выражение «истощение клетки» означает истощение, делецию или элиминацию указанной клетки посредством физического выведения клеток.

Истощение клеток может быть достигнуто посредством ADCC, то есть антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности или антителозависимой  
25 клеточной цитотоксичности, и/или ADCP, то есть антителозависимого клеточного фагоцитоза. Это означает, что при введении описываемой в данном документе молекулы антитела пациенту, например, человеку, она специфически связывается с TNFR2, экспрессируемым на поверхности клеток, таких как Treg, и такое связывание приводит к истощению клеток. В общем случае клетки с высокой экспрессией удаляются более  
30 эффективно по сравнению с клетками с низкой экспрессией. Как показано в Примере 5, фиг. 14, Treg-клетки являются экспрессирующими в наивысшей степени клетками в условиях опухоли.

ADCC представляет собой иммунный механизм, с помощью которого эффекторные клетки, несущие Fc-рецептор, могут распознавать и уничтожать, то есть истощать,  
35 покрытые антителами клетки-мишени, экспрессирующие на своей поверхности антигены опухолевого происхождения, то есть в данном случае TNFR2. ADCP представляет собой аналогичный механизм, хотя он приводит к уничтожению, то есть истощению, клеток-мишеней посредством фагоцитоза, а не цитотоксичности.

Кроме того, улучшенное связывание Fc-участка молекул антитела с Fcγ-рецептором  
40 также может увеличивать истощение клеток-мишеней за счет зависимой от Fc-рецептора гибели посредством ADCC или ADCP. Это особенно актуально для молекул антител с улучшенным связыванием с активирующими Fcγ-рецепторами.

То, что молекулы антител оказывают истощающее действие на TNFR2-положительные клетки, означает, что при введении пациенту, например, человеку, такая молекула  
45 антитела специфически связывается с TNFR2, экспрессируемым на поверхности TNFR2-положительных клеток, и такое связывание приводит к истощению указанных клеток-мишеней.

Истощенные клетки могут представлять собой несколько различных клеток, как

объясняется выше при рассмотрении характеристик клетки-мишени. Как правило, истощаются клетки с наивысшей экспрессией TNFR2. Другие клетки, которые также экспрессируют TNFR2, но не настолько сильно, также могут истощаться, но в меньшей степени по сравнению с клетками, имеющими наивысшую экспрессию TNFR2.

Как упоминается выше, TNFR2 высоко экспрессируется на Treg-клетках, обнаруженных в опухолях у различных онкологических пациентов, и у таких пациентов молекула антитела по изобретению будет предпочтительно связываться с Treg-клетками и в результате приводить к истощению Treg-клеток. Treg-клетки оказывают ингибирующее действие на пролиферацию, активацию и цитотоксическую способность

других иммунных клеток, таких как CD8-положительные ( $CD8^+$ ) клетки, и поэтому истощение Treg-клеток по меньшей мере косвенно приведет к усилению пролиферации, активации и, возможно, миграции  $CD8^+$  клеток, а, следовательно, к увеличению количества внутриопухолевых клеток  $CD8^+$ .  $CD8^+$  Т-клетки необходимы для иммуноопосредованного выведения опухолевых клеток (McKinney et al. Curr Opin Immunol. 2016 Dec;43: 74-80; Klebanoff et al. Immunol Rev. 2006 Jun;211:214-24; Alexander-Miller. Immunol Res. 2005;31(1):13-24). Вследствие этого увеличение пролиферации, активации и цитотоксической способности  $CD8^+$  Т-клеток будет приносить значительную пользу больному раком пациенту и может приводить к эрадикации заболевания.

Увеличение пролиферации, активации и цитотоксической способности  $CD8^+$  Т-клеток также будет приносить значительную пользу при лечении инфекции, вызванной внутриклеточным патогеном. Антигены внутриклеточных патогенов, как правило, присутствуют на молекулах МНС I, которые играют важную роль в активации  $CD8^+$  Т-клеток. В результате  $CD8^+$  Т-клетки распознают инфицированные клетки и лизируют их, тем самым уничтожая патоген.

Связывание TNFR2-специфической молекулы антитела и блокирование передачи сигналов TNF- $\alpha$  также может приводить к функциональной модуляции клеточных фенотипов, например, к модуляции проопухолевой миелоидной клетки в миелоидную клетку с противоопухолевыми свойствами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения TNFR2-положительные клетки, то есть клетки-мишени, представляют собой  $CD4$ -положительные ( $CD4^+$ ) клетки, то есть клетки, экспрессирующие  $CD4$ .

В некоторых вариантах осуществления изобретения TNFR2-положительные клетки являются как  $CD4^+$ , так и  $FOXP3^+$ , то есть экспрессируют как  $CD4$ , так и  $FOXP3$ . Данные клетки являются Treg-клетками.  $CD8^+$  Т-клетки также экспрессируют TNFR2, но Treg-клетки экспрессируют значительно более высокие уровни TNFR2, чем  $CD8$ -положительные Т-клетки, как показано на фиг. 14 в Примере 5. Это делает Treg-клетки более восприимчивыми к истощению по сравнению с клетками  $CD8^+$  с низкой экспрессией.

В некоторых ситуациях TNFR2 предпочтительно экспрессируется на иммунных клетках в микроокружении опухоли (клетках, инфильтрирующих опухоль (TILS)).

В некоторых вариантах осуществления изобретения Treg-клетки будут представлять собой клетки в микроокружении опухоли, имеющие наивысшую экспрессию TNFR2, в результате чего молекулы антител, которые специфически связываются с TNFR2 (или молекулы анти-TNFR2 антител), обладают эффектом истощения Treg-клеток. Это подробно рассматривается ниже, например, в Примере 5 и для фиг. 13 и 15.

В некоторых вариантах осуществления изобретения TNFR2-положительные клетки будут представлять собой Treg-клетки в солидной опухоли. Такие Treg-клетки будут иметь очень высокую экспрессию TNFR2, и поэтому введение молекул антител, которые специфически связываются с TNFR2, предпочтительно приведет к истощению таких Treg-клеток.

Для определения того, является ли молекула антитела такой молекулой антитела, которая оказывает повышенное истощающее действие на TNFR2-положительные клетки, как указано в данном документе, можно применять тест *in vivo* в модели PBMC-NOG/SCID. Этот тест *in vivo* основан на комбинированном применении мышей PBMC и мышей NOG/SCID, которое в данном документе называется моделью PBMC-NOG/SCID. И мыши NOG, и мыши SCID известны специалисту в данной области техники (Ito M et al, (2002) NOD/SCID/ $\gamma^{\text{null}}$  mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. Blood 100(9):3175-3182; Bosma GC et al; Nature. 1983 Feb 10; 301(5900):527-30; A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse), а также известна модель PBMC-NOG (Cox et al. "Antibody-mediated targeting of the Orai1 calcium channel inhibits T cell function". PLoS One. 2013 Dec 23; 8(12):e82944.; and Søndergaard et al. "Human T cells depend on functional calcineurin, tumor necrosis factor- $\alpha$  and CD80/CD86 for expansion and activation in mice." Clin Exp Immunol. 2013 May;172(2):300-10.) Указанный тест *in vivo* на модели PBMC-NOG/SCID включает следующие девять последовательных этапов:

1) PBMC человека (мононуклеарные клетки периферической крови) выделяют, промывают и ресуспендируют в стерильном фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). В некоторых вариантах осуществления изобретения PBMC ресуспендируют в PBS в концентрации  $75 \times 10^6$  клеток/мл.

2) Мышам NOG вводят в/в (внутривенно) надлежащее количество, например, 200 мкл, клеточной суспензии из этапа 1. При введении 200 мкл это соответствует  $15 \times 10^6$  клеток/мышь.

3) В приемлемое время, например, через 2 недели после инъекции, селезенки мышей NOG выделяют и превращают в суспензию отдельных клеток. Необязательно, чтобы подтвердить экспрессию TNFR2, небольшой образец из суспензии отдельных клеток берут для определения экспрессии TNFR2 на Т-клетках человека с помощью метода FACS.

4) Клеточную суспензию из этапа 3 ресуспендируют в стерильном PBS. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клеточную суспензию ресуспендируют в стерильном PBS в концентрации  $50 \times 10^6$  клеток/мл. Если необязательное определение экспрессии TNFR2 включено в этап 3, оставшуюся часть клеточной суспензии затем ресуспендируют на этапе 4.

5) Мышам SCID вводят в/б (внутрибрюшинно) надлежащее количество, например, 200 мкл, суспензии из этапа 4. При введении 200 мкл это соответствует  $10 \times 10^6$  клеток/мышь.

6) В приемлемое время, например, через 1 час после инъекции на этапе 5, мышам SCID вводят надлежащее количество, например, 10 мг/кг, либо тестируемой молекулы антитела, либо антитела положительного контроля (например, анти-CD25 антитела, которое, как известно, истощает Treg-клетки), либо моноклонального антитела изотипического контроля.

7) Внутрибрюшинную жидкость обработанных мышей SCID собирают в приемлемое время, например, через 24 часа после обработки на этапе 6.

8) С помощью метода FACS выполняют идентификацию субпопуляций Т-клеток

человека и их количественную оценку с применением следующих маркеров: CD45, CD4, CD8, CD25 и/или CD127. Точно установлено, что Treg-клетки человека в популяции PBMC характеризуются фенотипом CD4+CD25+CD127<sup>low/-</sup>.

9) Результаты идентификации и количественной оценки субпопуляций Т-клеток мышей, получавших тестируемую молекулу антитела, сравнивают с результатами идентификации и количественной оценки субпопуляций Т-клеток мышей, получавших антитело положительного контроля, и с результатами идентификации и количественной оценки субпопуляций Т-клеток мышей, получавших моноклональное антитело изотипического контроля. Меньшее количество Treg-клеток во внутрибрюшинной жидкости мышей, получавших исследуемую молекулу антитела, по сравнению с количеством Treg-клеток во внутрибрюшинной жидкости мышей, получавших изотипический контроль, демонстрирует, что молекула антитела обладает истощающим действием на TNFR2- положительные Treg-клетки.

Этот анализ подробно продемонстрирован ниже в Примере 5 с использованием фиг. 15.

Как упоминалось выше, другие клетки, например, раковые клетки, также могут экспрессировать TNFR2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула антитела связывается преимущественно с TNFR2, экспрессируемым на раковых клетках, и связывание затем приводит непосредственно к истощению раковых клеток.

Антитела хорошо известны специалистам в области иммунологии и молекулярной биологии. Как правило, антитело состоит из двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей. В данном документе иногда такая полная молекула антитела называется полноразмерным антителом или антителом полной длины. Указанная тяжелая цепь антитела содержит один вариабельный домен (VH) и три константных домена (CH1, CH2 и CH3), а указанная легкая цепь молекулы антитела содержит один вариабельный домен (VL) и один константный домен (CL). Указанные вариабельные домены (иногда совместно именуемые как F<sub>V</sub>-участки) связываются с мишенью антитела или антигеном.

Каждый вариабельный домен состоит из трех петель, называемых определяющими комплементарность участками (CDR), которые отвечают за связывание с мишенью. Указанные константные домены не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но демонстрируют различные эффекторные функции. Антитела или иммуноглобулины могут быть отнесены к различным классам в зависимости от аминокислотной последовательности константного участка их тяжелых цепей.

Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а у человека некоторые из этих иммуноглобулинов дополнительно делятся на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4; IgA1 и IgA2.

Другой частью антитела является Fc-участок (также известный как кристаллизующийся фрагмент домена), который состоит из двух константных доменов каждой из тяжелых цепей антитела. Как ранее упоминалось выше, Fc-участок отвечает за взаимодействие между антителом и Fc-рецептором.

В контексте данного документа термин «молекула антитела» относится к полноразмерным антителам или антителам полной длины, а также функциональным фрагментам полноразмерных антител и производным молекул таких антител.

Функциональные фрагменты полноразмерного антитела имеют характеристики связывания антигена, аналогичные соответствующему полноразмерному антителу, и содержат либо аналогичные вариабельные домены (то есть последовательности VH и VL), и/или последовательности CDR, аналогичные соответствующему полноразмерному антителу. Функциональный фрагмент не всегда содержит все шесть CDR

соответствующего полноразмерного антитела. Считается, что молекулы, содержащие три или менее участков CDR (в некоторых случаях даже только один участок CDR или его часть), способны сохранять антигенсвязывающую активность антитела, производными которого являются CDR. Например, в работе Gao et al., 1994, J. Biol. Chem., 269: 32389-93 говорится, что вся цепь VL (включая все три участка CDR) имеет высокую аффинность к своему субстрату.

Молекулы, содержащие два участка CDR, описаны, например, в работе «Vaughan & Sollazzo 2001, Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 4: 417-430» на странице 418 (правая колонка, раздел «3 Our Strategy for Design») описано миниантитело, включающее только гипервариабельные H1 и H2 участки CDR, перемежающиеся внутри каркасных участков. Было показано, что такое миниантитело способно связываться с мишенью. Vaughan и Sollazzo ссылаются на работу «Pessi et al., 1993, Nature, 362: 367-9, и Bianchi et al., 1994, J. Mol. Biol., 236: 649-59» и подробно описывают миниантитело из H1 и H2 и их свойства. В работе «Qiu et al., 2007, Nature Biotechnology, 25:921-9» показано, что молекула, состоящая из двух связанных участков CDR, способна связывать антиген. В работе «Quioco 1993, Nature, 362: 293-4» дается краткое описание технологии «миниантитела». В работе «Ladner 2007, Nature Biotechnology, 25:875-7» отмечается, что молекулы, содержащие два участка CDR, способны сохранять антигенсвязывающую активность.

Молекулы антител, содержащие один участок CDR, описаны, например, в работе «Laune et al., 1997, JBC, 272: 30937-44», в которой показано, что ряд гексапептидов, полученных из участка CDR, демонстрируют антигенсвязывающую активность, и отмечается, что синтетические пептиды полного единичного участка CDR демонстрируют сильную связывающую активность. В работе «Monnet et al., 1999, JBC, 274: 3789-96» показано, что ряд 12-мерных пептидов и связанных с ними каркасных участков обладают антигенсвязывающей активностью и отмечается, что только один CDR3-подобный пептид способен связывать антиген. В работе «Heap et al., 2005, J. Gen. Virol., 86: 1791-1800» сообщается, что «микроантитело» (молекула, содержащая один участок CDR) способно связывать антиген и показано, что циклический пептид анти-ВИЧ антитела обладает антигенсвязывающей активностью и функцией. В работе «Nicaise et al., 2004, Protein Science, 13: 1882-91» показано, что один участок CDR может придавать антигенсвязывающую активность и аффинность к своему лизоцимному антигену.

Отсюда следует, что молекулы антител, содержащие пять, четыре, три или менее участков CDR, способны сохранять антигенсвязывающие свойства полноразмерных антител, производными которых они являются.

Такая молекула антитела может также быть производной полноразмерного антитела или фрагментом такого антитела при условии, что такое производное или фрагмент сохраняют способность связываться с Fcγ-рецептором. В случае применения производного оно должно обладать теми же антигенсвязывающими характеристиками, что и соответствующее полноразмерное антитело, в том смысле, что оно связывается с тем же эпитопом на мишени, что и полноразмерное антитело.

Вследствие этого в контексте данного документа под термином «молекула антитела» понимаются все типы молекул антител и их функциональные фрагменты, а также их производные, включая: моноклональные антитела, поликлональные антитела, синтетические антитела, рекомбинантно-полученные антитела, мультиспецифичные антитела, биспецифичные антитела, человеческие антитела, антитела человеческого происхождения, гуманизированные антитела, химерные антитела, одноцепочечные

антитела, тяжелые цепи антител, гомодимеры тяжелых цепей антител, гетеродимеры тяжелых цепей антител, и гетеродимеры легких цепей антител.

Кроме того, в контексте данного документа термин «молекула антитела», охватывает все классы молекул антител и функциональных фрагментов, включая: IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgD и IgE, если не указано иное.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула антитела представляет собой молекулу антитела человека, молекулу гуманизированного антитела или молекулу антитела человеческого происхождения. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения, молекула антитела представляет собой антитело IgG. Поэтому в некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула антитела имеет изотип, который оптимальным образом задействует активирующие Fc-рецепторы. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула антитела представляет собой антитело IgG1.

Специалисту в данной области понятно, что мышинный IgG2a и человеческий IgG1 задействуют активирующие Fc $\gamma$ -рецепторы и оба способны активировать делецию клеток-мишеней посредством активации иммунных клеток, несущих активирующие Fc $\gamma$ -рецепторы, с помощью, например, механизмов ADCP и ADCC. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-TNFR2 антитело представляет собой мышинное или гуманизированное мышинное антитело IgG2a.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула антитела, которая специфично связывает TNFR2, представляет собой молекулу антитела IgG2 человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-TNFR2 антитело представляет собой мышинное антитело, которое является перекрестно специфичным к TNFR2 человека.

Как подчеркивается выше, данное изобретение относится к различным типам и формам молекул антител, которые известны специалисту в области иммунологии. Известно, что антитела, применяющиеся в терапевтических целях, часто модифицируют дополнительными компонентами, которые изменяют свойства молекулы антитела.

Поэтому предполагается, что молекула антитела по данному описанию или молекула антитела, применяемая по данному описанию (например, молекула моноклонального антитела и/или молекула поликлонального антитела, и/или молекула биспецифичного антитела) содержит определяемый фрагмент и/или цитотоксический фрагмент.

Термин «определяемый фрагмент» означает одно или несколько из группы, состоящей из: фермента; радиоактивного атома; флуоресцентного фрагмента; хемилюминесцентного фрагмента; биолюминесцентного фрагмента. Определяемый фрагмент молекулы позволяет визуализировать молекулу антитела *in vitro* и/или *in vivo*, и/или *ex vivo*.

Термин «цитотоксический фрагмент» означает радиоактивный фрагмент и/или фермент, при этом, например, указанный фермент является каспазой; и/или токсин, причем, например, указанный токсин является бактериальным токсином или ядом; при этом указанный цитотоксический фрагмент способен индуцировать клеточный лизис.

Также предполагается, что молекула антитела может находиться в выделенной форме и/или очищенной форме, и/или может быть пегилирована. Пегилирование представляет собой метод, с помощью которого полимеры полиэтиленгликоля добавляются к молекуле, например, к молекуле антитела или ее производной, с целью изменить ее характеристики, например, продлить время полувыведения путем увеличения ее гидродинамического размера, предотвращая ренальный клиренс.

Как рассматривалось выше, участки CDR антитела связываются с мишенью антитела. Назначение аминокислот каждому участку CDR, описываемому в данном документе,



соответствует определениям из работы «Kabat EA et al. 1991, In "Sequences of Proteins of Immunological Interest" Fifth Edition, NIH Publication No. 91-3242, pp xv- xvii».

Как может быть известно специалисту в данной области техники, существуют и другие способы назначения аминокислот каждому участку CDR. Например,  
 5 Международная информационная система иммуногенетики (IMGT(R), ImMunoGeneTics) (<http://www.imgt.org/> и Lefranc и Lefranc "The Immunoglobulin FactsBook" опубликованные издательством Academic Press, 2001).

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула антитела, которая специфично связывает TNFR2, представляет собой человеческое антитело.

10 В некоторых вариантах реализации изобретения молекула антитела, которая специфично связывает TNFR2, представляет собой антитело человеческого происхождения, то есть изначально человеческое антитело, которое было модифицировано, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула антитела, которая  
 15 специфично связывает TNFR2, представляет собой гуманизированное антитело, то есть изначально не человеческое антитело, которое было модифицировано для увеличения его подобия с человеческим антителом. Гуманизированные антитела могут представлять собой, например, мышинные антитела или антитела ламы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-TNFR2 антитело  
 20 представляет собой моноклональное антитело.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-TNFR2 антитело представляет собой поликлональное антитело.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула антитела, которая специфически связывает TNFR2, содержит одну из последовательностей VH-CDR1,  
 25 перечисленных в таблице 1 ниже.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула антитела, которая специфически связывает TNFR2, содержит одну из последовательностей VH-CDR2, перечисленных ниже в таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула антитела, которая  
 30 специфически связывает TNFR2, содержит одну из последовательностей VH-CDR3, перечисленных ниже в таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула антитела, которая специфически связывает TNFR2, содержит одну из последовательностей VL-CDR1, перечисленных ниже в таблице 1.

35 В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула антитела, которая специфически связывает TNFR2, содержит одну из последовательностей VL-CDR2, перечисленных ниже в таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула антитела, которая специфически связывает TNFR2, содержит одну из последовательностей VL-CDR3,  
 40 перечисленных ниже в таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула анти-TNFR2 антитела представляет собой молекулу антитела, содержащую 6 CDR, содержащих последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6; или молекулу антитела, содержащую 6 CDR, содержащих SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13 и 14; или молекулу антитела, содержащую  
 45 6 CDR, содержащих SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 и 22.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула анти-TNFR2 антитела представляет собой молекулу антитела, содержащую 6 CDR, содержащих последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула анти-TNFR2 антитела представляет собой молекулу антитела, выбранную из группы, состоящей из молекул антитела, содержащих VH, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 7, 15 и 23.

5 В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула анти-TNFR2 антитела представляет собой молекулу антитела, выбранную из группы, состоящей из молекул антитела, содержащих VL, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 8, 16 и 24.

10 В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула анти-TNFR2 антитела представляет собой молекулу антитела, содержащую VH с SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула анти-TNFR2 антитела представляет собой молекулу антитела, содержащую VL с SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула анти-TNFR2 антитела содержит VH, содержащую SEQ ID NO: 7 и VH, содержащую SEQ ID NO: 8.

15 В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула анти-TNFR2 антитела содержит CH, содержащую SEQ ID NO: 217.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула анти-TNFR2 антитела содержит CL, содержащую SEQ ID NO: 218.

20 В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула анти-TNFR2 антитела содержит VH, содержащую SEQ ID NO: 7, VH, содержащую SEQ ID NO: 8, CH, содержащую SEQ ID NO: 217 и CL, содержащую SEQ ID NO: 218.

Таблица 1. Отдельные последовательности молекул антагонистических TNFR2-блокирующих антител согласно изобретению (в последовательностях VH и VL последовательности CDR выделены жирным шрифтом)

25

30

35

40

45

Клон антитела	Участок	Последовательность	SEQ ID NO:
001-H10	VH-CDR1	FDDYGMSWVRQAPG	1
	VH-CDR2	SVIYSGGSTYYADSVKGR	2
	VH-CDR3	CARDRSSSWYRDGMDV	3
	VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYDVH	4
	VL-CDR2	GNSNRPS	5
	VL-CDR3	CAAWDDSLSGWV	6
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT <b>FDDYGMSWVR QAPGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGR</b> FRTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYC <b>CARDRSSSWYRDGMDVWG</b> QGTLTVSS	7
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVH <b>WHYQ</b> QLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCAAWDDSLSGWVF <b>GGG</b> TKLTVLG	8
004-H02	VH-CDR1	FDDYGMSWVRQAPG	9
	VH-CDR2	STIYSGDNAYYGASVRGR	10
	VH-CDR3	ARVYSSSWRKRAFDI	11
	VL-CDR1	CSGTSSNIESNTVN	12
	VL-CDR2	SDNQRP	13
	VL-CDR3	CAAWDDSLSGWV	14
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT <b>FDDYGMSWVR QAPGKGLEWVSTIYSGDNAYYGASVRGR</b> FRTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYC <b>ARVYSSSWRKRAFDI</b> WGQ GTLTVSS	15
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGTSSNIESNTVN <b>WYQQL</b> PGTAPKLLIYSDNQRP <b>SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS</b> EDEADYYCAAWDDSLSGWVF <b>GGG</b> TKLTVLG	16
005-B08	VH-CDR1	FSDYYMSWIRQAPG	17
	VH-CDR2	AIISYDGGGKYFADPVKGR	18
	VH-CDR3	ARYYGDGGFDP	19
	VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYVVH	20
	VL-CDR2	SNNQRP	21
	VL-CDR3	CAAWDDSLNGPV	22
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT <b>FSDYYMSWIRQ APGKGLEWVAIISYDGGGKYFADPVKGR</b> FRTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYC <b>ARYYGDGGFDPWGQ</b> TLV TVSS	23
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYVVH <b>WHYQ</b> QLPGTAPKLLIYSNNQRP <b>SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL</b> RSEDEADYYCAAWDDSLNGPV <b>F</b> GGGTKLTVLG	24

Таблица 2. Отдельные последовательности молекул TNFR2-блокирующих антител, которые не являются антагонистами и которые используются в данном документе для сравнения (в последовательностях VH и VL последовательности CDR выделены жирным шрифтом)

005-B02	VH-CDR1	FSDYYMSWIRQAPG	25
	VH-CDR2	ALIWYDGGNEYADSVKGR	26
	VH-CDR3	VRETGNYGMDV	27
	VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYDVH	28
	VL-CDR2	RNNQRPS	29
	VL-CDR3	CATWDDRNVGPV	30
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQ APGKGLEWVALIWYDGGNEYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRETGNYGMDVWGQGT LTVSS	31
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVH HWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCATWDDRNVGPVFGGGTKLTVLG	32
001-E06	VH-CDR1	FSSNYMSWVRQAPG	33
	VH-CDR2	ALIWYDGSNKYYADSVKGR	34
	VH-CDR3	AKDPLFDS	35
	VL-CDR1	CTGRSSNIGAGYDVH	36
	VL-CDR2	DNNKRPS	37
	VL-CDR3	CAAWDDSLNGPV	38
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSNYMSWVRQ APGKGLEWVALIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPLFDSWGQGT LTVSS	39
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGRSSNIGAGYDVH HWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVLG	40
001-G04	VH-CDR1	FNTYSMNWVRQAPG	41
	VH-CDR2	SVLYSDDDDTHYADSVKGR	42
	VH-CDR3	ARDCGGDCHSGDDAFDI	43
	VL-CDR1	CSGSSSNIGSNTVN	44
	VL-CDR2	DNDKRPS	45
	VL-CDR3	CAAWHDSLNGWV	46
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYSMNWVR QAPGKGLEWVSVLYSDDDDTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDCCGGDCHSGDDAFDIW GQGT LTVSS	47
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVN WYQQLPGTAPKLLIYDNDKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCAAWHDSLNGWVVLGGGTKLTVLG	48
001-G10	VH-CDR1	FSAYGMHWVRQAPG	49
	VH-CDR2	AVVSYDGREKHYADSVKGR	50
	VH-CDR3	ARSDGGYDSDSGYY	51
	VL-CDR1	CSGSTSNIGSNFVY	52
	VL-CDR2	DNNKRPS	53
	VL-CDR3	CSSYAYSNDIL	54
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYGMHWVR QAPGKGLEWVAVVSYDGREKHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSDGGYDSDSGYYWG QGT LTVSS	55
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSTSNIGSNFVY WYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCSSYAYSNDILFGGGTKLTVLG	56

5  10	001-C08	VH-CDR1	FSNAWMSWVRQAPG	57
		VH-CDR2	SGISSGSSAYYADSVKGR	58
		VH-CDR3	ARHYYYHIAGYYYDTFDI	59
		VL-CDR1	CSGSSSNIGGNTVN	60
		VL-CDR2	GNTNRPS	61
		VL-CDR3	CAAWDDSLSGVV	62
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVR <b>QAPGKGLEWVSGISSGSSAYYADSVKGRFTISRDN</b> <b>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHYYYHIAGYYYDTFDI</b> <b>WGQGTTLTVSS</b>	63
		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSGSSSNIGGNTVNWYQQL PGTAPKLLIYGNTNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCAAWDDSLSGVVFGGGTKLTVLG	64
15  20	001-H09	VH-CDR1	FSSYAMSWVRQAPG	65
		VH-CDR2	ATISYHGSDKDYADSVKGR	66
		VH-CDR3	ARDANYHSSGYYYDVFDI	67
		VL-CDR1	CSGSSSNIGSNTVN	68
		VL-CDR2	GNSNRPS	69
		VL-CDR3	CAAWDDSLSTWV	70
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ <b>APGKGLEWVATISYHGSDKDYADSVKGRFTISRDN</b> <b>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDANYHSSGYYYDVFDI</b> <b>WGQGTTLTVSS</b>	71
		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSGSSSNIGSNTVNWYQQL PGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCAAWDDSLSTWVFGGGTKLTVLG	72
25  30	005-F10	VH-CDR1	FSDYYMTWIRQAPG	73
		VH-CDR2	SGISGSGGYIHYADSVKGR	74
		VH-CDR3	AREGLLPDAFD	75
		VL-CDR1	CSGSSSNIGNNYVS	76
		VL-CDR2	RNNQRPS	77
		VL-CDR3	CAAWDDSVSGWV	78
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIRQ <b>APGKGLEWVSGISGSGGYIHYADSVKGRFTISRDN</b> <b>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGLLPDAFDIWGQGT</b> <b>LT VSS</b>	79
		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSGSSSNIGNNYVSWYQQL PGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCAAWDDSVSGWVFGGGTKLTVLG	80
35  40	001-B11	VH-CDR1	<b>FSSYSMNWVRQAPG</b>	81
		VH-CDR2	<b>AVMSYDEYNTYYADSVKGR</b>	82
		VH-CDR3	<b>AKGFYGDYPLWDY</b>	83
		VL-CDR1	<b>CSGGNSNIGTNTVD</b>	84
		VL-CDR2	<b>SNNQRPS</b>	85
		VL-CDR3	<b>CAAWDDSVNGPV</b>	86
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQ <b>APGKGLEWVAVMSYDEYNTYYADSVKGRFTISRDN</b> <b>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGFYGDYPLWDYWGQ</b> <b>GTLTVSS</b>	87
		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSGGNSNIGTNTVDWYQQ LPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLR SEDEADYYCAAWDDSVNGPVFGGGTKLTVLG	88
45	001-C07	VH-CDR1	FSSYEMNWVRQAPG	89
		VH-CDR2	STITGGGSYDANSVQGR	90
		VH-CDR3	ARDSTYHSSGYYYDVFDI	91

5		VL-CDR1	CSGSSSNIGSNTVN	92
		VL-CDR2	GNSNRPS	93
		VL-CDR3	CAAWDDSLSGHWV	94
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVR <b>QAPGKGLEWVSTITGGGSIYDANSVQGRFTISRDN</b> <b>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSTYHSSGYYYDVF</b> <b>DIWGQGT</b> LVTVSS	95
		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQL PGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCAAWDDSLSGHWVFGGGTKLTVLG	96
10	001-D01	VH-CDR1	FSSYGMHWVRQAPG	97
		VH-CDR2	SAVFGSGHGNTFYADAVKGR	98
		VH-CDR3	AREQLWFGQDAFDI	99
		VL-CDR1	CSGSSSNIGSNTVN	100
		VL-CDR2	GNSNRPS	101
		VL-CDR3	CQSYDSSLSASV	102
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGPLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR <b>QAPGKGLEWVSAVFGSGHGNTFYADAVKGRFTISR</b> <b>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREQLWFGQDA</b> <b>FDIWGQGT</b> LVTVSS	103
		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQL PGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCQSYDSSLSASVFGGGTKLTVLG	104
15	003-F10	VH-CDR1	FSDAWMTWVRQAPG	105
		VH-CDR2	SDLSDSGGSTYYADSVKGR	106
		VH-CDR3	GRLAAGGPVDY	107
		VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYDVH	108
		VL-CDR2	SNNQRPS	109
		VL-CDR3	CSVWDDSLNSWV	110
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMTWVR <b>QAPGKGLEWVSDLSDSGGSTYYADSVKGRFTISR</b> <b>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGRLAAGGPVDY</b> <b>WGQGT</b> LVTVSS	111
		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQ QLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCSVWDDSLNSWVFGGGTKLTVLG	112

Для определения или демонстрации особенностей молекул антител по данному изобретению их сравнивали с молекулами антител, которые не блокируют связывание лиганда TNF- $\alpha$  с TNFR2. Такие антитела представлены в таблице 3.

Таблица 3. Отдельные последовательности молекул неблокирующих антител TNFR2, упомянутые в данном документе в качестве сравнительных антител (в последовательностях VH и VL последовательности CDR выделены жирным шрифтом)

Клон антитела	Участок	Последовательность	SEQ ID NO:
001-F02	VH-CDR1	FSDYYMSWVRQAPG	113
	VH-CDR2	ANINTDGSEKYLD SVKGR	114
	VH-CDR3	AREEYGAFDI	115
	VL-CDR1	CSGSSSNIGSNTVN	116
	VL-CDR2	DNNKRPS	117
	VL-CDR3	CQSFDRGLSGSIV	118
	VH	EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWVR QAPGKGLEWVANINTDGSEKYLD SVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREEYGAFDIWGQGT LVT VSS	119
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC SGSSSNIGSNTVNWYQQL PGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCQSFDRGLSGSIVFGGGTKLTVLG	120
001-F06	VH-CDR1	FSSYAMHWVRQAPG	121
	VH-CDR2	SAISGGATTYYADSVKGR	122
	VH-CDR3	AKGGTGDPYYFDY	123
	VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYDVH	124
	VL-CDR2	RNNQRPS	125
	VL-CDR3	CAARDDGLSGPV	126
	VH	EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVR QAPGKGLEWVSAISGGATTYYADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGTGDPYYFDYWGQ G TLTVSS	127
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC TGSSSNIGAGYDVH WYQ QLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEADYYCAARDDGLSGPVFGGGTKLTVLG	128
001-A09	VH-CDR1	FSSNYMSWVRQAPG	129
	VH-CDR2	SVISGSGGSTYYADSVKGR	130
	VH-CDR3	ARDRGWFD P	131
	VL-CDR1	CSGSRSNIDNSYVS	132
	VL-CDR2	RNNQRPS	133
	VL-CDR3	CATWDDSLSGPV	134
	VH	EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSNYMSWVRQ APGKGLEWVSVISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGWFDPWGQGT LTVS S	135
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC SGSRSNIDNSYVSWYQQL PGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCATWDDSLSGPVFGGGTKLTVLG	136
001-B05	VH-CDR1	FSNAWMSWVRQAPG	137
	VH-CDR2	SSISSASGYIYYGDSVKGR	138
	VH-CDR3	ARGTLYGDFDEF	139
	VL-CDR1	CSGSSSNIGNNAVN	140
	VL-CDR2	GNTNRPS	141
	VL-CDR3	CQSYDSSL SGYVV	142
	VH	EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVR QAPGKGLEWVSSISSASGYIYYGDSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNNLRAEDTAVYYCARGTLYGDFDEFWGQGT L VTVSS	143
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC SGSSSNIGNNAVN WYQQL PGTAPKLLIYGNTNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCQSYDSSL SGYVVFSGGGTKLTVLG	144

5	001-B09	VH-CDR1	FSRHAMNWVRQAPG	145
		VH-CDR2	SSISTGSSYIDYADSVKGR	146
		VH-CDR3	AREKGHYYYGMDV	147
		VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYDVH	148
		VL-CDR2	GNSYRPS	149
		VL-CDR3	CQSYDTSLSAYVV	150
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRHAMNWVR <b>QAPGK</b> GLEWVSSISTGSSYIDYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREKGHYYYGMDVWGQG TLVTSS	151
10		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQ QLPGTAPKLLIYGNSYRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCQSYDTSLSAYVVFGGGTKLTVLG	152
15	001-C03	VH-CDR1	FSNAWMSWVRQAPG	153
		VH-CDR2	SAISVSGINTYYADSVKGR	154
		VH-CDR3	ARDTGSLGVDY	155
		VL-CDR1	CSGSSSNIGSNTVN	156
		VL-CDR2	RNNQRPS	157
		VL-CDR3	CQSYDSSLSISV	158
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVR <b>QAPGK</b> GLEWVSAISVSGINTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTGSLGVDYWGQGTLV TVSS	159
20		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQL PGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCQSYDSSLSISVVFGGGTKLTVLG	160
25	001-C05	VH-CDR1	FSSNEMSWIRQAPG	161
		VH-CDR2	SVIYSGGSTYYADSVKGR	162
		VH-CDR3	ARREGWLVPFDY	163
		VL-CDR1	CSGSSSNIGSNTVN	164
		VL-CDR2	GNIIRPS	165
		VL-CDR3	CQSFDTTSLGSIV	166
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSNEMSWIRQ <b>APGK</b> GLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARREGWLVPFDYWGQGTLV VSS	167
30		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQL PGTAPKLLIYGNIIRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSE DEADYYCQSFDTTSLGSIVVFGGGTKLTVLG	168
35	001-G05	VH-CDR1	FSSYAMSWVRQAPG	169
		VH-CDR2	SVISGSGGSTYYADAVKGR	170
		VH-CDR3	TTDSGSGSYL	171
		VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYDVH	172
		VL-CDR2	SNNQRPS	173
		VL-CDR3	CAAWDDSLNGPV	174
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ <b>APGK</b> GLEWVSVISGSGGSTYYADAVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTDSGSGSYLWGQGTLV TVSS	175
40		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQ QLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCAAWDDSLNGPVVFGGGTKLTVLG	176
45	001-A10	VH-CDR1	FSDYYMTWIRQAPG	177
		VH-CDR2	SSISGGSTYYADSRKGR	178
		VH-CDR3	AREPGYSYGFFDY	179



5		VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYDVH	180
		VL-CDR2	SNNQRPS	181
		VL-CDR3	CQSYDRSLSGSIV	182
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT <b>FSDYYMTWIRQ</b> <b>APGK</b> GLEWVSSISGGSTYY <b>ADSRKGR</b> FTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYC <b>AREPGYSYGFFDY</b> WGQGLVT VSS	183
		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWHYQ QLPGTAPKLLIYSNN <b>QRPS</b> GVDPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYC <b>QSYDRSLSGSIV</b> FGGGTKLTVLG	184
10	001-C06	VH-CDR1	SSSYWMSWVRQAPG	185
		VH-CDR2	SAISGSGGSTYYADSVKGR	186
		VH-CDR3	AREYSGYEFDF	187
		VL-CDR1	CTGSSSNIGARSDVH	188
		VL-CDR2	GNNRNP	189
		VL-CDR3	CQSFDRGLSGSIV	190
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSSYWMSWVR <b>QAPGK</b> GLEWVSAISGSGGSTYY <b>ADSVKGR</b> FTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <b>AREYSGYEFDF</b> WGQGLT VTVSS	191
		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGARSDVHWHYQ QLPGTAPKLLIY <b>GNNRNP</b> SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYC <b>QSFDRGLSGSIV</b> FGGGTKLTVLG	192
15	001-H03	VH-CDR1	FSSNYMSWVRQAPG	193
		VH-CDR2	SSISSSSYIYYADSVKGR	194
		VH-CDR3	ARDRGRTGTDY	195
		VL-CDR1	CSGTTSNIGSYAVN	196
		VL-CDR2	GNINRPS	197
		VL-CDR3	CQSYDSSLASL	198
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT <b>FSSNYMSWVRQ</b> <b>APGK</b> GLEWVSSISSSSYIYY <b>ADSVKGR</b> FTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYC <b>ARDRGRTGTDY</b> WGQGLTVT SS	199
		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGTTSNIGSYAVNWHYQQL PGTAPKLLIY <b>GNINRPS</b> GVDPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYC <b>QSYDSSLASL</b> FGGGTKLTVLG	200
20	004-E08	VH-CDR1	FSRYWMHWVRQVPG	201
		VH-CDR2	SGISDSGVVTTYADSVKGR	202
		VH-CDR3	ARAQSVAFDI	203
		VL-CDR1	CSGSSSNIGAGHDVH	204
		VL-CDR2	YDDLPS	205
		VL-CDR3	CAAWDDSLSGWV	206
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT <b>FSRYWMHWVR</b> <b>QVPGK</b> GLEWVSGISDSGVVTTY <b>ADSVKGR</b> FTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <b>ARAQSVAFDI</b> WGQGLTVT VSS	207
		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGAGHDVHWHYQ QLPGTAPKLLIYY <b>YDDLPS</b> GVDPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYC <b>CAAWDDSLSGWV</b> FGGGTKLTVLG	208
25	005-A05	VH-CDR1	FSSYAMSWVRQAPG	209
		VH-CDR2	STIIGSGANTWYADSVKGR	210
		VH-CDR3	ARHEGYYYYGMDV	211
		VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYVVH	212
		VL-CDR2	GNSNRPS	213
		VL-CDR3	CAAWDDSLNGRV	214

5	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSTIIGSGANTWYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHEGYYYYGMDVWGQG TLVTVSS	215
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISTCTGSSSNIGAGYVHWHYQ QLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCAAWDDSLNGRVFGGGTKLTVLG	216

Все последовательности, приведенные выше в таблицах 1, 2 и 3 имеют человеческое происхождение и происходят из библиотеки n-CoDeR®, как подробно объясняется в Примере 1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описываемые в данном документе молекулы антител, которые специфически связывают TNFR2, также могут содержать один или оба константных участка (CH и/или CL), приведенных ниже в таблице 4.

Таблица 4

Участок	Последовательность	SEQ ID NO:
CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK	217
CL	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	218
CH	AKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSS SVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL ISLSPITCVVVDVSEDDPDVQISWFWNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGK EFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTN NGKTELNYKNTEPVLDSGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKFSRTPGK	219
CH	AKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSS SVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL ISLSPITCVVVDVSEDDPDVQISWFWNNVEVHTAQTQTHREDYASTLRVVSALPIQHQQDWMSGK EFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTN NGKTELNYKNTEPVLDSGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKFSRTPGK	220
CL	QPKSSPSVTLFPPSSEELTNKATLVCTITDFYPGVTVTDWKVDGTPVTQGMETTQPSKQSNKYM ASSYLTLTARAWERHSSYSCQVTHEGHTVEKSLRADCS	221

Первый CH (SEQ ID NO: 217) и первый CL (SEQ ID NO: 218) в приведенной выше таблице 4 имеют человеческое происхождение. Второй CH (SEQ ID NO: 219) и третий CH (SEQ ID NO: 220) в таблице 4 оба получены из мышинного IgG2a с той разницей, что третья последовательность CH (SEQ ID NO: 220) содержит мутацию N297A. Вторая последовательность CL (SEQ ID NO: 221) происходит из константного участка легкой цепи лямбда мыши. Эти мышинные последовательности применяются в примерах для суррогатных антител.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула антитела не связывает TNFR2 человека (hTNFR2).

В некоторых вариантах осуществления изобретения предпочтительно, чтобы молекула антитела связывалась как с hTNFR2, так и с TNFR2 яванского макака (cmTNFR2 или cynoTNFR2). Перекрестная реактивность с TNFR2, экспрессируемым на клетках яванского макака, также называемого крабоядной макакой или *Macaca fascicularis*, может обеспечивать преимущество, которое заключается в возможности тестировать молекулу антитела на животных без необходимости применять суррогатное антитело, уделяя особое внимание переносимости.

В некоторых вариантах осуществления изобретения необходимо применять суррогатное антитело для тестирования функциональной активности молекулы антитела на соответствующих *in vivo* моделях на мышах. Для достижения сопоставимости между эффектом молекулы антитела у людей и результатами *in vivo* для суррогатного антитела

у мышей важно выбирать функционально эквивалентное суррогатное антитело, имеющее *in vitro* характеристики, аналогичные молекуле антитела человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула антитела не связывается специфически с эпитопом TNFR2, содержащим последовательность KCSPG или

состоящим из нее.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула антитела по данному изобретению или применяемая в соответствии с изобретением представляет собой молекулу антитела, которая способна конкурировать в связывании с TNFR2 со специфическими антителами, представленными в данном документе, например, способна конкурировать с молекулами антитела, содержащими VH, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 15 и 23; и/или VL, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 8, 16 и 24.

Термин «способна конкурировать» означает, что конкурирующее антитело способно ингибировать или иным образом препятствовать по меньшей мере частично связыванию молекулы антитела по данному описанию с конкретной мишенью TNFR2.

Например, такая молекула конкурирующего антитела может быть способна ингибировать связывание молекулы антагонистического блокирующего антитела по данному описанию на по меньшей мере около 10%; например, по меньшей мере около 20% или по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, около 100%, и/или ингибировать способность описанного в настоящей заявке антитела препятствовать связыванию TNFR2 или уменьшать связывание со специфической мишенью лиганда TNF- $\alpha$  на по меньшей мере около 10%, например, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или около 100%.

Конкурентное связывание может быть определено способами, хорошо известными специалистам в данной области техники, такими как иммуноферментный анализ (ELISA).

Анализы ELISA можно применять для оценки эпитоп-модифицирующих или блокирующих антител. Дополнительные способы, пригодные для выявления конкурирующего антитела, описаны в лабораторном руководстве «Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow & Lane, 1988, CSHL, NY, ISBN 0-87969-314-2», содержание которого включено в данный документ посредством ссылки (например, см. стр. 567 – 569, 574 – 576, 583 и 590 – 612.).

В некоторых вариантах осуществления изобретения представляет интерес применение не самой молекулы антитела, а нуклеотидной последовательности, кодирующей такую молекулу антитела. В результате данное изобретение охватывает нуклеотидные последовательности, кодирующие вышеуказанные молекулы антагонистического TNFR-2-блокирующего антитела.

Вышеописанные молекулы антагонистических блокирующих антител и нуклеотидные последовательности могут быть применены в медицине, а затем такая молекула антитела и/или нуклеотидная последовательность могут быть включены в фармацевтическую композицию, как рассматривается ниже.

Вышеописанные молекулы антагонистических блокирующих антител, нуклеотидные последовательности и/или фармацевтические композиции можно применять при лечении рака, как рассматривается ниже.

Вышеописанные молекулы антагонистических блокирующих антител, нуклеотидные

последовательности и/или фармацевтические композиции можно применять при лечении инфекции, вызванной внутриклеточным патогеном, как рассматривается ниже.

Вышеописанные молекулы антагонистических блокирующих антител и/или нуклеотидные последовательности можно применять при получении фармацевтической композиции для лечения рака.

Вышеописанные молекулы антагонистических блокирующих антител и/или нуклеотидные последовательности можно применять при получении фармацевтической композиции для лечения инфекции, вызванной внутриклеточным патогеном.

Вышеописанные антагонистические блокирующие молекулы антител и/или фармацевтические композиции можно применять в способе лечения рака у пациента, в котором субъекту вводят терапевтически эффективное количество молекулы антитела или фармацевтической композиции.

Вышеописанные антагонистические блокирующие молекулы антител и/или фармацевтические композиции можно применять в способе лечения инфекции, вызванной внутриклеточным патогеном у пациента, в котором субъекту вводят терапевтически эффективное количество молекулы антитела или фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, относящихся к лечению рака, рак представляет собой солидный рак или лейкоемический рак. Солидная опухоль представляет собой аномальную массу ткани, которая, как правило, не содержит кист или жидких участков. Солидные опухоли могут быть доброкачественными (не рак) или злокачественными (рак). Злокачественные солидные опухоли в данном документе обозначают солидный рак. Различные типы солидных опухолей названы в соответствии типам клеток, которые их образуют. Примерами солидных опухолей или рака являются саркомы, карциномы и лимфомы.

Более специфичными примерами солидного рака являются рак легких, рак молочной железы, колоректальный рак, рак простаты, рак мочевого пузыря, рак яичников, рак эндометрия, рак почки, рак печени, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак мозга, рак центральной нервной системы, меланома, нейробластома, опухоль Вильмса, рабдомиосаркома, ретинобластома, рак головы и шеи, рак желудка, лимфома и рак костей.

Более специфичными примерами лейкозного рака являются острый лимфоцитарный лейкоз, хроническое миелопролиферативное заболевание, острый нелимфоцитарный лейкоз, острый В-клеточный лимфоцитарный лейкоз, хронический лимфолейкоз, Т-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз, неходжкинские лимфопролиферативные заболевания.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, относящихся к лечению инфекции, вызванной внутриклеточным патогеном, таким как вирус или бактерия. Конкретными примерами внутриклеточных патогенов являются *Legionella pneumophila*, *R. rickettsia*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, инвазивные *Escherichia coli*, *Neisseria* spp, *Brucella* spp, *Shigella* spp, вирус гриппа, вирус герпеса, вирус гепатита, коксакивирус, вирус Эпштейн-Барр или риновирус.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, относящихся к лечению рака, описанные выше молекулы антагонистического блокирующего антитела можно применять в сочетании с молекулой антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки. В альтернативном варианте осуществления изобретения рассматриваемые выше нуклеотидные последовательности, кодирующие молекулу антагонистического блокирующего TNFR2 антитела, можно применять в сочетании с молекулой антитела, которая специфически связывается с ингибитором

контрольной точки или совместно со стимулирующим агонистическим антителом. Антитела к ингибиторам контрольных точек включают антитела, нацеленные на CTLA4, PD1, PD-L1, VISTA, TIGIT, CD200, CD200R, BTLA, LAG3, TIM3, B7-H3, B7-H4, B7-H7. Примерами совместно стимулирующих агонистических антител являются антитела, нацеленные на OX40, 41BB, OX40L, 41BBL, GITR, ICOS, DR3, DR4, DR5, CD40, CD27, RANK, HVEM, LIGHT и B7-H6. В альтернативном варианте осуществления изобретения описываемые выше молекулы антагонистического TNFR2-блокирующего антитела можно применять в сочетании с нуклеотидной последовательностью, кодирующей молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки или совместно со стимулирующим агонистом. В альтернативном варианте осуществления изобретения рассматриваемые выше нуклеотидные последовательности, кодирующие молекулу TNFR2-блокирующего антитела, можно применять в сочетании с нуклеотидной последовательностью, которая кодирует молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки или совместно со стимулирующим агонистом. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения молекула антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки, представляет собой анти-PD-1 антитело. Считается, что антитела к PD1 (или PD1) блокируют ингибирующий сигнал, опосредованный PD-L1, прежде всего в CD8<sup>+</sup> Т-клетках; тем самым допуская усиление опосредованного Т-клетками противоопухолевого ответа. Антагонистические антитела к TNFR2, истощающие Treg-клетки, будут работать посредством отдельного механизма для увеличения противоопухолевого ответа. Следовательно, такие способы лечения могут взаимодействовать друг с другом. Аналогичный подход справедлив и для других ингибиторов контрольных точек и агонистических совместно стимулирующих антител.

Кроме того, описанные выше молекулы антагонистического TNFR2-блокирующего антитела можно применять в сочетании с другими противораковыми препаратами, такими как препараты химиотерапии (например, среди прочего такими как доксорубин, параплатин, циклофосфамид, паклитаксел, гемцитабин, 5-фторурацил, доцетаксел, винкристин, митоксантрон, мутамицин, эпирубицин и метотрексат), низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназы или серин/треонинкиназы (например, но не ограничиваясь ими, ибрутиниб, иматиниб, сунтиниб, регорафениб, сорафениб, дазатиниб, эрлотиниб, вандетаниб, мидостаурин, вемурафениб, дабрафениб, палбоциклиб, рибоциклиб, траметиниб или алектиниб), ингибиторы, нацеленные на рецепторы факторов роста (например, но не ограничиваясь ими, лекарственные средства, нацеленные на EGFR/HER1/ErbB1, EGFR2/HER2/ErbB2, EGFR3/HER3/ErbB3, VEGFR, PDGFR, HGFR, RET, инсулиноподобный фактор роста IGFR, FGFR), антиангиогенные агенты (например, среди прочего такими как бевацизумаб, эверолимус, леналидомид, талидомид, зив-афлиберцепт) или облучение. Как правило, все вышеупомянутые противораковые препараты вызывают гибель раковых клеток, что приводит к воздействию неоантигенов и воспалению. Во время воздействия неоантигенов и притока воспалительных клеток в опухоль могут возникать синергические эффекты противоракового препарата, и добавление антагонистического блокирующего лиганда антитела TNFR2, которое может истощать Treg-клетки и тем самым еще более усиливать иммунную систему.

Специалисту в области медицины может быть известно, что лекарства могут быть модифицированы с помощью различных добавок, например, чтобы изменить скорость всасывания лекарства в организме; и могут быть модифицированы в различных формах, например, чтобы обеспечить определенный путь введения в организм.

Вследствие этого данная заявка включает молекулы антагонистических блокирующих антител, нуклеотидные последовательности, плазмиды, вирусы и/или клетки, описываемые в данном документе, могут быть объединены с фармацевтически приемлемым наполнителем, носителем, разбавителем, носителем и/или адъювантом в фармацевтическую композицию. В таком контексте термин «фармацевтическая композиция» может использоваться взаимозаменяемо с терминами «фармацевтический препарат», «фармацевтический состав», «терапевтическая композиция», «терапевтический препарат», «терапевтический состав» и «терапевтический объект».

Описываемые в данном документе фармацевтические композиции могут содержать или в некоторых вариантах осуществления изобретения состоять из молекул антител, нуклеотидных последовательностей, плазмид, вирусов или клеток.

Описываемые в данном документе фармацевтические композиции могут в некоторых вариантах осуществления изобретения состоять из или содержать плазмиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие описанные выше молекулы антител или содержащие описанные выше нуклеотидные последовательности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции могут содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие части или полную молекулу антитела, описываемую в данном документе, интегрированную в клеточный или вирусный геном или в вирион. Затем фармацевтическая композиция может содержать клетку или вирус в качестве носителя для доставки антитела по данному изобретению (или носителя для доставки нуклеотидной последовательности, кодирующей антитело по данному изобретению). Например, в варианте осуществления изобретения вирус может находиться в форме терапевтического онколитического вируса, содержащего нуклеотидные последовательности, кодирующие по меньшей мере одну из молекул антител, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения такой онколитический вирус содержит нуклеотидные последовательности, кодирующие полноразмерное антитело IgG человека.

Некоторые из вариантов осуществления изобретения относятся к вирусу, содержащему нуклеотидную последовательность по данному описанию или плазмиду по данному описанию. Предпочтительно вирус представляет собой онколитический вирус, например, терапевтический онколитический вирус. Такие онколитические вирусы известны специалистам в области медицины и вирусологии.

В некоторых вариантах осуществления изобретения такой онколитический вирус содержит нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с последовательностью, указанной выше в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такой онколитический вирус содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с последовательностью, указанной выше в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такой онколитический вирус содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, указанной выше в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такой онколитический вирус содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью, указанной в выше в таблице 1.

В качестве примера нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело 001-N10, может представлять собой последовательность, представленную в таблице 5.

Таблица 5. Пример нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитело 001-

H10 - части последовательностей, которые подчеркнуты в таблице, кодируют соответственно последовательности VH и VL антитела 001-H10

Кодирование	Последовательность	SEQ ID NO:
001-H10 VH	<u>GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG</u> <u>GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATG</u> <u>ATTATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGG</u> <u>AGTGGGTCTCAGTTATTTATAGCGGTGGTAGTACATATTACGCAGA</u> <u>CTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAA</u> <u>CACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGC</u> <u>CGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGAAGCAGCAGCTGGTACCGCGA</u> <u>TGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGTAACTGGTCACCGTGAGCTC</u> <u>AGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCC</u> <u>AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG</u> <u>GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCC</u> <u>CTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAG</u> <u>GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT</u> <u>GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA</u> <u>CACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC</u> <u>TCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACC</u> <u>GTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATC</u> <u>TCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC</u> <u>GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG</u> <u>GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG</u> <u>CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCCTGCACCAGGACTG</u> <u>GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT</u> <u>CCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCC</u> <u>CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCT</u> <u>GACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA</u> <u>TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG</u> <u>AGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT</u> <u>CCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC</u> <u>AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC</u> <u>ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAT</u> <u>GA</u>	222
001-H10 VL	<u>CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGG</u> <u>CAGAGGGTCACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGG</u> <u>GCAGGTTATGATGTACACTGGTATCAGCAGCTCCAGGAACGGCC</u> <u>CCCAAACCTCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCAGGGGTC</u> <u>CCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGG</u> <u>CCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTG</u> <u>CAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTTGGGTGTTCCGGCGGAGGAA</u> <u>CCAAGCTGACGGTCTTAGGTACAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCA</u> <u>CTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCAC</u> <u>ACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGT</u> <u>GGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGA</u> <u>CCACCACACCCTCCAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCA</u> <u>GCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCACAGAAGCT</u> <u>ACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACA</u> <u>GTGGCCCCCTACAGAATGTTTCATGA</u>	

Некоторые онколитические вирусы способны принимать достаточно большие вставки ДНК, чтобы обеспечить интеграцию полноразмерных последовательностей антител человека. Аттенуированные вирусы осповакцины и вирусы простого герпеса являются примерами терапевтических онколитических вирусов, чей геном достаточно велик для

интеграции полноразмерных последовательностей антител IgG (Chan, W.M. et al 2014. 'Oncolytic Poxviruses', *Annu Rev Virol*, 1: 119-41; Bommarreddy. et al 2018. 'Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy', *Nat Rev Immunol*, 18: 498-513).

Полноразмерные антитела IgG успешно интегрированы в онколитический вирус Vaccinia, что приводит к экспрессии и внеклеточному высвобождению (продукции)

полноразмерных антител IgG при инфицировании чувствительных к вирусу клеток-хозяев, например раковых клеток (Kleinpeter, P., et al. 2016. 'Vectorization in an oncolytic vaccinia virus of an antibody, a Fab and a scFv against programmed cell death -1 (PD-1) allows their intratumoral delivery and an improved tumor-growth inhibition', *Oncoimmunology*, 5: e1220467).

Аденовирусы также могут быть сконструированы для кодирования полноразмерных антител IgG, которые функционально продуцируются и секретируются при клеточной инфекции (Marino, N., et al. 2017. 'Development of a versatile oncolytic virus platform for local intra-tumoural expression of therapeutic transgenes', *PLoS One*, 12: e0177810).

Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим вирус, например, онколитический вирус, как рассматривалось выше, и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель и/или адъювант.

Изобретение также включает другие терапевтические средства или «формы» лекарственных средств, такие как конъюгаты антитело-лекарство, слитые белки и т.п., и фармацевтическую композицию, содержащую такие терапевтические средства.

Молекулы антител, нуклеотидные последовательности, плазмиды, вирусы, клетки и/или фармацевтические композиции, описываемые в данном документе, могут быть пригодны для парентерального введения, в том числе водные и/или неводные стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, и/или буферы, и/или бактериостатики, и/или растворенные вещества, которые образуют композицию

изотоничной крови предполагаемого реципиента; и/или водные и/или неводные стерильные суспензии, которые могут содержать суспендирующие агенты и/или загустители. Молекулы антител, нуклеотидные последовательности, плазмиды, клетки и/или фармацевтические композиции, описываемые в данном документе, могут быть представлены в контейнерах для однократной или многократной дозы, например, в запечатанных ампулах и флаконах, и могут храниться в высушенном сублимацией (то есть лиофилизированном) состоянии, требующем добавления только стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекций, непосредственно перед применением.

Экстемпоральные инъекционные растворы и суспензии можно приготовить из стерильных порошков и/или гранул, и/или таблеток ранее описанного вида.

При парентеральном введении пациентам-людям уровень суточной дозы молекулы анти- TNFR2 антитела обычно составляет от 1 мг/кг веса тела пациента до 20 мг/кг, а в некоторых случаях даже до 100 мг/кг вводится в разовой или разделенной дозе. Более низкие дозы можно применять в особых обстоятельствах, например, в сочетании с продолжительным введением. В любом случае врач определит фактическую дозировку, которая будет наиболее подходящей для каждого отдельного пациента, и которая будет варьировать в зависимости от возраста, веса и реакции конкретного пациента.

Приведенные выше дозы являются типичными для среднего случая. Конечно, могут быть отдельные случаи, когда оправданы более высокие или более низкие диапазоны дозировок, и такие случаи относятся к сфере применения данного изобретения.

Как правило, описываемая в данном документе фармацевтическая композиция (или лекарственное средство), содержащая молекулу антитела, будет содержать молекулу анти- TNFR2 антитела в концентрации в пределах от около 2 мг/мл до 150 мг/мл или от около 2 мг/мл до 200 мг/мл.



Как правило, для людей пероральное или парентеральное введение молекулы антител, нуклеотидных последовательностей, плазмид, вирусов, клеток и/или фармацевтических композиций, описываемых в данном документе, является предпочтительным и наиболее удобным путем. Для ветеринарного применения молекулы антител, нуклеотидные последовательности, плазмиды, вирусы, клетки и/или фармацевтические композиции, описанные в данном документе, вводят в виде подходящего приемлемого состава в соответствии с обычной ветеринарной практикой, и ветеринарный хирург определит режим дозирования и способ введения, который будет наиболее подходящим для конкретного животного. В результате данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей количество молекулы антитела, нуклеотидной последовательности, плазмиды, вируса и/или клетки по данному изобретению, эффективное для лечения различных состояний (как описано выше и далее ниже). Предпочтительно, чтобы молекулы антител, нуклеотидные последовательности, плазмиды, вирусы, клетки и/или фармацевтические композиции, описываемые в данном документе, были адаптированы для доставки с помощью пути, выбранного из группы, включающей: внутривенный (IV или в/в); внутриопухолевый (IM или i.m.); внутримышечный (SC или в/м) или подкожный.

Данное изобретение также включает молекулы антител, нуклеотидные последовательности, плазмиды, вирусы, клетки и/или фармацевтические композиции, описанные в данном документе, включающие фармацевтически приемлемые кислые аддитивные соли или основанные аддитивные соли целевых связывающих молекул или их частей по данному изобретению. Кислоты, которые применяются для получения фармацевтически приемлемых кислых аддитивных солей вышеупомянутых основных соединений, полезных в настоящем изобретении, являются кислотами, которые образуют нетоксичные кислые аддитивные соли, т.е. соли, содержащие фармакологически приемлемые анионы, в частности, такие как соли гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, нитрат, сульфат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, ацетат, лактат, цитрат, кислый цитрат, тартрат, битартрат, сукцинат, малеат, фумарат, глюконат, сахарат, бензоат, метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат и памоат [то есть 1,1'-метилтен-бис-(2-гидрокси-3 нафтоат)] среди прочего.

Фармацевтически приемлемые основные аддитивные соли также можно применять для получения фармацевтически приемлемых солевых форм агентов согласно настоящему изобретению. Химические основания, которые можно применять в качестве реактивов для получения фармацевтически приемлемых основных солей настоящих агентов, которые являются кислотными по своей природе, являются химические основания, которые образуют с такими соединениями нетоксичные основные соли. Такие нетоксичные основные соли включают, но не ограничиваются ими, нетоксичные основные соли, являющиеся производными таких фармакологически приемлемых катионов, как катионы щелочных металлов (например, калия и натрия) и катионы щелочноземельных металлов (например, кальция и магния). кальций и магний), аммоний или водорастворимые аминовые аддитивные соли, такие как N-метилглюкамин-(меглюмин), а также в том числе низший алканоламмоний и другие основные соли фармацевтически приемлемых органических аминов. Молекулы антител, нуклеотидные последовательности, плазмиды, вирусы и/или клетки, описанные в данном документе, могут быть лиофилизированы для хранения и восстановлены в подходящем носителе перед применением. Можно применять любой подходящий метод лиофилизации (например, распылительная сушка, сушка осадка) и/или методы ресуспендирования. Специалисты в данной области техники примут во внимание то, что лиофилизация и

ресуспензирование могут привести к потере организмом в различной степени активности антител (например, при применении обычных иммуноглобулинов антитела IgM имеют тенденцию к большей потере активности, чем антитела IgG) и что для компенсации этого уровни применения могут быть скорректированы в сторону увеличения. В одном варианте осуществления изобретения лиофилизированная (сублимированная) полипептидсвязывающий фрагмент теряет не более чем около 20%, или не более чем около 25%, или не более чем около 30%, или не более чем около 35%, или не более чем около 40%, или не более чем около 45%, или не более чем около 50% своей активности (до лиофилизации) при регидратации.

Молекулы анти-TNFR2 антитела, нуклеотидные последовательности и фармацевтические композиции, описываемые в данном документе, могут быть применены для лечения рака у субъекта или пациента. В данном документе термины «субъект» и «пациент» используются как синонимы.

В контексте данного документа термин «пациент» (или «субъект»), относится к животному, включая человека, у которого диагностировано конкретное заболевание.

В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент (или субъект) представляет собой животное, включая человека, которому был поставлен диагноз: рак и/или проявляются симптомы рака.

В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент (или субъект) представляет собой животное, включая человека, у которого диагностирована инфекция, вызванная внутриклеточным патогеном, и/или у которого проявляются симптомы инфекции, вызванной внутриклеточным патогеном.

В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент (или субъект) представляет собой пациента с высокой экспрессией TNFR2 в пораженной ткани. В данном контексте высокая экспрессия означает более высокий уровень экспрессии TNFR2 по сравнению с соответствующей здоровой тканью. Обычно здоровая ткань, используемая для такого сравнения, представляет собой эталонную ткань (или стандартный эталон), собранную из здоровой ткани у одного или нескольких здоровых индивидуумов. Уровень экспрессии можно измерять стандартными методами, такими как иммуногистохимия (ИНС), сортировка клеток с активацией флуоресценции (FACS) или измерения экспрессии мРНК.

Предполагается, что пациент может быть млекопитающим или не млекопитающим. Предпочтительно пациент-млекопитающее представляет собой человека, лошадь, корову, овцу, свинью, верблюда, собаку или кошку. Наиболее предпочтительно, чтобы пациент-млекопитающее представлял собой человека.

В контексте данного документа понятие «демонстрировать» означает, что у пациента демонстрируется симптом рака и/или диагностический маркер рака; и/или симптом рака и/или диагностический маркер рака можно измерить и/или оценить, и/или количественно определить.

Специалист в области медицины сразу поймет, каковы симптомы рака и диагностические маркеры рака, а также, как измерить и/или оценить, и/или количественно определить, происходит ли уменьшение или увеличение тяжести симптомов рака или уменьшение или увеличение диагностических маркеров рака; а также как эти симптомы рака и/или диагностические маркеры рака можно использовать для формирования прогноза течения рака.

Лечение рака часто назначают в виде курса лечения, то есть лекарственный препарат вводят в течение определенного периода времени. Продолжительность курса лечения будет зависеть от ряда факторов, которые среди прочего могут включать тип вводимого

лекарственного препарата; тип рака, который подвергается лечению; тяжесть рака, который подвергается лечению; возраст и состояние здоровья пациента.

В контексте данного документа выражение «во время лечения» означает, что пациент в настоящее время проходит курс лечения и/или получает лекарственный препарат, и/или получает курс лекарственного препарата.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак, который подвергается лечению в соответствии с данным изобретением, является солидной опухолью.

Каждый из вышеописанных видов рака хорошо известен, а симптомы и диагностические маркеры рака хорошо описаны, как и лекарственные препараты, применяющиеся для лечения этих видов рака. Соответственно, симптомы, диагностические маркеры рака и лекарственные препараты, применяющиеся для лечения вышеуказанных типов рака, известны специалистам в области медицины.

Клинические определения диагноза, прогноза и прогрессирования большого количества раковых заболеваний основаны на определенных классификациях, известных как определение стадии рака. Эти системы определения стадии рака действуют для сопоставления ряда различных диагностических маркеров рака и симптомов рака, для обеспечения формулировки диагноза и/или прогноза, и/или прогрессирования рака. Специалисту в области онкологии будет известно, как оценить диагноз, и/или прогноз, и/или прогрессирование рака, используя систему определения стадии рака, и какие диагностические маркеры рака и симптомы рака следует применять для этого.

В контексте данного документа выражение «определение стадии рака» означает определение стадии рака по классификации Rai, которая включает в себя стадию 0, стадию I, стадию II, стадию III и стадию IV, и/или по классификации Binet, которая включает в себя стадию A, стадию B и стадию C, и/или по классификации Ann Arbour, которая включает стадию I, стадию II, стадию III и стадию IV.

Известно, что рак может вызывать аномалии в морфологии клеток. Эти аномалии часто повторно встречаются при определенных видах рака, что означает то, что исследование этих изменений в морфологии (также известное как гистологическое исследование) можно применять в диагностике или прогнозировании рака. Методы визуализации образцов для изучения морфологии клеток и подготовки образцов для визуализации хорошо известны в данной области техники; например, световая микроскопия или конфокальная микроскопия.

В контексте данного документа термин «гистологическое исследование» означает наличие мелких зрелых лимфоцитов и/или наличие мелких зрелых лимфоцитов с узкой каймой цитоплазмы, наличие мелких зрелых лимфоцитов с плотным ядром, лишенным отчетливо видимых ядрышек, и/или наличие мелких зрелых лимфоцитов с узкой каймой цитоплазмы, и/или с плотным ядром, лишенным отчетливо видимых ядрышек, и/или наличие атипичных клеток, и/или расщепленных клеток, и/или пролимфоцитов.

Хорошо известно, что рак является результатом мутаций в ДНК клетки, которые могут привести к тому, что клетка избегает клеточной гибели или бесконтрольно размножается. Поэтому исследование этих мутаций (также известное как цитогенетическое исследование) может быть полезным инструментом для оценки диагноза и/или прогноза рака. Примером этого является делеция хромосомной локации 13q14.1, которая характерна для хронической лимфоцитарной лейкемии. Методы исследования мутаций в клетках хорошо известны в данной области техники; например, флуоресцентная гибридизация in situ (FISH).

В контексте данного документа термин «цитогенетическое исследование» означает исследование ДНК в клетке и, в частности, в хромосоме. Цитогенетическое исследование

можно применять для выявления изменений в ДНК, которые могут быть связаны с наличием рефрактерного рака и/или рецидивирующего рака. Такие изменения ДНК могут включать: делеции в длинном плече хромосомы 13 и/или делеции локуса 13q14.1 хромосомы, и/или трисомию хромосомы 12, и/или делеции в длинном плече хромосомы 12, и/или делеции в длинном плече хромосомы 11, и/или делецию 11q, и/или делеции в длинном плече хромосомы 6, и/или делецию 6q, и/или делеции в коротком плече хромосомы 17, и/или делецию в 17p, и/или транслокацию t(11:14), и/или транслокацию (q13:q32), и/или перестройку рецептора гена антигена, и/или перестройки BCL2, и/или перестройки BCL6, и/или транслокации t(14:18), и/или транслокации t(11:14), и/или транслокации (q13:q32), и/или транслокации (3:v), и/или транслокации (8:14), и/или транслокации (8:v), и / или транслокации t(11:14) и (q13:q32).

Известно, что больные раком проявляют определенные физикальные симптомы, которые часто являются результатом бремени рака на организм. Эти симптомы часто повторяются при одном и том же раке, и поэтому могут быть характерными для диагноза, и/или прогноза, и/или прогрессирования заболевания. Специалист в области медицины должен понимать, какие физикальные симптомы связаны с какими видами рака, и как оценка этих физикальных систем может коррелировать с диагнозом, и/или прогнозом, и/или прогрессированием заболевания. В контексте данного документа термин «физикальные симптомы» означает гепатомегалию и/или спленомегалию.

Краткое описание графических материалов

В приведенных ниже примерах используются следующие фигуры:

На фиг. 1 показано, что антитела по данному изобретению связывают TNFR2. Фиг. 1 A-D: С помощью анализа ELISA было показано, что человеческие антитела связываются с человеческим белком TNFR2 дозозависимым образом, генерируя различные значения EC50. Фиг. 1E: Мышинные антитела 3-F10 и 5-A05 связываются с mTNFR2 с аналогичной аффинностью.

На фиг. 2 показано связывание специфичных к TNFR2 антител n-CoDeR® с *in vitro* активированными CD4<sup>+</sup> Т-клетками. CD4<sup>+</sup> Т-клетки, полученные из крови человека (фиг. 2 AD), и CD4<sup>+</sup> Т-клетки селезенки мыши (фиг. 2 E) были активированы IL-2 и CD3/CD28 Dynabeads®. Аффинность TNFR2-специфических антител n-CoDeR® к активированным клеткам анализировали с помощью FACS в концентрациях от 0,002-267 нМ (человек) и 0,00003-133 нМ (мышь). Кривые показывают среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) после вычитания фона изотипического контроля (фиг. 2 A (полные и частичные блокаторы), фиг. 2 B (частичные блокаторы), фиг. C и D (неблокаторы), фиг. 2 E (полный блокатор мыши (3-F10) и неблокатор (5-A05))).

В то время как человеческие антитела TNFR2 связываются с различной аффинностью с *in vitro* активированными CD4 (значения EC50 от 0,59 до 53 нМ), антитела TNFR2 мыши связываются с аналогичной аффинностью (значения EC50 в диапазоне от 0,072 до 0,11 нМ).

На фиг. 3 показано, что антитела TNFR2 n-CoDeR® специфически связываются с TNFR2. CD4<sup>+</sup> Т-клетки, полученные из крови человека (фиг. 3 A), и CD4<sup>+</sup> Т-клетки селезенки мыши (фиг. 3 B) активировали в течение 3 дней с помощью рекомбинантных IL-2 и CD3/CD28 активирующих гранул. Активированные *in vitro* клетки блокировали поликлональным антителом против TNFR2 (серая линия) или оставляли в PBS (черная линия) на 30 минут перед окрашиванием субоптимальной концентрацией различных антител TNFR2 n-CoDeR® или изотипического контроля (пунктирная линия) на 15 минут. Затем клетки промывали и инкубировали с вторичным антителом,

конъюгированным с антиген-презентирующей клеткой APC, в течение 30 минут перед анализом с помощью проточной цитометрии.

Все антитела могут быть заблокированы поликлональным антителом TNFR2, следовательно, показано, что антитела TNFR2 n-CoDeR® (человека и мыши) специфичны к TNFR2.

На фиг. 4 показана перекрестная реактивность человеческих TNFR2-специфических антител n-CoDeR® к Cynomolgus. CD4<sup>+</sup> Т-клетки выделяли из крови яванского макака и стимулировали PMA и иономицином. Через 2 дня клетки метили 0,1, 1 или 10 мкг/мл TNFR2-специфическими антителами n-CoDeR® или изотипическим контролем с последующей инкубацией со вторичным α-антителом человека, конъюгированным с APC. Клетки анализировали способом проточной цитометрии. На фигуре показано процентное содержание TNFR2<sup>+</sup> Т-клеток для индивидуальных антител по сравнению с изотипическим контролем. Результаты представляют собой среднее значение и стандартное отклонение (SD, standard deviation) из 2-3 отдельных экспериментов.

Большинство антител к TNFR2 демонстрируют перекрестно-реактивное связывание с клетками Cynomolgus.

На фиг. 5 показано, что все описываемые в данном документе TNFR2-специфические антитела n-CoDeR® связывают другие эпитопы на белке TNFR2, чем клон MR2-1 TNFR2.

CD4<sup>+</sup> Т-клетки, полученные из крови человека, стимулировали активационными гранулами rhIL-2 и CD3/CD28 в течение 2-3 дней. Активированные клетки блокировали 40 мкг/мл антитела MR2-1 (фиг. 5 А, черные столбцы) или оставляли в PBS (фиг. 5 А, серые столбцы) на 30 минут, затем добавляли TNFR2-специфические антитела n-CoDeR®/поликлональные TNFR2 (pTNFR2) и клетки инкубировали 15 мин. Процент связанных антител TNFR2 n-CoDeR® анализировали с помощью FACS после инкубации со вторичными антителами, конъюгированными с APC. На фиг. 5В активированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки блокировали 40 мкг/мл TNFR2-специфических антител n-CoDeR®/pTNFR2 (черные столбцы) или оставляли в PBS (серая полоса), а затем инкубировали 15 мин с PE-конъюгированными антителами MR2-1. Затем клетки анализировали с помощью FACS.

Антитело MR2-1 не препятствовало связыванию TNFR2 специфических антител n-CoDeR®, а антитела n-CoDeR® не влияли на связывание MR2-1 с активированными клетками, показывая, что все антитела n-CoDeR® связывают другие домены белка TNFR2, чем антитело MR2-1.

На фиг. 6 показана активность по блокированию лиганда антител против TNFR2 человека. Блокирующий анализ ELISA выполняли с мАт n-CoDeR®, специфическими для hTNFR2 для оценки характеристик блокирования лиганда. фиг. 6 А: Все антитела инкубировали при 10 мкг/мл. Затем дозировали все антитела, снижающие сигнал, достигаемый с помощью изотипического контроля, на более чем 50% (обозначено пунктирной линией) для дальнейшего изучения потенциала блокирования лиганда. фиг. 6 В показывает полные блокирующие мАт, фиг. 6 С и D показывают частично блокирующие мАт, а фиг. 6 Е показывает слабые блокирующие мАт. Все остальные мАт считаются неблокирующими мАт.

На фиг. 7 показана активность по блокированию лиганда антител против мышинного TNFR2. Блокирующий анализ ELISA выполняли с мАт n-CoDeR®, специфическими для mTNFR2, для оценки характеристик блокирования лиганда. Фиг. 7 А: Все антитела инкубировали при 10 мкг/мл. Затем дозировали все антитела, снижающие сигнал, достигаемый с помощью изотипического контроля, более чем на 50% (обозначено

пунктирной линией) для дальнейшего изучения потенциала блокирования лиганда. Фиг. 7 В показывает полные блокирующие мАт, фиг. 7 С и D показывают частично блокирующие мАт, а фиг. 7 Е показывает слабые блокирующие мАт. Все остальные мАт считаются неблокирующими мАт. На основании этого были выбраны антитела 3-F10 и 5-A05 для представления полностью блокирующих антител и неблокирующих антител соответственно.

Фиг. 8. Категоризация TNFR2-специфических антител n-CoDeR® в соответствии с их способностью агонизировать/антагонизировать передачу сигналов TNFR2 и способностью блокировать связывание TNF- $\alpha$  с TNFR2. Способность TNFR2-специфических антител n-CoDeR® увеличивать или уменьшать продукцию IFN- $\gamma$  контролировали с применением стимулированных IL-2 и IL-12 НК-клеток и наносили на график как функцию способности антител блокировать связывание лиганда TNF- $\alpha$  с TNFR2, как описано выше. Фиг. 8А: НК-клетки, полученные из крови человека, стимулировали 20 нг/мл rhIL-2 и 20 нг/мл rhIL-12 с добавлением 10 мкг/мл TNFR2-специфических антител n-CoDeR®, изотипического контроля или 100 нг/мл rhTNF- $\alpha$  на 24 ч. Количество IFN- $\gamma$  в супернатантах культур измеряли с помощью MSD. Количество IFN- $\gamma$  нормализовано к изотипическому контролю (значения IFN- $\gamma$  изотипического контроля = 1 на фигуре) и показано на фиг. 8 А. Человеческие антитела, которые имели более высокое значение EC50, чем 25 нМ, к активированным *in vitro* CD4<sup>+</sup> Т-клеткам не были включены в анализ. Фиг. 8В: НК-клетки человека также продуцируют TNF- $\alpha$  в этих культурах (данные показывают средние уровни TNF- $\alpha$  двух доноров. Собирали супернатанты клеточных культур и количество продуцируемого IFN- $\gamma$  анализировали с помощью MSD. Результаты нормализуют относительно изотипического контроля. Результаты IFN- $\gamma$  представляют собой среднее значение для 3 доноров в 2 независимых экспериментах. Результаты выявляют две крайние группы, характеризующиеся 1) антителами с полностью блокирующими и антагонистическими свойствами и 2) антителами с неблокирующими свойствами агонистов, соответственно. Агонистические неблокирующие антитела являются агонистами и увеличивают продукцию IFN- $\gamma$  из НК-клеток, стимулированных цитокинами, в то время как блокирующие антитела являются антагонистическими и ингибируют высвобождение IFN- $\gamma$ . На фиг. 8С показано, что высвобождение IFN- $\gamma$  представляет собой TNF- $\alpha$  зависимое от нейтрализации растворимого TNF- $\alpha$  снижение IFN- $\gamma$ , при добавлении экзогенного TNF- $\alpha$  увеличивает IFN- $\gamma$ . На фиг. 8D показано, что добавление блокирующего анти-TNF- $\alpha$  антитела приводит к дозозависимой нейтрализации растворимого TNF- $\alpha$ . В дозе 1 мкг/мл растворимый TNF- $\alpha$  можно нельзя обнаружить в супернатанте.

На фиг. 9 показано, что неблокирующие агонистические, но не блокирующие антагонистические TNFR2-специфические антитела n-CoDeR® увеличивают долю CD25<sup>+</sup> клеток в популяции CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти. CD4<sup>+</sup> Т-клетки, полученные из крови человека (фиг. 9 А), и CD4<sup>+</sup> Т-клетки селезенки мыши (фиг. 9 В) были активированы рекомбинантными ИЛ-2 и TNFR2-специфическими антителами n-CoDeR®, изотипическим контролем или рекомбинантным TNF- $\alpha$ . После 3 дней культивирования клетки окрашивали на CD25 и CD45RO (человек)/CD44 и CD62L (мышь) и анализировали с помощью проточной цитометрии. Результаты показывают процент клеток, экспрессирующих CD25, в популяции памяти (клетки CD45RO<sup>+</sup> (человек)/CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> (мышь)) по сравнению с процентом клеток CD25<sup>+</sup>, выделенных в культурах с изотипическим контролем. Результаты представляют собой среднее значение и SEM

для 7 доноров (фиг. 9 А, человек) и 3 мышей (в 2 независимых экспериментах, фиг. 9 В). В культурах как человека, так и мышей неблокирующие TNFR2 антитела

индуцировали процент клеток памяти CD25<sup>+</sup>, в то время как блокирующие антитела не оказывали такого влияния на популяцию памяти. Как для культур человека (фиг. 9 А), так и для мышей (фиг. 9 В) добавление экзогенного TNF-α увеличить популяцию Т-клеток памяти CD25<sup>+</sup> \* = p < 0,05 как рассчитано с помощью однофакторного дисперсионного анализа.

На фиг. 10А показано, что блокирующие лиганд антагонистические антитела обладают наиболее выраженным противоопухолевым действием, как и mIgG2a, изотип, который преимущественно задействует активирующие Fc-рецепторы. Мышам Balb/c подкожно вводили 1 × 10<sup>6</sup> клеток СТ26. Через 8 дней при среднем размере опухоли 3х3 мм мышей дважды в неделю лечили 10 мг/кг антитела внутривенно, как показано на фигурах. Опухоли измеряли два раза в неделю, пока они не достигли диаметра 15 мм, после чего мышей умерщвляли. Верхняя фигура показывает рост опухоли у мышей, получавших изотипический контроль, затем две фигуры ниже, на левой панели, показывают лиганд-блокирующее антагонистическое антитело (средняя фигура) и неблокирующее лиганд агонистическое антитело (нижняя фигура), в дефектном формате FcγR Ig. На средней панели показаны те же антитела в формате мышиного IgG2a, действующие в первую очередь активирующие FcγR, а на правой панели - антитела в формате мышиного IgG1, действованные в основном с ингибирующим FcγRIIb. На фиг. 10В за выжившими мышами наблюдали в течение 70 дней. Как видно на фигурах, блокирующее антагонистическое антитело наиболее эффективно при лечении опухолей в формате IgG2a, в котором задействованы в первую очередь активирующие FcγR, и не оказывает никакого эффекта в дефектном формате связывания FcγR. С другой стороны, неблокирующее агонистическое антитело наиболее эффективно при лечении опухолей в формате IgG1, предпочтительно действуя ингибирующий FcγR. Кроме того, агонистическое антитело обладает внутренним, FcγR-независимым, противоопухолевым действием, как видно с использованием формата антитела N297A. \*\*\* = p < 0,001 по сравнению с изотипическим контролем, рассчитанным с помощью лог-рангового критерия Мантела-Кокса

На фиг. 11 показано, что лиганд-блокирующие антагонистические антитела эффективны в качестве противоопухолевого лечения в сочетании с анти-PD1. Мышам C57/BL6 подкожно вводили 1 × 10<sup>6</sup> клеток MC38. При среднем размере опухоли 3х3 мм мышей дважды в неделю лечили 10 мг/кг антитела внутривенно, как показано на фигурах. На фиг. показаны кривые роста опухоли у отдельных мышей. Фиг. 11 А: изотипический контроль, фиг. 11 В: нацеленное антитело к PD-1, фиг. 11 С: антитело 3-F10 (суррогатное антитело, лиганд блокатор, антагонист), фиг. 11 D: комбинация 3-F10 и PD1. Опухоли измеряли два раза в неделю, пока они не достигли диаметра 15 мм, после чего мышей умерщвляли. На фиг. 11Е показаны кривые выживаемости для четырех различных групп лечения, \* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001 по сравнению с изотипическим контролем, рассчитанным с помощью лог-рангового критерия Мантела-Кокса.

На фиг. 12 показано, что блокирующие антагонистические антитела, эффективны в качестве противоопухолевого лечения в сочетании с анти-PD-L1. Мышам C57/BL6 подкожно вводили 1 × 10<sup>6</sup> клеток MC38. При среднем размере опухоли 5х5 мм мышей дважды обрабатывали изотипическим контролем антитела или 3F10 (день 1 и 4), или четыре дня подряд анти-PD-L1 с последующей пятой инъекцией через два дня (всего

пять инъекций в день 1, 2, 3, 4 и 7), или их комбинацией. Все антитела вводили в дозе 10 мг/кг внутривенно. На фигуре показан средний рост опухоли  $\pm$  SEM,  $n = 10$ /группа.  $* = p < 0,05$ ,  $*** = p < 0,001$ , как рассчитано с использованием однофакторного дисперсионного анализа.

Фиг. 13. Мышам C57/BL6 подкожно вводили  $1 \times 10^6$  клеток B16.F10. Через 3 дня мышам дважды в неделю вводили 10 мг/кг антитела внутривенно, как показано на фигурах. Опухоли измеряли два раза в неделю, пока они не достигли диаметра 15 мм, после чего мышам умерщвляли. Фиг. 13 А: изотипический контроль, фиг. 13 В: антитело 3-F10 (суррогатное антитело, блокатор лиганда, антагонист). На фиг. 13 С показаны кривые выживаемости для двух различных групп лечения.  $* = p < 0,05$  по сравнению с изотипическим контролем, рассчитанным с помощью лог-рангового критерия Мантла-Кокса

На фиг. 14 показано, что лиганд-блокирующее антагонистическое суррогатное антитело 3F10 изменяет состав иммунных клеток в опухолях. Мышам инокулировали опухолевые клетки CT26, как описано, и вводили антитела, как указано, после того, как опухоли достигли размера приблизительно 7х7 мм после 3 инъекций на 8 день после начала лечения мышам умерщвляли и собирали опухоли. Суспензии единичных клеток опухоли анализировали на содержание иммунных клеток с помощью FACS. Фиг. 14 А: Блокирующее лиганд антагонистическое суррогатное антитело 3F10 вызывает истощение Treg, и фиг. 14 В: приток или рост  $CD8^+$  Т-клеток. Это вызывает сдвиг в соотношении  $CD8^+$ /Treg Т-клеток, как показано на фиг. 14 С. Фиг. 14 D показывает, что не только количество Т-клеток, но также количество миелоидных клеток, в данном случае связанных с опухолью макрофагов (ТАМ, определяемых как  $CD11b^+F4/80^+$  МНСII<sup>+</sup>, но отрицательных для обоих Ly6G и Ly6C) очень значительно уменьшено. Неблокирующее агонистическое суррогатное антитело 5A05 также модулирует числа ТАМ, но все же значительно отличается от блокирующего лиганд антитела 3F10.

На фиг. 15 показано, что Т-клетки в опухолях человека экспрессируют уровни TNFR2, аналогичные Т-клеткам, полученным из РВМС восстановленных мышей NOG. Вкратце, мышам NOG в/в вводили  $15-20 \times 10^6$  клеток РВМС. Через 10-12 дней у мышам удаляли селезенки, готовили суспензию единичных клеток и оценивали экспрессию TNFR2 с помощью FACS. Ранее экспрессию TNFR2 оценивали на Т-клетках, полученных из крови и образцов опухоли от 3 или 9 больных раком соответственно. Как показано на фигуре, экспрессия TNFR2 на Treg и  $CD8^+$  Т-клетки очень сопоставимы между Т-клетками человека, выращенными и активированными *in vivo* у мышам NOG, и Т-клетками из опухолей человека.

На фиг. 16 показано, что блокирующее лиганд антагонистическое антитело 1-H10 истощает Treg *in vivo* в зависимости от FcγR. Мышам NOG в/в вводили  $15-20 \times 10^6$  клеток РВМС. Через 10-12 дней у мышам удаляли селезенки, готовили суспензию единичных клеток и затем вводили внутривенно мышам SCID. ( $10-15 \times 10^6$ /мышь). Через 1 час мышам вводили 10 мг/кг антитела внутривенно, а через 24 часа после инъекции антитела у мышам собирали внутривенную жидкость и анализировали клетки в этой жидкости с помощью FACS. На фиг. 16А показан средний процент окрашенных Treg (определяемых как  $CD45^+CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{low/neg}$ ) в популяции  $CD45^+$  человека и показано, что Treg значительно истощены блокирующим антителом



1-Н10. Фиг. 16В показывает средний процент CD8<sup>+</sup> Т из CD45<sup>+</sup> человека и показывает, что 1-Н10 значительно увеличивает популяцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Фиг. 16С показывает, что соотношение CD8<sup>+</sup> Т-клеток к Treg значительно увеличивается на 1-Н10. Данные на фиг. 16 А-С представлены как среднее значение четырех различных экспериментов, где каждая точка представляет одну мышь. Ервой и коммерчески доступное анти-CD25 антитело применяли в качестве положительного контроля. Все данные нормализованы по изотипическому контролю, так что на фиг. 16 А и В для изотипического контроля установлено значение 100%, а на фиг. 16 С - 1. На фиг. 16D показан отдельный эксперимент, в котором применяли антитело 1-Н10 IgG1N297Q, дефектное по связыванию FcγR (обозначенное 1-Н10NQ на фигуре), для оценки зависимости связывания FcγR от истощения Treg-клеток. Как показано на фигуре, истощение наиболее эффективно в формате IgG1 дикого типа (1-Н10) по сравнению с дефектным Fc (1-Н10NQ).

На фиг. 17 показано, что неблокирующие лиганд TNFR2 антагонистические антитела не индуцируют высвобождение цитокинов *in vitro*. Высвобождение IFN-γ, индуцированное различными специфическими антителами к TNFR2, измеряли в трех различных системах *in vitro*. В качестве положительного контроля применяли анти-CD3 антитело = ОКТ3, анти-CD52 антитело = алектумаб и анти-CD28 антитело. Изотипический контроль применяли в качестве отрицательного контроля. Каждая точка представляет собой РВМС от одного донора-человека. На фиг. 17А показаны результаты для клеточных культур высокой плотности, когда РВМС культивировали при концентрации  $1 \times 10^7$  клеток/мл. Через 48 часов добавляли 10 мкг/мл антитела и инкубировали в течение 24 часов. Как видно на фигуре, и алектумаб, и ОКТ3 индуцировали значительное высвобождение IFN-γ, но не индуцировали какие-либо специфические антитела к TNFR2. На фиг. 17В показаны твердофазные культуры *in vitro*, полученные путем покрытия лунок 96-луночного планшета антителами перед добавлением РВМС. И снова, и алектумаб, и ОКТ3 индуцировали значительное высвобождение IFN-γ вместе с некоторыми специфическими антителами TNFR2. Однако полное блокирующее антитело 1-Н10 не индуцировало высвобождение цитокинов выше антитела изотипического контроля. На фиг. 17С показана стимуляция цельной крови антителом, и здесь алектумаб индуцировал значительное высвобождение IFN-γ, но не каких-либо специфических антител к TNFR2.

На фиг. 18 показано, что неблокирующие лиганд TNFR2 антагонистические антитела не индуцируют высвобождение цитокинов *in vivo*. Мышей NOG инъецировали в/в  $25 \times 10^6$  РВМС клеток. Через 14 дней, когда было показано, что кровь мышей состоит приблизительно из 40% Т-клеток человека, мышей обрабатывали 10 мкг антитела. Температуру тела измеряли через 1 час после инъекции (фиг. 18 А). Эксперимент был прекращен через 5 часов после инъекции, и кровь была проанализирована на содержание IFN-γ (фиг. 18 В) или TNF-α (фиг. 18 С). \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  и \*\* =  $p < 0,01$ , как рассчитано с помощью однофакторного дисперсионного анализа.

На фиг. 19 показано связывание с вариантами TNFR2, лишенными отдельных доменов. Связывание антител с вариантами TNFR2, экспрессируемыми на клетках НЕК, тестировали методом проточной цитометрии. Отсутствие доменов 1 и 2 существенно не влияет на связывание (фиг. 19 А и В), тогда как 3 и частично 4 полностью отменяют взаимодействие между антителом и TNFR2 (фиг. 19 С и D). Точно так же отсутствие домена 1+3 полностью предотвращает связывание всех антител (кроме 1F06) (фиг. 19 Е), в то время как отсутствие домена 2+4 полностью отменяет связывание агонистических антител (1F02, 1F06, 4E08) и значительно снижает связывание также с

антагонистами (1H10, 4H02, 5B08) (фиг. 19 F). Темно-серый указывает на положительный контроль и белые на отрицательные контрольные антитела.

На фиг. 20 показано сравнение аминокислотной последовательности домена 3 TNFR2 человека (H-D3) и мыши (M-D3). Сходные аминокислоты отмечены белым цветом, а различия - серым. Приведенные ниже пять последовательностей представляют 5 различных конструкций, против которых тестируются антитела. Обмены последовательностью от человека к мыши подчеркнуты, тогда как немеченная последовательность является полностью человеческой. Домены 1, 2 и 4 принадлежат человеку и не содержат замен или мутаций.

На фиг. 21 показано связывание с TNFR2 дикого типа человека и мыши (левая панель). Мутировавшие конструкции hTNFR2 (m1, m2, m3 и m4) использовали для сужения сайта связывания для различных анти-hTNFR2 антител. Анализ проточной цитометрии показал, что мутации в аминокислотах 119-132 не влияют на связывание антител, в то время как мутации в аминокислотах 151-160 полностью отменяют связывание всех антител. Мутации в 134-144 нарушают связывание только блокирующих и антагонистических антител, но не оказывают значительного влияния на агонистические антитела. Темно-серые полосы указывают на положительный контроль и белые на отрицательные контрольные антитела. Пунктирная линия указывает на уровень антитела отрицательного контроля.

#### Примеры

Далее описываются конкретные примеры, не имеющие ограничительного характера, которые содержат в себе определенные аспекты данного изобретения.

Во многих примерах, в частности в примерах *in vivo*, применялось антитело 3-F10. Это мышинное антитело, которое является суррогатным антителом к человеческим антителам, описываемым в данном документе. Оно было выбрано на основе его способности связывать мышинный TNFR2, блокирования связывание его мышинного лиганда TNF- $\alpha$  с TNFR2 и на основании его антагонистической активности в анализе активации мышинных Т-клеток, как описано в Примере 4. В некоторых примерах антитело 3-F10 тестировали и сравнивали в различных форматах антител, связанных с сильным и предпочтительным связыванием с активирующими, а не ингибирующими Fc-гамма-рецепторами (mIgG2a), сильным и предпочтительным связыванием с ингибирующим Fc $\gamma$ R мыши (mIgG1) или дефектным связыванием с Fc $\gamma$ R мыши (mIgG2a N297A).

В некоторых примерах применялось антитело 5-A05. Это мышинное суррогатное антитело к человеческому анти-TNFR2 неблокирующему агонистическому антителу, включенному в данный документ для справки и для сравнения. 5-A05 был выбран в качестве суррогата на основании его способности связывать мышинный TNFR2, отсутствия блокирующего действия на связывание мышинного лиганда TNF- $\alpha$  с TNFR2 и его агонистическую активность в анализе активации мышинных Т-клеток, как описано в Примере 4. В некоторых примерах антитело 5-A05 тестировали и сравнивали в различных форматах антител, связанных с сильным и предпочтительным связыванием с активирующими, а не с ингибирующими гамма-рецепторами (mIgG2a), сильным и предпочтительным связыванием с ингибирующим Fc $\gamma$ R мыши по сравнению с активирующим Fc $\gamma$ R (mIgG1) или дефектным связыванием с мышинным Fc $\gamma$  (N297A).

В некоторых примерах и на фигурах используется несколько иное название клонов антител, например, клон 001-H10 иногда сокращается до 1-H10 или 1H10, 005-B08 иногда сокращается до 5-B08 или 5B08 и т.д.

Пример 1. Получение антител, специфичных к TNFR2

(См. также фиг. 1 и приведенное выше описание данной фигуры.)

#### Выделение фрагментов scFv антител

Библиотека n-Coder<sup>®</sup> scFv (BioInvent; Söderlind E, et al. Nat Biotechnol. 2000; 18 (8):852-6) была использована для выделения фрагментов scFv антител, распознающих TNFR2 человека или мыши.

Библиотеку фагов использовали в трех последовательных пэннингах против рекомбинантного белка человека или мыши (Sino Biological). После инкубации фага клетки промывали для удаления не связавшихся фагов. Связывающие фаги элюировали трипсином и амплифицировали в E.coli. Полученный исходный раствор фага конвертировали в формат scFv. E.coli трансформировалась с плазмидами, несущими scFv, и были экспрессированы отдельные клоны scFv.

#### Идентификация уникального TNFR2 связывающего scFv

Конвертированные scFv из третьего пэннинга анализировали с применением гомогенного анализа FMAT (Applied Biosystems, Карлсбад, Калифорния, США) для связывания с клетками 293 FT, трансфицированными для экспрессии TNFR2 человека или мыши или неродственного белка.

Вкратце, трансфицированные клетки добавляли в планшеты с прозрачным дном вместе с scFv-содержащим супернатантом из экспрессионных планшетов (разведенные 1:7), мышинное анти-His Tag антитело (0,4 мкг/мл; R&D Systems) и APC-конъюгированные козы антимышинные антитела (0,2 мкг / мл; кат. номер 115-136-146, Jackson Immunoresearch). Планшеты FMAT инкубировали при комнатной температуре в течение 9 ч перед считыванием. Бактериальные клоны, связывающие клетки, трансфицированные TNFR2, но не клетки, трансфицированные неродственным белком, классифицировали как активные и выборочно собирали в 96-луночный планшет.

#### Связывание IgG с TNFR2 в ELISA

96-луночные планшеты (планшет Lumitrac 600 LIA, Greiner) покрывали в течение ночи при 4°C с рекомбинантным белком TNFR2-Fc человека или мыши (Sino Biological) в концентрации 1 пмоль/луночку. После промывки титрованным дозам анти-TNFR2 мАт от 20 мкг/мл до 0,1 нг/мл (от 133 нМ до 1 пМ) давали возможность связываться в течение 1 часа. Затем планшеты снова промывали, и связанные антитела выявляли вторичным анти-человеческим-F(ab)-HRP антителом (Jackson ImmunoResearch), разведенным в 50 нг/мл. В качестве субстрата применяли Super Signal ELISA Pico (Thermo Scientific), и планшеты анализировали с применением ридера Tecan Ultra Microplate.

Данные, которые представлены в таблице 6 и на фиг. 1 A-D, показывают, что все анти-TNFR2 антитела человека связываются с белком TNFR2 человека. Значения EC<sub>50</sub> находятся в диапазоне от 0,082 нМ для 1-C08 до 4,4 нМ для 1-A09.

Кроме того, суррогатные клоны мышинных антител 3-F10 и 5-A05 также связываются с белком mTNFR2. Эти два клона связываются с очень похожей аффинностью (таблица 6 и фиг. 1E).

Таблица 6. Значения EC<sub>50</sub> связывания антител с белком TNFR2 (человеческий белок, за исключением клона 3F10 и 5A05)

Клон	EC <sub>50</sub> (нМ)
1-C08	0,082
1-E06	0,20
1-G10	0,29
1-H10	0,29
4-H02	0,20
5-B02	0,15

5-B08	0,17
1-G04	1,7
1-H09	0,30
1-D01	0,37
5-F10	0,22
1-B11	0,25
1-C07	0,26
1-B05	0,23
1-F02	0,31
1-F06	0,15
4-E08	0,38
1-G05	0,54
1-A09	4,4
1-B09	0,18
1-C03	0,75
1-C05	0,38
3-F10 (мышь)	0,97
5-A05 (мышь)	1,4

### Пример 2. Специфичность антител

(См. также фиг. 2-5 и приведенное выше описание данных фигур.)

#### Выделение CD4<sup>+</sup> Т-клеток

PBMC из лейкоцитарной пленки человека и цельной крови яванского макака (*M. fascicularis*) были выделены с использованием градиентов Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). CD4<sup>+</sup> Т-клетки выделяли из PBMC с помощью магнитной сортировки клеток с применением набора для выделения CD4<sup>+</sup> Т-клеток (человека) или CD4 MicroBeads, приматов, отличных от человека (яванский макак), оба из Miltenyi. CD4<sup>+</sup> Т-клетки мыши выделяли из селезенки с применением набора для выделения CD4<sup>+</sup> Т-клеток (мыши) от Miltenyi.

#### Титрование TNFR2-специфических антител n-CoDeR®

Способность и аффинность антител TNFR2 n-CoDeR® связывать TNFR2, экспрессированный на клетках, были получены с применением *in vitro* активированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Человеческого CD4<sup>+</sup> Т-клетки стимулируют 50 нг/мл чрИЛ-2 (R & D Systems) и Dynabeads® Т-Активатор CD3 / CD28, для Т-клеточной активации и расширения (Gibco), через 2-3 дня при 37 °С. Клетки, активированные *in vitro*, метили возрастающим количеством антител n-CoDeR®, специфичных к TNFR2 или изотипическому контролю, в диапазоне 0,002-267 нМ. Затем клетки инкубировали со вторичным антителом а-человеческого IgG, конъюгированным с APC (Jackson), с последующим анализом проточной цитометрией (FACSVerse, BD). Полученные кривые титрования показаны на фиг. 2 А-D. CD4<sup>+</sup> Т-клетки мыши стимулировали 135 ед/мл gmIL-2 (R&D systems) и Dynabeads® Т-активатором CD3/CD28 для увеличения и активации Т-клеток (Gibco) 2-3 дня при 37 °С. Активированные *in vitro* клетки метили возрастающим количеством антител n-CoDeR®, специфичных к TNFR2 или изотипическому контролю, в диапазоне от 0,00003-133 нМ. Затем клетки инкубировали со вторичным антителом а-мышинного IgG, конъюгированным с APC (Jackson), с последующим анализом проточной цитометрией (FACSVerse, BD). Кривые титрования показаны на фиг. 2Е. Значения EC50 для кривых титрования были рассчитаны в Microsoft Excel и показаны в таблице 7. Для человеческих антител значения EC50 различались от 0,6 нМ (4-H02) до 52,7 нМ (1-CO3). Антитела мыши связывались с активированными *in vitro* клетками

со сходной аффинностью (0,072 нМ (3-F10) и 0,11 нМ (5-A05)).

#### Специфичность антител TNFR2 n-CoDeR®

Специфичность TNFR2-антител к TNFR2 была получена в экспериментах по блокированию FACS с коммерческими поликлональными антителами TNFR2 (R&D

systems). CD4<sup>+</sup> Т-клетки (мыши и человека), стимулированные 2-3 дня с помощью 50 нг/мл rhIL-2 (R&D systems) (человек)/135 ед/мл rm IL-2 (R&D systems) (мышь) и Dynabeads® Т-активатором CD3/CD28 для увеличения и активации Т-клеток (Gibco), блокировали 40 мкг/мл поликлональным антителом TNFR2 (системы R&D) в течение 30 минут с последующей 15-минутной инкубацией с антителами TNFR2 n-CoDeR® или изотипическим контролем. Концентрация используемых антител n-CoDeR® была основана на кривых титрования для отдельных антител n-CoDeR® TNFR2, и была выбрана субоптимальная концентрация для каждого антитела. Затем клетки промывали и инкубировали 30 мин со вторичным антителом, конъюгированным с АПК (Jackson). Клетки анализировали проточной цитометрией (FACSVerse, BD). Все связывание специфичных к TNFR2 антител n-CoDeR® (как человеческих, так и мышиных) может быть блокировано поликлональным антителом против TNFR2, как показано на фиг. 3. Эти результаты подтверждают, что антитела TNFR2 n-CoDeR® специфически связывают TNFR2 на CD4<sup>+</sup> Т-клетках, активированных *in vitro*.

Картирование эпитопа TNFR2-специфичных антител n-CoDeR® против клона MR2-1 антитела TNFR2

Клон MR2-1 антитела TNFR2 (Invitrogen) связывает специфический домен белка TNFR2. Если специфические TNFR2 антитела n-CoDeR® связаны с тем же доменом, что и MR2-1, их проверяли с помощью экспериментов по блокированию FACS.

CD4<sup>+</sup> Т-клетки человека стимулировали 2-3 дня с помощью 50 нг/мл rhIL-2 (R&D systems) и Dynabeads® Т-активатором CD3/CD28 для расширения и активации Т-клеток (Gibco). Активированные клетки блокировали 40 мкг/мл MR2-1 (черные столбцы на фиг. 5 А) или PBS (серые столбцы на фиг. 5). Через 30 мин инкубации клетки были немедленно окрашены на TNFR2-специфическое антитело n-CoDeR® или поликлональное TNFR2 (pTNFR2) в течение 15 мин. После инкубации со вторичным реагентом против человеческого IgG, конъюгированным с APC (Jackson), клетки анализировали с помощью проточной цитометрии (FACSVerse, BD). На фиг. 5В активированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки блокировали 40 мкг/мл TNFR2-специфических антител n-CoDeR® или pTNFR2 (черные столбцы) или оставляли в PBS (серая полоса), а затем инкубировали 15 мин с PE-конъюгированными антителами MR2-1. Снова клетки анализировали с помощью FACS.

Поскольку процент клеток MR2-1<sup>+</sup> был таким же, как для блокированных n-CoDeR®, так и для неблокированных клеток (фиг. 5В), и связывание антител n-CoDeR® было таким же с блокатором MR2-1 или без него (фиг. 5А), эти данные демонстрируют что антитела n-CoDeR® связывают другие эпитопы белка TNFR2, чем антитело MR2-1.

#### Связывание антител TNFR2 n-CoDeR® с яванским макаком

Для подтверждения перекрестной реактивности антител TNFR2 к яванскому макаку, Т-клетки CD4<sup>+</sup> яванского макака стимулировали 2 дня с 50 нг/мл PMA (Sigma) и 100 нг/мл иономицина (Sigma) чтобы вызвать активацию TNFR2. Клетки инкубировали со специфическими к TNFR2 антителами n-CoDeR® в 3 различных концентрациях (0,1, 1 и 10 мкг/мл), а затем инкубировали с реактивом вторичного а-человеческого IgG, конъюгированного с АПК (Jackson). Клетки были проанализированы с помощью проточной цитометрии (FACSVerse, BD), и результат показал, что большинство антител

n-CoDeR®, специфичных к TNFR2 человека, могли связывать TNFR2 яванского макака, результаты для отдельных антител представлены на фиг. 4.

Таким образом, данные в Примере 2 показывают, что антитела человека специфически связываются с TNFR2 эндогенно экспрессируемого на иммунных клетках человека. Кроме того, данные показывают, что это связывание можно заблокировать путем добавления поликлонального коммерчески доступного антитела против TNFR2, что указывает на очень высокую специфичность к TNFR2. То же верно и для суррогатных клонов 3F10 и 5A05 в отношении мышинных клеток, экспрессирующих мышинный TNFR2. Кроме того, связывание человеческих клонов не зависит от антител MR2-1, проявляющих другую эпитопную специфичность по сравнению с MR2-1.

Таблица 7. Значения EC<sub>50</sub>, рассчитанные при титровании антител, специфичных к TNFR2, к активированным *in vitro* CD4<sup>+</sup> Т-клеткам.

Клон	EC <sub>50</sub> (нМ)
1-C08	2,6
1-E06	4,1
1-G10	3,3
1-H10	1,1
4-H02	0,59
5-B02	0,80
5-B08	1,2
1-G04	18
1-H09	16
1-D01	3,9
5-F10	32
1-B11	27
1-C07	36
1-B05	1,5
1-F02	0,79
1-F06	2,5
4-E08	2,3
1-G05	0,66
1-A09	48
1-B09	29
1-C03	53
1-C05	12
3-F10 (мышь)	0,072
5-A05 (мышь)	0,11

Пример 3. Проверка характеристик блокирования лиганда  
(См. также фиг. 6-7 и приведенное выше описание этих фигур.)

Метод ELISA

96-луночные планшеты были покрыты hTNFR2 (Синобиологический кат. No. 10414-N08H) или mTNFR2 (Синобиологический кат. No. 50128 M08H) в концентрации 2,5 пмоль/лунка в буфере для покрытия ELISA (0,1 М карбонат натрия, pH 9,5) и инкубировали в течение ночи при 4°C. После промывки в промывочном буфере для ELISA (PBS с 0,05% Tween20) планшеты инкубировали при медленном перемешивании в течение 1 ч при комнатной температуре с моноклональными антителами n-CoDeR® в концентрации 10 мкг/мл (однодозовый ELISA) или 33 нМ, а затем 1:2 разведения (титрование ELISA) в блокирующем буфере, содержащем 0,45% рыбьего желатина. Впоследствии рекомбинантный hTNF-α-bio (R&D, кат. № BT210) или mTNF-α (Gibco кат. No. PMC3014) добавляли в конечной концентрации 5 нМ и 2 нМ соответственно и оставляли для

инкубирования еще 15 мин. После этого планшеты были промыты. Для анализа ELISA человека использовали стрептавидин-HRP (Jackson кат. № 016-030-084), разведенный 1:2000 в блокирующем буфере, и снова инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с последующими промываниями сначала в буфере для ELISA, а затем в трис-буфере (pH 9,8). Субстрат (Super Signal ELISA Pico от Thermo Scientific кат. No. 37069) был затем разбавлен в соответствии с инструкциями производителя, добавлены в лунки и инкубированы в темноте в течение 10 минут перед считыванием на Tecan Ultra. Для анализа ELISA мыши использовали кроличьи анти-mTNF- $\alpha$  (синобиологический кат. № 50349-RP02), разведенные до 1 мкг/мл, и оставляли инкубироваться в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывания добавляли анти-кроличий-HRP, разведенный 1:10 000 в блокирующем буфере, и снова инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Добавление субстрата и считывание выполняли, как указано выше.

Данные представлены ниже в таблицах 8 и 9, а также на фиг. 6 и 7.

Таблица 8. Значения EC50 человеческих антител, блокирующих лиганд: Антитела титровали и рассчитывали значения EC50

Клон	EC50 (нМ)	Блокирование
001-H10	0,9	Полное
004-H02	0,4	Полное
005-B08	0,3	Полное
005-B02	0,2	Полное
001-E06	0,3	Частичное
001-G10	1,6	Частичное
001-C08	1,1	Частичное
001-H09	1,4	Частичное
005-F10	0,03	Частичное
001-G04	3,2	Частичное
001-B11	1,0	Слабое
001-C07	0,8	Слабое
001-D01	1,4	Слабое

Таблица 9. Значения EC50 мышинных антител, блокирующих лиганд: Антитела титровали и рассчитывали значения EC50

Клон	EC50 (нМ)	Блокирование
3-F10	1,9	Полное
4-C01	2,7	Полное
4-A06	2,0	Частичное
4-A07	>500	Частичное
4-F06	6,2	Частичное
5-C09	8,6	Частичное
2-D09	4,4	Частичное
4-B12	>500	Частичное
3-G06	13	Частичное
2-H01	25	Слабое
4-C02	>500	Слабое
4-G09	2,6	Слабое
4-C03	8,3	Слабое

Определения блокаторов

- Полные блокаторы определяются как снижающие связывание TNF- $\alpha$  на более чем 98%
- Частичные блокаторы определяются как снижающие связывание TNF- $\alpha$  на 60-98%

- Слабые блокаторы определяются как снижающие связывание TNF- $\alpha$  на менее чем 60%

- Неблокирующие антитела определяются как не достигающие блокирования на более чем 50% в высокодозном однократном анализе ELISA, как показано на фиг. 6А и 7А.

Данные, представленные в данном примере, показывают, что были получены различные антитела, начиная с антител, которые полностью ингибируют лиганд TNF- $\alpha$  от связывания с антителами, которые вообще не ингибируют блокирование лиганда. Это верно, как для антител человека, так и для суррогатов мыши.

Пример 4. In vitro функциональность антител

(См. также фиг. 8-9 и приведенное выше описание этих фигур.)

Способность антител TNFR2 регулировать продукцию IFN- $\gamma$  НК-клетками, стимулированную цитокинами

Агонистические/антагонистические характеристики антител, специфичных к TNFR2, оценивали с применением анализа НК-клеток, описанного Almishri et al. (TNF $\alpha$  Augments Cytokine-Induced NK Cell IFN $\gamma$  Production through TNFR2. Almishri W. et al. J Innate Immun. 2016;8:617-629).

Вкратце, НК-клетки человека выделяли из PBMC человека с помощью MACS с применением «набора для выделения НК» (Miltenyi). 100 мкл НК-клеток ( $1 \times 10^6$  клеток/мл) культивировали с 20 нг/мл rhIL-2 (R&D systems) и 20 нг/мл rhIL-12 (R&D systems) вместе с 10 мкг/мл TNFR2-специфичных антител, 10 мкг/мл изотипического контроля или 100 нг/мл TNF- $\alpha$  (R&D systems) в планшетах с U-образным дном (96-луночные микропланшеты Corning®, обработанные TC, Sigma-Aldrich). Супернатанты собирали через 24 часа, и количество продуцируемого IFN- $\gamma$  оценивали с помощью MSD.

В качестве контроля анти-TNF- $\alpha$  антитела, нейтрализующие TNF- $\alpha$  (кат. № AF-210-NA, R&D systems). Как видно на фиг. 8D, доза 1 мкг/мл полностью нейтрализовала растворимый TNF- $\alpha$  и эта доза также снизила высвобождение IFN- $\gamma$ .

Неблокирующие TNFR2-антитела человека заметно усиливали выработку IFN- $\gamma$  стимулированными IL-2 и IL-12 НК-клетками (в 2-3 раза больше IFN- $\gamma$ , чем изотипический контроль), в то время как антагонистические антитела (здесь показаны с помощью полных блокаторов) проявляли антагонистические эффекты на НК-клетки и уменьшили выработку IFN- $\gamma$  (фиг. 8А).

Этот тест считался нерепрезентативным для проведения с суррогатными антителами мыши из-за отсутствия эндогенно вырабатываемого TNF- $\alpha$  в мышинных культурах, а также экспрессию ингибирующего Fc $\gamma$ R на мышинных НК-клетках, в то время как только активирующий Fc $\gamma$ R экспрессировался на человеческом аналоге. Вместо этого был использован анализ активации Т-клеток памяти (индукция CD25), как описано ниже, для изучения агонистических или антагонистических свойств суррогатных антител мыши.

Индукция CD25 экспрессирующих CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти антителами к TNFR2

Для дальнейшего понимания агонистических/антагонистических характеристик антител TNFR2 была оценена их способность увеличивать долю CD25 экспрессирующих Т-клетки памяти CD4<sup>+</sup>.

Вкратце, CD4<sup>+</sup> Т-клетки человека выделяли из PBMC с помощью MACS с использованием «набора для выделения CD4<sup>+</sup> Т-клеток» от Miltenyi. CD4 культивировали с 10 нг/мл rhIL-2 (R&D systems) и 10 мкг/мл специфических антител к TNFR2 или с указанным количеством rhTNF- $\alpha$  (R&D systems). Через 3 дня экспрессию CD25 на клетках



памяти (CD45RO<sup>+</sup> клетки) анализировали с помощью FACS (фиг. 9А).

Аналогичным образом CD4<sup>+</sup> Т-клетки мыши были выделены из селезенки с помощью MACS с применением «набора для выделения CD4<sup>+</sup> Т-клеток» (Miltenyi) и культивированы с 10 нг/мл rmIL-2 (R&D systems) и 10 мкг/мл антитела, специфичного к TNFR2, или по указанному количеству rmTNF- $\alpha$  (Системы НИОКР). Экспрессию CD25 на клетках памяти (CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> клетки) анализировали с помощью FACS через 3 дня (фиг. 9В).

Процент клеток, экспрессирующих CD25, увеличивался в культурах клеток памяти, стимулированных неблокирующим TNFR2, как у человека, так и у мыши. Однако стимуляция блокирующими антителами не увеличивала экспрессию CD25 в этих культурах, но скорее уменьшила ее.

Таким образом, данные в Примере 4 показывают, что блокирующие лиганд антитела, являются антагонистическими, как измерено несколькими способами *in vitro*: ингибирование опосредованного NK-клетками высвобождения IFN- $\gamma$  и активация клеток памяти CD4<sup>+</sup>, измеренное по экспрессии CD25. В соответствии с изобретением показаны блокирующие лиганд антагонистические антитела, тогда как неблокирующие лиганд агонистические антитела включены для сравнения.

Пример 5. Суррогатное блокирующее лиганд антагонистическое анти-мышинное TNFR2 мАт имеет противоопухолевый эффект *in vivo*

(См. также фиг. 10-16 и приведенное выше описание этих фигур.)

Терапевтический эффект на разных моделях опухолей

Чтобы оценить *in vivo* противоопухолевый эффект блокирующих лиганд антагонистических моноклональных анти-TNFR2 антител, суррогат мыши, названный 3F10, был исследован *in vivo* на различных моделях опухолей с применением различных форматов изотипов и отдельно или в комбинации с анти-PD-1, как описано ниже.

Мышей разводили и содержали на местных объектах в соответствии с рекомендациями домашнего офиса. Шести-восьминедельные самки BalbC и C57/BL6 мышей были предоставлены Taconic (Bomholt, Дания) и содержались в местных помещениях для животных. Клетки CT26, MC38 и B16.F10 клетки (ATCC) выращивали в забуференной глутамаксом среде RPMI с добавлением 10% FCS. Когда клетки были полуконфлюэнтными, их отделяли трипсином и ресуспендировали в стерильном PBS при  $10 \times 10^6$  клеток/мл. Мышам п/к инъецировали 100 мкл клеточной суспензии, что соответствует  $1 \times 10^6$  клеток/мышь. Через 3-8 дней после инъекции, в зависимости от модели, мышей дважды в неделю обрабатывали 10 мг/кг антитела внутрибрюшинно (изотипический контроль, 3-F10 или 5-A05) и как показано на фигурах. Опухоли измеряли два раза в неделю, пока они не достигли диаметра 15 мм, после чего мышей умерщвляли.

Блокирующие лиганд антагонистические анти-мышинные TNFR2 мАт 3-F10 проявляют терапевтический противоопухолевый эффект на трех различных моделях опухолей (фиг. 10-13) с лечебным эффектом в более чувствительном к лечению CT26 (фиг. 10) и эффектом ингибирования роста опухоли у более устойчивых к лечению MC38 и B16 (фиг. 11-13).

Противоопухолевый эффект блокирующих лиганд, антагонистических анти-мышинных TNFR2 мАт является Fc:Fc $\gamma$ R-зависимым

Чтобы оценить важность взаимодействия Fc-Fc $\gamma$ R на противоопухолевый эффект *in vivo* блокирующего лиганд антагонистического анти-TNFR2 мышинного суррогатного мАт, различные форматы Fc этого антитела исследовали *in vivo* на модели опухоли

СТ26, как описано ниже.

Мышей разводили и содержали, как описано выше. Клетки СТ26 (ATCC) выращивали и инъецировали, как описано выше. Когда опухоли достигли 3х3 мм, мышам дважды в неделю вводили 10 мг/кг антитела внутрибрюшинно (изотипический контроль, 3-F10 IgG1, 3-F10 IgG2a или 3-F10-N297A (дефектный Fc). Опухоли измеряли два раза в неделю, пока они не достигли диаметра 15 мм, после чего мышей умерщвляли.

Fc-дефектный 3-F10-N297A демонстрирует минимальную терапевтическую активность или ее отсутствие по сравнению с изотипическим контролем, что указывает на то, что вовлечение Fc имеет решающее значение для терапевтической эффективности этого блокирующего лиганд антагонистического анти-мышинного TNFR2 мАт (фиг. 10 А и В). Оба формата IgG1 и IgG2a демонстрируют значительную терапевтическую эффективность. Однако формат IgG2a, предпочтительно связывающийся с активирующими Fcγ-рецепторами, демонстрирует превосходный терапевтический эффект, свидетельствующий об истощении/фагоцитозе Treg-клеток, что является одним из важных механизмов действия этого блокирующего лиганд антагонистического анти-мышинного TNFR2 мАт (фиг. 10 А-В). Это контрастирует с неблокирующим агонистическим суррогатным антителом 5A05, которое проявляет некоторую активность в дефектном Fc-формате и проявляет лучшую активность в формате мышинного IgG1, о котором известно, что оно предпочтительно связывает ингибирующий FcγR. Блокирующее лиганд антагонистическое антитело (3F10), соответствует данному изобретению, и неблокирующее лиганд агонистическое антитело (5A05) включено в качестве эталона.

Комбинированный эффект с анти-PD-1 мАт

Чтобы оценить комбинированный *in vivo* противоопухолевый эффект блокирующих лиганд антагонистических анти-TNFR2 суррогатных мышинных мАт (3-F10) с анти-PD-1, комбинацию лечения исследовали *in vivo* на модели опухоли MC38, как описано ниже.

Мышей разводили и содержали, как описано выше. Клетки MC38 (ATCC) выращивали и инъецировали, как описано выше. Через восемь дней после инъекции мышей дважды в неделю обрабатывали 10 мг/кг антитела внутрибрюшинно (изотипический контроль, антимышинный PD-1, 3-F10 или комбинация антимышинного PD-1 и 3-F10), как показано на фиг. 11 А-Е. Опухоли измеряли два раза в неделю, пока они не достигли диаметра 15 мм, после чего мышей умерщвляли.

Оба анти-мышинное PD-1 и лиганд-блокирующее антагонистическое анти-мышинное TNFR2 мАт 3-F10 демонстрируют терапевтический эффект ингибирования роста опухоли в модели MC38 (фиг. 11 А-Е). Когда анти-PD1 и антагонистическое анти-мышинное TNFR2 мАт 3-F10 комбинируются, опухоли излечиваются в устойчивом к лечению MC38 (фиг. 11 D-E).

Комбинированный эффект с анти-PD-L1 мАт

Чтобы оценить комбинированный противоопухолевый эффект *in vivo* блокирующих лиганд антагонистических анти-TNFR2 мАт, мы дополнительно объединили мышинный суррогат (3F10) с анти-PD-L1 для лечения на модели опухоли MC38, как описано ниже.

Мышей разводили и содержали, как описано выше. Клетки MC38 (полученные от доктора М. Крэгга, Саутгемптонский университет) выращивали и вводили, как описано выше. Через шесть дней после инъекции, мышей дважды обрабатывали изотипическим контролем антитела или 3F10 (день 1 и 4), или четыре дня подряд анти-PD-L1 (клон 10F9G2, Bioxcell) с последующей пятой инъекцией через два дня (всего пять инъекций на 1, 2, 3, 4 и 7 день) или их комбинацией. Все антитела вводили в дозе 10 мг/кг внутрибрюшинно. Опухоли измеряли штангенциркулем дважды в неделю до тех пор,

пока они не достигли объема 2000 мм<sup>3</sup>, после чего мышей умерщвляли.

Оба анти-мышиное PD-L1 и блокирующее лиганд антагонистическое анти-мышиное TNFR2 мАт 3-F10 демонстрируют терапевтический эффект ингибирования роста опухоли в модели MC38 (фиг. 12). Когда объединяют анти-PD-L1 и антагонистическое анти-мышиную TNFR2 мАт 3-F10, противоопухолевый эффект еще больше усиливается (фиг. 12).

#### Модуляция иммунных клеток *in vivo*

Чтобы исследовать влияние иммунных клеток на опухоль *in vivo*, мышей BalbC инокулировали клетками CT26, как описано выше. После того, как опухоли достигли примерно 7х7 мм, мышей обрабатывали антителами в дозе 10 мг/кг, вводимыми внутрибрюшинно, как показано на фигурах. Мышей обрабатывали на 1, 4 и 7 день и прекращали на 8 день. Опухоли иссекали, механически разделяли на мелкие кусочки и расщепляли с использованием смеси коллагеназы 100 мкг/мл либеразы и 100 мкг/мл ДНКазы при 37°C в течение 2х5 минут с Vortex между ними. После фильтрации через фильтр 70 мкм, клеточную суспензию промывали (400 г в течение 10 мин) ФСБ, содержащим 10% FBS. После этого клетки ресуспендировали в буфере MACS и окрашивали панелью антител, окрашивающей CD45, CD3, CD8, CD4 и CD25 или панель окрашивания антител МНСII, F4/80, Ly6C, CD11b и Ly6G. Перед окрашиванием клетки блокировали для неспецифического связывания с применением 100 г/мл очищенных иммуноглобулинов для внутривенного введения (IVIG, intravenous immunoglobulin). Клетки анализировали в FACS Verse. Мышиные Treg-клетки были количественно определены как CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, а ТАМ как CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>-</sup>F4/80<sup>+</sup>МНСII<sup>+</sup>. Результаты показаны на фиг. 14.

Как видно на фиг. 14, лечение блокирующим лиганд/антагонистическим антителом TNFR2 приводит к истощению Treg-клеток в опухоли. Также наблюдается более слабая тенденция к увеличению притока CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Совместно это приводит к значительному улучшению соотношения CD8<sup>+</sup> Т-клеток к Treg-клеток (фиг. 14 C). Кроме того, антагонистическое антитело модулирует миелоидный компартмент, уменьшая количество связанных с опухолью макрофагов (фиг. 14 D).

#### Модель PBMC-NOG/SCID

Чтобы подтвердить данные *in vivo* об истощающей активности блокирующего лиганд антагонистического суррогатного анти-мышиного мАт TNFR2, мы проанализировали истощающую способность блокирующего лиганд антагонистического мАт против человека TNFR2 1-H10 в модели PBMC-NOG/SCID *in vivo*, как описано ниже.

Мышей разводили и содержали на местных объектах в соответствии с рекомендациями домашнего офиса. Восьминедельных самок мышей SCID и NOG поставляла компания Taconic (Bomholt, Дания) и содержала в местных помещениях для животных. Для модели PBMC-NOG/SCID (первичный ксенотрансплантат человека) PBMC человека выделяли с применением Ficoll Paque PLUS и после промывки клетки ресуспендировали в стерильном PBS при  $75 \times 10^6$  клеток/мл. Мышам NOG в/в вводили 200 мкл клеточной суспензии, что соответствует  $15 \times 10^6$  клеток/мышь. Через 2 недели после инъекции селезенки выделяли и превращали в суспензию отдельных клеток. После этого был взят небольшой образец для определения экспрессии TNFR2 на Т-клетках человека с помощью FACS (фиг. 15). Эти FACS показали, что экспрессия TNFR2 на Treg и CD8<sup>+</sup> Т-клетках очень сопоставимы между Т-клетками человека, выращенными и активированными *in vivo* у мышей NOG, и Т-клетками из опухолей человека.

Большинство клеток ресуспендировали в стерильном PBS в концентрации  $50 \times 10^6$  клеток/мл. Мышам SCID в/б вводили 200 мкл суспензии, что соответствует  $10 \times 10^6$  клеток/мышь. Через 1 час мышей обрабатывали 10 мг/кг либо Ервой, анти-CD25, 1-Н10, 1-Н10-N297Q (1-Н10 дефектная версия Fc) или мАт изотипического контроля. Внутривенную жидкость мышей собирали через 24 часа. Подмножества Т-клеток человека были идентифицированы и количественно определены с помощью FACS с применением следующих маркеров: CD45, CD3, CD4, CD8, CD25, CD127 (все от BD Biosciences).

Активность истощения Treg 1-Н10 превосходит Ервой и 1-Н10N297Q (фиг. 16), подтверждая, что блокирующее лиганд антагонистическое анти-TNFR2 мАт 1-Н10 истощает Treg и что Fc-взаимодействие участвует в этом истощении (фиг. 16 D).

Таким образом, пример 5 показывает, что:

1. Блокирующие лиганд антагонистические антитела могут оказывать сильное противоопухолевое действие на нескольких моделях опухолей.

2. Этот эффект можно усилить за счет комбинации с анти-PD1 антителами.

3. Эффект зависит от охватывания активирующих FcγR.

4. Лечение блокирующим лиганд антагонистическим суррогатным антителом значительно изменяет состав Т-клеток в опухолях с повышенным соотношением CD8<sup>+</sup> Т-клетки/Treg-клетки и уменьшением количества связанных с опухолью макрофагов.

5. В опухолях человека клетками, экспрессирующими TNFR2 в наивысшей степени, являются Treg-клетки.

6. В модели ксенотрансплантата человека, где экспрессия TNFR2 опухолью имитируется на Т-клетках, человеческие Treg-клетки делятся, а уровни CD8<sup>+</sup> Т-клеток увеличиваются.

7. Эта дилемма Treg наиболее выражена, если антитело может охватываться активирующими FcγR.

Пример 6. Блокирующие лиганд антагонистические антитела не индуцируют большие количества провоспалительных цитокинов

(См. также фиг. 17-18 и приведенное выше описание этих фигур.)

Высвобождение большого количества провоспалительных цитокинов является одним из возможных побочных эффектов иммуномодулирующих антител, применяемых для лечения пациентов. Следовательно, в данном документе мы измеряли высвобождение цитокинов, индуцированное блокирующими лиганд антагонистическими антителами, применяя два разных способа. Первый основан на стимуляции антителами в культурах *in vitro*, а второй основан на ксенотрансплантации иммунных клеток человека иммунодефицитным мышам. Было показано, что для *in vitro* создание культуры в значительной степени влияет на высвобождение цитокинов (Vessillier et al., J Immunol Methods. 2015 Sep; 424: 43–52). Чтобы учесть различия в методологиях, в соответствии с последними публикациями были применены три различных установки культивирования *in vitro*.

Для анализа высвобождения цитокинов (CRA) на культуре клеток высокой плотности (HDC) PBMC культивировали с концентрацией  $1 \times 10^7$  клеток/мл в бессывороточной среде CTL-Test (Cell Technology Limited) с добавлением 2 mM глутамин, 1 mM пирувата, 100 ME/мл пенициллина и стрептомицина. 2 мл клеточной культуры помещали в 12-луночный планшет. Через 48 часов 10 мкг/мл антитела добавляли к  $1 \times 10^5$  предварительно инкубированных PBMC в 96-луночном планшете с плоским дном и

инкубировали в течение 24 часов.

CRA PBMC твердой фазы (SP) выполняли путем покрытия лунок 96-луночного планшета 1 мкг/мл антитела в течение 1 часа. После промывания планшета PBS добавляли  $1 \times 10^5$  PBMC в 200 мкл полной среды на лунку и инкубировали в течение 48 часов.

Высвобождение цитокинов также измеряли после стимуляции 200 мкл цельной крови 5 мкг/мл антитела в течение 48 часов.

В конце периода инкубации планшеты центрифугировали, супернатант культуры отбирали и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Концентрации IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-8 и TNF- $\alpha$  были измерены с применением изготовленных на заказ планшетов MSD в соответствии с инструкциями производителя (Meso Scale Discovery, США).

Таким образом, блокирующее антагонистическое антитело не вызывало какого-либо значительного высвобождения цитокинов в любых условиях *in vitro*. Антитела положительного контроля, алемтузумаб и ОКТЗ действительно индуцировали цитокины, наиболее выраженным из всех был IFN- $\gamma$ , но, как видно на фиг. 17, антитело 1H10 не индуцировало IFN- $\gamma$  сверх антитела изотипического контроля. Ни один другой цитокин не был повышен 1H10 (данные не показаны).

#### Модель переносимости PBMC-NOG

Чтобы исследовать переносимость блокирующего лиганд антагонистического мАт 1-H10 против TNFR2 человека, мы проанализировали высвобождение цитокинов *in vivo* в модели PBMC-NOG, как описано ниже.

Мышей разводили и содержали на местных объектах в соответствии с рекомендациями домашнего офиса. Восьминедельных самок мышей NOG поставляла компания Taconic (Bomholt, Дания) и содержала в местных помещениях для животных. Для модели PBMC-NOG (первичный ксенотрансплантат человека) PBMC человека выделяли с применением Ficoll Paque PLUS и после промывки клетки ресуспендировали в стерильном PBS при  $125 \times 10^6$  клеток/мл. Мышам NOG в/в вводили 200 мкл клеточной суспензии, что соответствует  $25 \times 10^6$  клеток/мышь. Через 2 недели после инъекции были взяты образцы крови для анализа уровня «гуманизации», означающего количество человеческих клеток в крови мышей NOG. Кровь состояла из прим. 40% Т-клеток человека, и мышей считали гуманизированными. Затем мышей обрабатывали 10 мкг либо Ервой, анти-CD3 (ОКТ-3), 1-H10, либо изотипического контрольного мАт. Температуру тела измеряли до инъекции антитела и через 1 час после инъекции. Фиг. 18 А. Как видно на фиг. 18 А, положительное контрольное антитело ОКТЗ вызывало резкое снижение температуры тела, как было опубликовано ранее, и в соответствии с токсичностью, наблюдаемой в клинике с этим антителом. Напротив, 1-H10 не оказало никакого влияния на температуру тела. Через пять часов после инъекции антител эксперименты были прекращены и кровь была собрана для анализа высвобождения цитокинов (MSD). Измеряемые цитокины представляли собой IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL1 $\beta$  человека. Из них IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  были количественно определены на достаточно высоком уровне, чтобы быть надежными. Как видно на фиг. 18 В и С, положительное контрольное антитело ОКТЗ индуцировало как значимые IFN- $\gamma$ , так и TNF- $\alpha$  высвобождение (в соответствии с токсичностью, наблюдаемой в клинике с этим антителом), тогда как у мышей, обработанных 1H10, не было значительного высвобождения IFN- $\gamma$ . Однако наблюдалась тенденция к увеличению высвобождения TNF- $\alpha$ , хоть и не значительного и столь же драматичного, как для ОКТЗ.

Таким образом, Пример 6 показывает, что блокирующие лиганд антитела TNFR2,

в данном случае проиллюстрированные антителом, называемым 1-H10, не индуцируют существенных уровней высвобождения цитокинов, как измерено несколькими ранее опубликованными способами. Поскольку высвобождение цитокинов является ограничивающим фактором для клинической разработки для некоторых

иммуномодулирующих антител, это указывает на приемлемый профиль безопасности в этом отношении.

Пример 7. Эпитопы генерированных нацеленных на TNFR2 антител

Нокауты в конструкции домена

В первой серии экспериментов использовали конструкции ДНК, кодирующие различные варианты TNFR2, в которых отсутствует один или более из 4 внеклеточных доменов, описанных в таблице 10. Во второй серии экспериментов использовали конструкции ДНК, кодирующие варианты TNFR2, в которых различные части домена 3 были заменены на соответствующую мышиную часть, как описано в таблице 11. Последнее возможно, поскольку ни одно из антител не обладает перекрестной реактивностью с мышинным TNFR. В обоих случаях конструкции были приобретены у GeneArt (ThermoFisher). Конструкции клонировали в вектор экспрессии, содержащий CMV-промотор и ориджин репликации плазмиды OriP, и временно экспрессировали в адаптированных к суспензии клетках HEK293-EBNA.

Таблица 10. Конструкции TNFR2, используемые для трансфекции, где один или несколько доменов были удалены.

Конструкция	Описание
hTNFR2	дикий тип, TNFR2 полной длины человека (uniprot # P20333)
hTNFR2-Δ 1	hTNFR2 с удаленным доменом TNFR-Cys 1 (аминокислота 39-76)
hTNFR2- Δ 2	hTNFR2 с удаленным доменом TNFR-Cys 2 (аминокислота 77-118)
hTNFR2- Δ 3	hTNFR2 с удаленным доменом TNFR-Cys 3 (аминокислота 119-162)
hTNFR2- Δ 4	hTNFR2 с удаленным доменом TNFR-Cys 4 (аминокислота 163-201)
hTNFR2- Δ 1 + 3	hTNFR2 с удаленным доменом TNFR-Cys 1 и 3 (аминокислота 39-76 и 119-162)
hTNFR2- Δ 2 + 4	hTNFR2 с удаленным доменом TNFR-Cys 2 и 4 (аминокислота 77-118 и 163-201)

Таблица 11. Конструкции TNFR2, используемые для трансфекции, заменяли различные части домена 3 на соответствующие мышинные последовательности.

Конструкция	Описание
hTNFR2	дикий тип, TNFR2 полной длины человека (uniprot # P20333)
mTNFR2	дикий тип, мышинный TNFR2 полной длины (uniprot # P25119)
hTNFR2-m1	hTNFR2 с аминокислотами 119-132, замененными на аминокислоты 120-133 из mTNFR2
hTNFR2-m2	hTNFR2 с аминокислотами 134-144, замененными на аминокислоты 135-146 из mTNFR2
hTNFR2-m3	hTNFR2 с аминокислотами 151-160, замененными на аминокислоты 153-162 из mTNFR2
hTNFR2-m4	hTNFR2 с аминокислотами 130-144, замененными на аминокислоты 131-146 из mTNFR2

Анализ связывания на основе проточной цитометрии

Клетки HEK-293-E трансфицировали соответствующими плазмидами кДНК вариантов TNFR2 с применением липофектамина 2000. Через 48 часов после трансфекции клетки собирали и окрашивали указанными антителами в течение 30 минут. После 2 стадий промывки PBS поверхностно-связанные антитела окрашивали вторичным анти-IgG, связанным с APC. Перед анализом проточной цитометрии на проточном цитометре BD-Verse клетки промывали и окрашивали на наличие живых/мертвых клеток.

Эксперименты по связыванию трансфицированных клеток HEK 293 на основе проточной цитометрии четко показали, что домен 1 и домен 2 либо не влияют на связывание (домен 1), либо лишь незначительно влияют на связывание (домен 2) любого из антител к этим клеткам. В качестве положительного контроля использовали

поликлональное антитело против TNFR2 человека. Антитело положительного контроля показало высокое связывание со всеми тестируемыми конструкциями, тогда как отрицательное антитело не показало связывания (фиг. 19). Все протестированные антитела показали полную потерю связывания с TNFR2, лишенным домена 3. Точно так же большинство антител не могло связываться с TNFR2, если домен 4 отсутствовал. Все антагонистические антитела (1H10, 4H02 и 5B08) показали резко сниженное связывание с TNFR2 Δ4 более чем на 50% по сравнению со связыванием с TNFR2 Δ1 и TNFR2 Δ2. Аналогичным образом, удаление двух доменов из TNFR2 ясно показало, что отсутствие домена 3 или 4 значительно отменяет связывание всех тестируемых антител с TNFR2, за возможным исключением агонистического антитела 1F06, в то время как отсутствие домена 4 отменяет связывание агонистических антител и снижает связывание антагонистических антител значительно. (фиг. 19 E и F).

#### Связывание с химерным мышь-человек TNFR2

Для дальнейшего сужения сайта связывания и определения эпитопов части домена 3 TNFR2 человека были заменены соответствующей мышшиной последовательностью. Поскольку все антитела проявляют очень небольшую перекрестную реактивность с TNFR2 мыши, потеря связывания с определенными конструкциями позволит улучшить связывающий эпитоп. На фиг. 20 показаны различные химерные конструкции TNFR2 мышь-человек. Было произведено четыре различных замены, заменяющих 14 (m1), 12 (m2), 10 (m3) или 16 (m4) аминокислот из последовательности человека на соответствующую последовательность мыши. Остальные три домена (1, 2, 4) содержат исключительно человеческие последовательности.

Эти конструкции (домены 1-4 TNFR2 с мутациями в 3) затем трансфицировали в клетки HEK293, и антитела тестировали на связывание с применением подхода проточной цитометрии. В качестве положительного контроля использовали поликлональные антитела против TNFR2 мыши, а также против TNFR2 человека. Как и ожидалось, из-за сходства последовательностей оба поликлональных контрольных антитела показали значительную перекрестную реактивность и распознали TNFR2 как человека, так и мыши. Очевидно, что наилучшие сигналы были получены при сопоставлении антител с намеченной мишенью.

Моноклональные антитела показали сильное связывание с TNFR2 человека, но не связывались с TNFR2 мыши или имели очень слабое связывание (фиг. 21, левая панель). Подобное связывание с очень небольшим восстановлением наблюдали для всех клонов конструкции hTNFR2 m1 с мутациями в аминокислотах 119-132, что указывает на то, что ни одно из антител не связывается с эпитопом в этом участке. Однако мутации в аминокислотах 134-144 (конструкция hTNFR2 m2) полностью аннулировали связывание для половины протестированных антител, соответствующих антагонистическим блокирующим антителам 1-H10, 4-H02 и 5-B08, что указывает на то, что антитела связываются, по меньшей мере, частично в пределах этого участка. 1-G10 представляет собой частичный блокиратор, также сильно пострадавший от этой замены.

Примечательно, что агонистические антитела (1-F02, 1-F06 и 4-E08) сохраняли связывание с применением конструкции 2, что убедительно свидетельствует о другом эпитопе по сравнению с антагонистическими антителами. Интересно, что все антитела потеряли связывание с конструкцией hTNFR2 m3 с мутациями в аминокислотах 151-160. Это указывает на то, что все антитела, как агонисты, так и антагонисты, имеют по меньшей мере частичный эпитоп в этой последовательности. Тестирование конструкции hTNFR2 m4 немного большего размера с мутациями в аминокислотах 130-144 показало такое же связывание, как и в случае конструкции hTNFR2 m2.

## Выводы о связывании эпитопов

Группируя антитела по их функциональной роли, агонистические антитела (1-F02, 1-F06 и 4-E08), по-видимому, связывают очень дистальную С-концевую часть домена 3, охватывающую аминокислоты 151-160 домена 4, тогда как эпитоп для антагонистов (1-H10, 5-B08 и 4-H02) смещен больше к центру домена 3, охватывая аминокислоты 134-160 и, вероятно, покрывая меньшую часть домена 4. Однако, несмотря на это, их эпитопы, по-видимому, до некоторой степени перекрываются.

Ни одно из антител не связывается с N-концевой частью домена 3, аминокислоты 119-134. Сайты связывания с доменом 4 вполне вероятны для всех антител, но полностью не идентифицированы.

## (57) Формула изобретения

1. Молекула антагонистического антитела, которая специфически связывается с TNFR2 на клетке-мишени, благодаря чему блокирует связывание TNF- $\alpha$  с TNFR2 и блокирует передачу сигнала через TNFR2, при этом указанная молекула антитела также связывается с Fc $\gamma$ -рецептором посредством своего Fc-участка, где молекула антитела содержит

(i) варибельную тяжелую цепь (VH), содержащую следующие CDR: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, и варибельную легкую цепь (VL), содержащую следующие CDR: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; или

(ii) варибельную тяжелую цепь (VH), содержащую следующие CDR: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, и варибельную легкую цепь (VL), содержащую следующие CDR: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14; или

(iii) варибельную тяжелую цепь (VH), содержащую следующие CDR: SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19, и варибельную легкую цепь (VL), содержащую следующие CDR: SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22; или

(iv) варибельную тяжелую цепь (VH), содержащую следующие CDR: SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 и SEQ ID NO: 107, и варибельную легкую цепь (VL), содержащую следующие CDR: SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109 и SEQ ID NO: 110.

2. Молекула антитела по п. 1, отличающаяся тем, что связывается с более высокой аффинностью с активирующими Fc $\gamma$ -рецепторами, чем с ингибирующими Fc $\gamma$ -рецепторами.

3. Молекула антитела по пп. 1, 2, отличающаяся тем, что ее связывание с TNFR2 приводит к изменению в пораженной ткани количества и/или частоты клеток, экспрессирующих TNFR2.

4. Молекула антитела по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что ее связывание с TNFR2 приводит к инфильтрации Т-клеток и/или миелоидных клеток в пораженную ткань и/или изменению в составе Т-клеток и/или миелоидных клеток в пораженной ткани.

5. Молекула антитела по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что выбрана из группы, состоящей из полноразмерного антитела, химерного антитела, одноцепочечного антитела и их антигенсвязывающего фрагмента, сохраняющего способность связываться с Fc-рецептором посредством своего Fc-участка.

6. Молекула антитела по любому из пп. 1-5, связывающаяся с TNFR2 человека (hTNFR2) и/или с TNFR2 яванского макака (cmTNFR2).

7. Молекула антитела по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что выбрана из группы, состоящей из молекулы антитела IgG человека, молекулы гуманизированного антитела IgG и молекулы антитела IgG человеческого происхождения.



8. Молекула антитела по п. 7, отличающаяся тем, что представляет собой антитело IgG1 человека.

9. Молекула антитела по пп. 7, 8, отличающаяся тем, что сконструирована для лучшего связывания с активирующими Fc-гамма-рецепторами.

5 10. Молекула антитела по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что представляет собой моноклональное антитело.

11. Молекула антитела по любому из пп. 1-10, отличающаяся тем, что не связывается специфически с эпитопом, содержащим или состоящим из последовательности KCSPG.

12. Молекула антитела по любому из пп. 1-11, отличающаяся тем, что содержит:

10 (i) аминокислотную последовательность вариабельной тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 7 и аминокислотную последовательность вариабельной легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 8; или

(ii) аминокислотную последовательность вариабельной тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 15 и аминокислотную последовательность вариабельной легкой цепи (VL) SEQ ID  
15 NO: 16; или

(iii) аминокислотную последовательность вариабельной тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 23 и аминокислотную последовательность вариабельной легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 24; или

(iv) аминокислотную последовательность вариабельной тяжелой цепи (VH) SEQ ID  
20 NO: 111 и аминокислотную последовательность вариабельной легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 112.

13. Молекула антитела по любому из пп. 1-11, отличающаяся тем, что представляет собой молекулу антитела, которая способна конкурировать в связывании с TNFR2 с молекулой антитела, заявленной по п. 12.

25 14. Выделенная нуклеотидная последовательность, кодирующая молекулу антитела, заявленную по любому из пп. 1-13.

15. Плазмида для экспрессии антитела по любому из пп. 1-13, содержащая нуклеотидную последовательность, заявленную по п. 14.

30 16. Вирус для экспрессии и внеклеточного высвобождения антитела по любому из пп. 1-13, содержащий нуклеотидную последовательность, заявленную по п. 14, или плазмиду, заявленную по п. 15.

17. Вирус по п. 16, дополнительно содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки.

35 18. Вирус по п. 17, где ингибитором контрольной точки является PD-1.

19. Вирус по п. 17, где ингибитором контрольной точки является PD-L1.

20. Клетка в качестве носителя для доставки антитела по любому из пп. 1-13, содержащая нуклеотидную последовательность, заявленную по п. 14, или плазмиду, заявленную по п. 15, или вирус, заявленный по любому из пп. 16-19.

40 21. Применение молекулы антитела по любому из пп. 1-13, нуклеотидной последовательности по п. 14, плазмиды по п. 15, вируса по любому из пп. 16-19 и/или клетки по п. 20 в медицине в лечении рака.

22. Применение по п. 21, отличающееся тем, что пациент, подлежащий лечению, является пациентом, имеющим высокую экспрессию TNFR2 в пораженной ткани.

45 23. Применение по п. 21, где рак представляет собой солидный рак.

24. Применение молекулы антитела по любому из пп. 1-13, нуклеотидной последовательности по п. 14, плазмиды по п. 15, вируса по любому из пп. 16-19 и/или клетки по п. 20 в медицине в лечении инфекции, вызванной внутриклеточным патогеном.

25. Применение по п. 24, отличающееся тем, что пациент, подлежащий лечению, является пациентом, имеющим высокую экспрессию TNFR2 в пораженной ткани.

26. Применение молекулы антитела по любому из пп. 1-13, нуклеотидной последовательности по п. 14, плазмиды по п. 15, вируса по любому из пп. 16-19 и/или клетки по п. 20 при лечении рака в сочетании с:

молекулой антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки;

нуклеотидной последовательностью, кодирующей молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки;

плазмидой, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки; и/или

клеткой, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки, плазмидой, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки, или вирусом, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки.

27. Применение по п. 26, где ингибитором контрольной точки является PD-1.

28. Применение по п. 26, где ингибитором контрольной точки является PD-L1.

29. Применение по любому из пп. 26-28, где рак представляет собой солидный рак.

30. Применение молекулы антитела, заявленной по любому из пп. 1-13, нуклеотидной последовательности, заявленной по п. 14, плазмиды, заявленной по п. 15, вируса, заявленного по любому из пп. 16-19, и/или клетки, заявленной по п. 20, для получения фармацевтической композиции, применяемой при лечении рака или инфекции, вызванной внутриклеточным патогеном.

31. Применение по п. 30, отличающееся тем, что указанная фармацевтическая композиция предназначена для применения при лечении рака или инфекции у пациента, имеющего высокую экспрессию TNFR2 в пораженной ткани.

32. Применение по пп. 30, 31, отличающееся тем, что указанную фармацевтическую композицию применяют при лечении рака и вводят в сочетании с:

молекулой антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки;

нуклеотидной последовательностью, кодирующей молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки;

плазмидой, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки; и/или

клеткой, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки, плазмидой, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки, или вирусом, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки.

33. Применение по п. 32, где ингибитором контрольной точки является PD-1.

34. Применение по п. 32, где ингибитором контрольной точки является PD-L1.

35. Применение по любому из пп. 30-34, где рак представляет собой солидный рак.

36. Фармацевтическая композиция для лечения рака или инфекции, вызванной внутриклеточным патогеном, содержащая или состоящая из молекулы антитела, заявленной по любому из пп. 1-13, нуклеотидной последовательности, заявленной по

п. 14, плазмиды, заявленной по п. 15, вируса, заявленного по пп. 16-19, и/или клетки, заявленной по п. 20, в эффективном количестве, и, необязательно, фармацевтически приемлемого разбавителя, носителя, наполнителя и/или эксципиента.

37. Фармацевтическая композиция по п. 36 для применения при лечении рака в сочетании с фармацевтической композицией, содержащей:

молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки;

нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки;

плазмиду, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки; и/или

клетку, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки,

плазмиду, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу

антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки, или вирус, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки.

38. Композиция по п. 37, где ингибитором контрольной точки является PD-1.

39. Композиция по п. 37, где ингибитором контрольной точки является PD-L1.

40. Композиция по любому из пп. 36, 37, где рак представляет собой солидный рак.

41. Способ лечения рака у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества молекулы антитела, заявленного по любому из пп. 1-13, нуклеотидной последовательности, заявленной по п. 14, плазмиды, заявленной по п. 15, вируса, заявленного по пп. 16-19, клетки, заявленной по п. 20, или фармацевтической композиции, заявленной по п. 36.

42. Способ по п. 41, отличающийся тем, что пациент является пациентом, имеющим высокую экспрессию TNFR2 в пораженной ткани.

43. Способ лечения рака по пп. 41, 42, отличающийся тем, что пациенту также вводят терапевтически эффективное количество:

молекулы антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки;

нуклеотидной последовательности, кодирующей молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки;

плазмиды, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки; и/или

клетки, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки,

плазмиды, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки, или

вируса, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, которая специфически связывается с ингибитором контрольной точки.

44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что ингибитор контрольной точки представляет собой PD-1.

45. Способ по п. 43, отличающийся тем, что ингибитор контрольной точки представляет собой PD-L1.

46. Способ по пп. 41-45, отличающийся тем, что рак представляет собой солидный рак.

47. Способ лечения инфекции, вызванной внутриклеточным патогеном, у пациента,

включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества молекулы антитела, заявленного по любому из пп. 1-13, нуклеотидной последовательности, заявленной по п. 14, плазмиды, заявленной по п. 15, вируса, заявленного по пп. 16-19, клетки, заявленной по п. 20, или фармацевтической композиции, заявленной по п. 36.

5 48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что пациент является пациентом, имеющим высокую экспрессию TNFR2 в пораженной ткани.

10

15

20

25

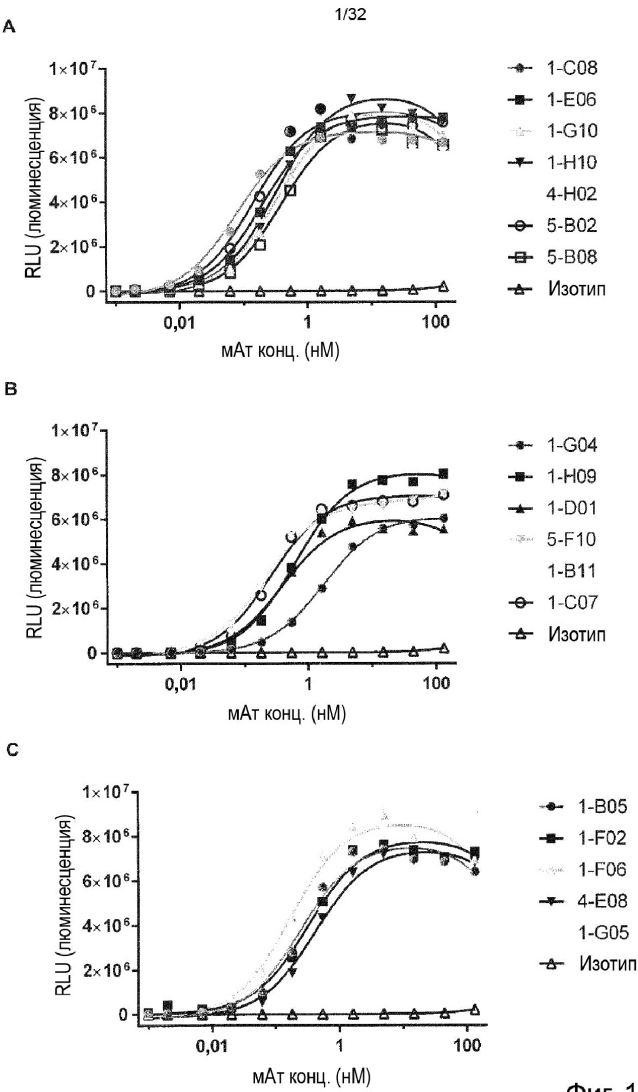
30

35

40

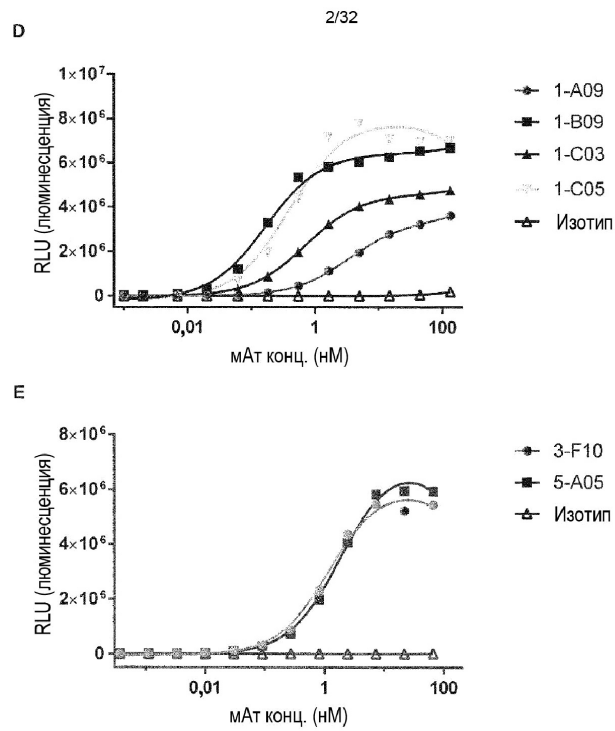
45

1

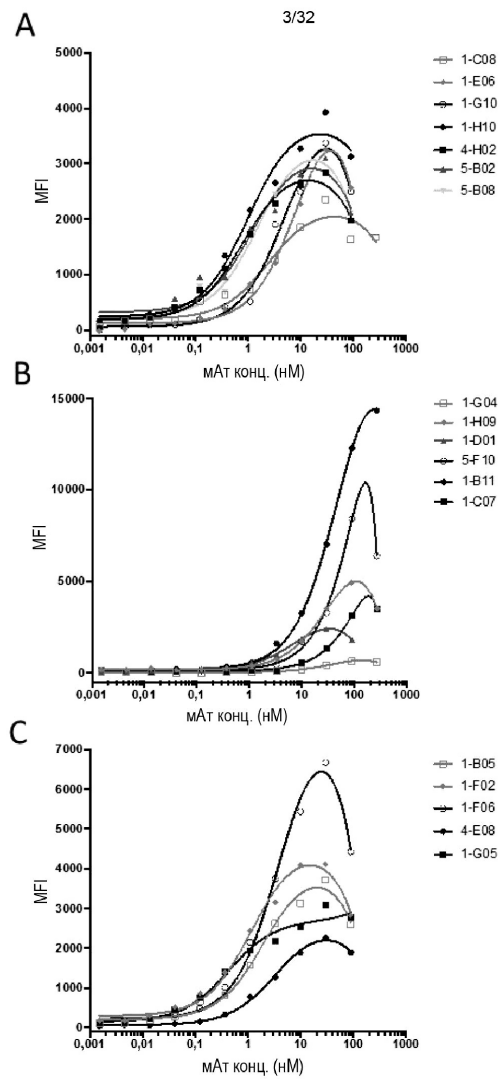


Фиг. 1

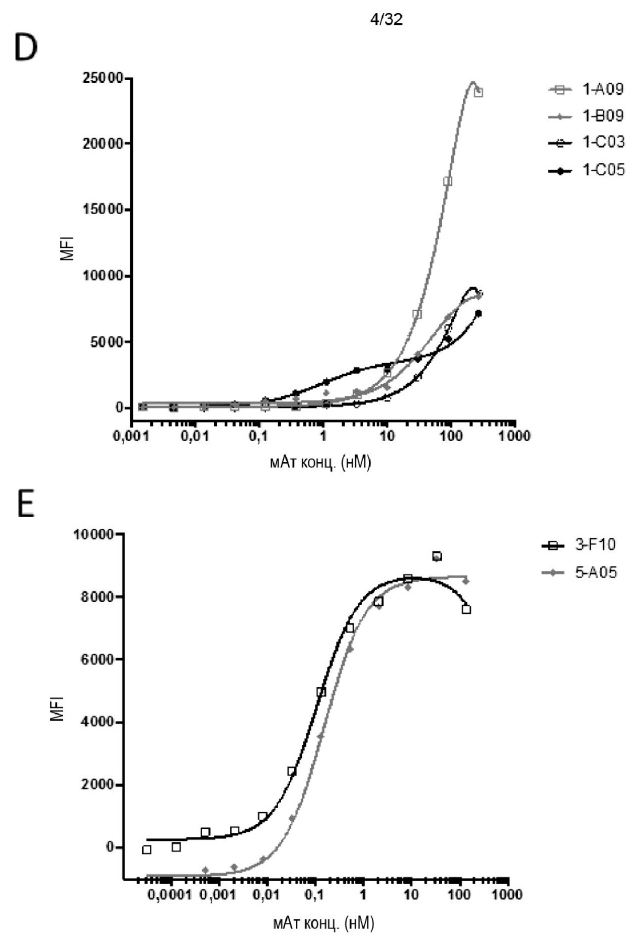
2



Фиг. 1, продолж.

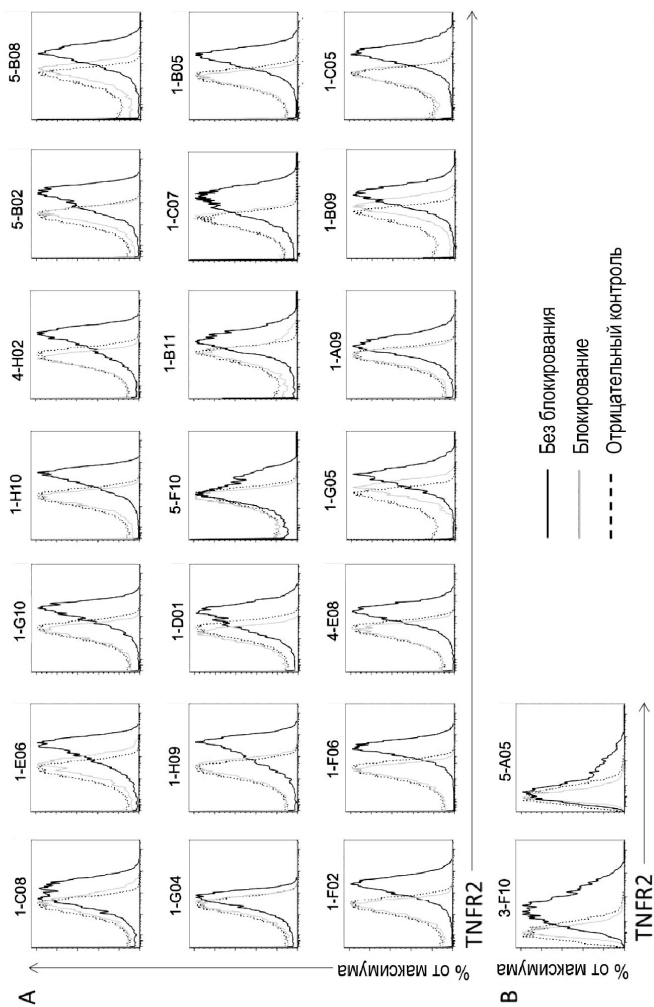


Фиг. 2

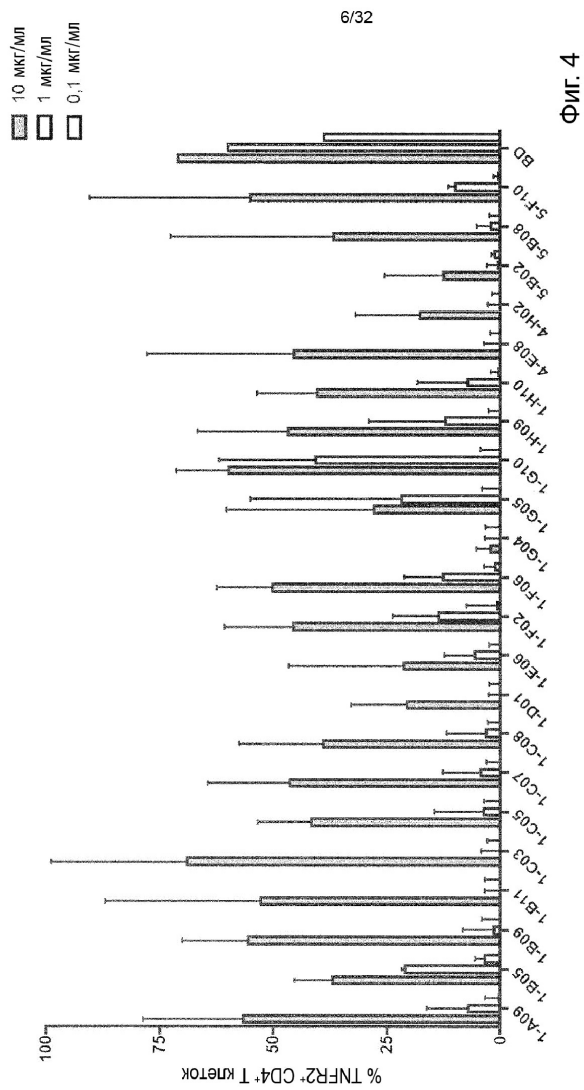


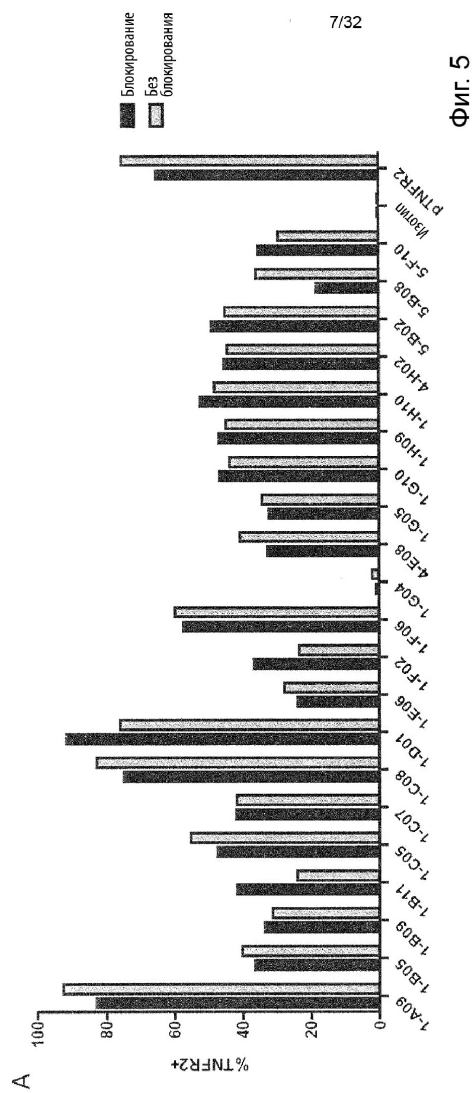
Фиг. 2, продолж.



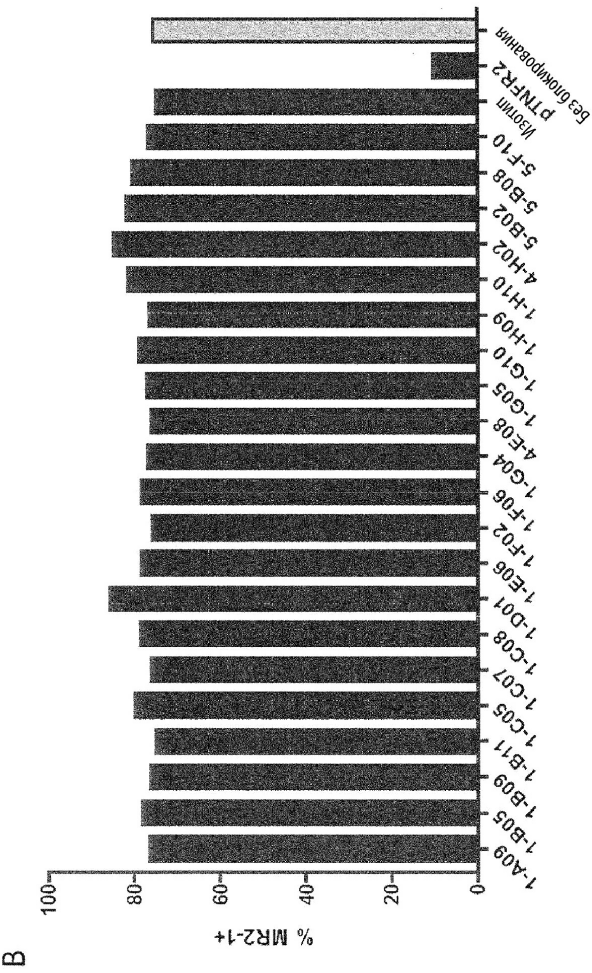


Фиг. 3

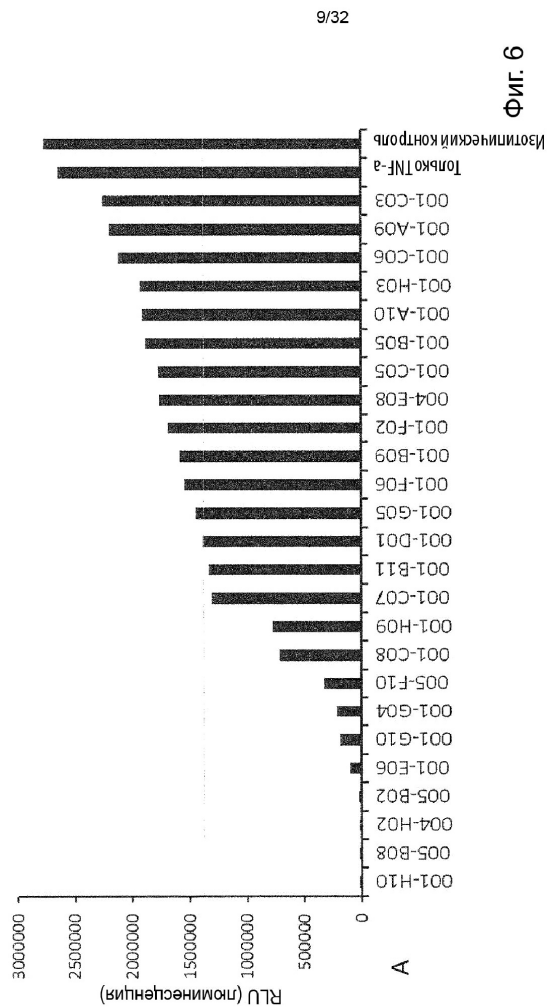


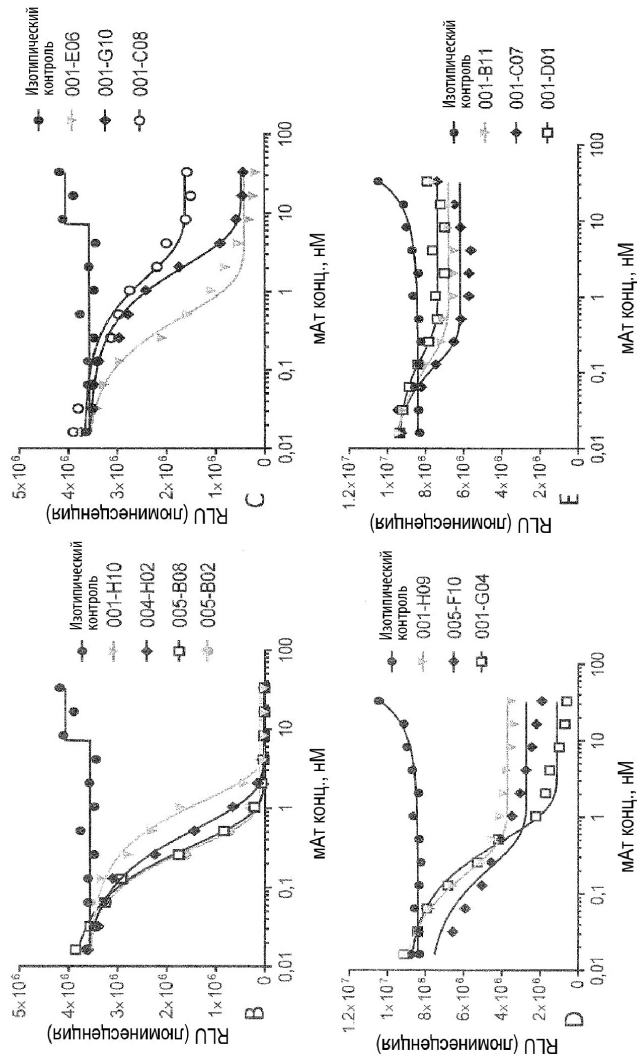


8/32

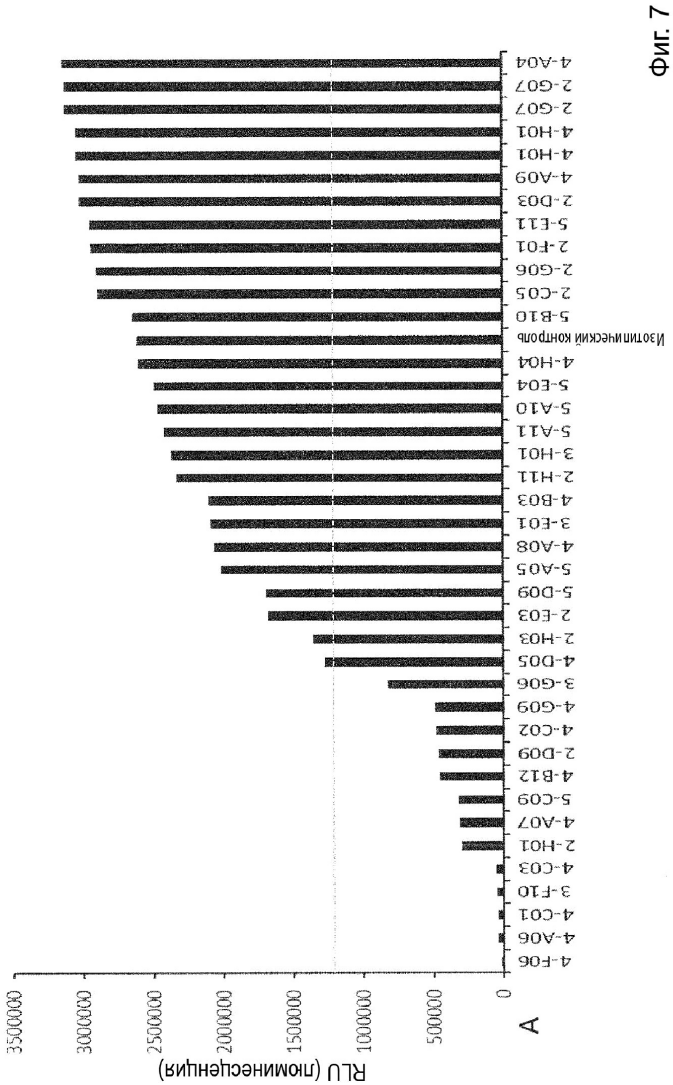


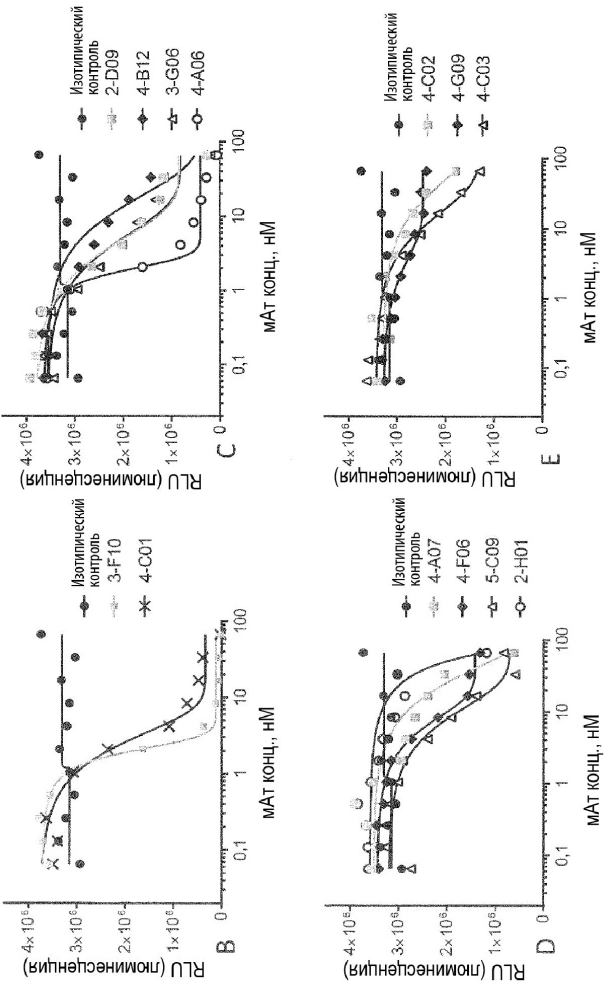
Фиг. 5, продолж.





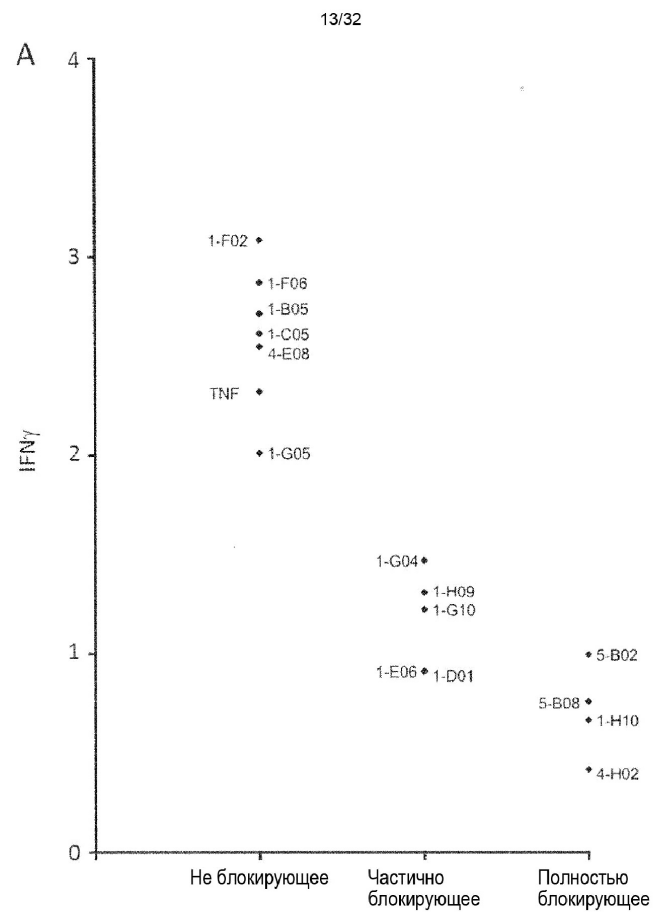
Фиг. 6, продолж.





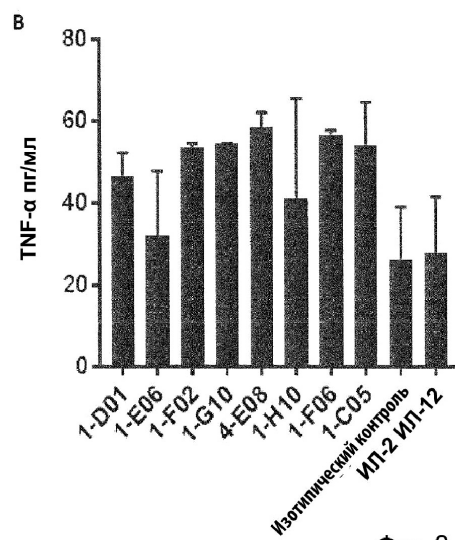
Фиг. 7, продолж.





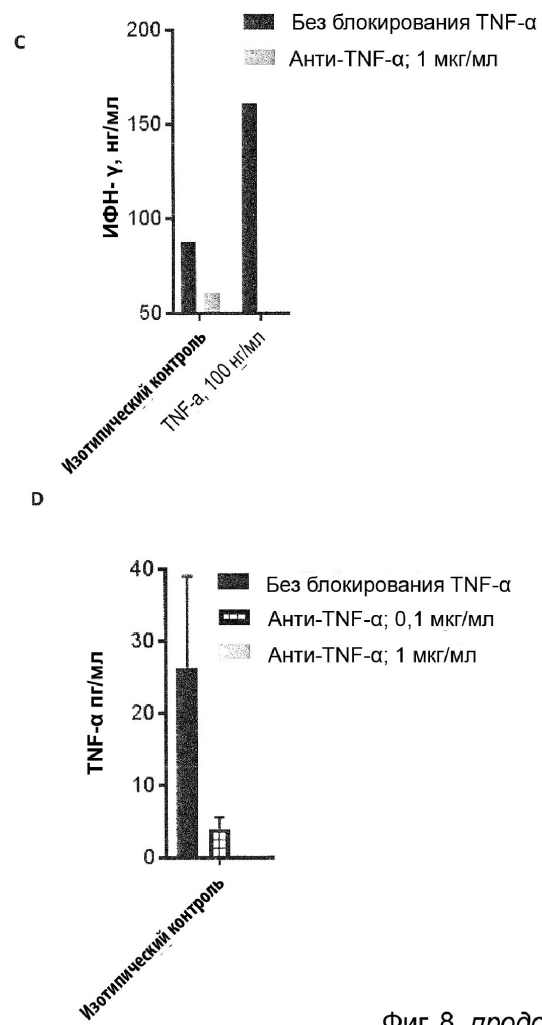
Фиг. 8

14/32

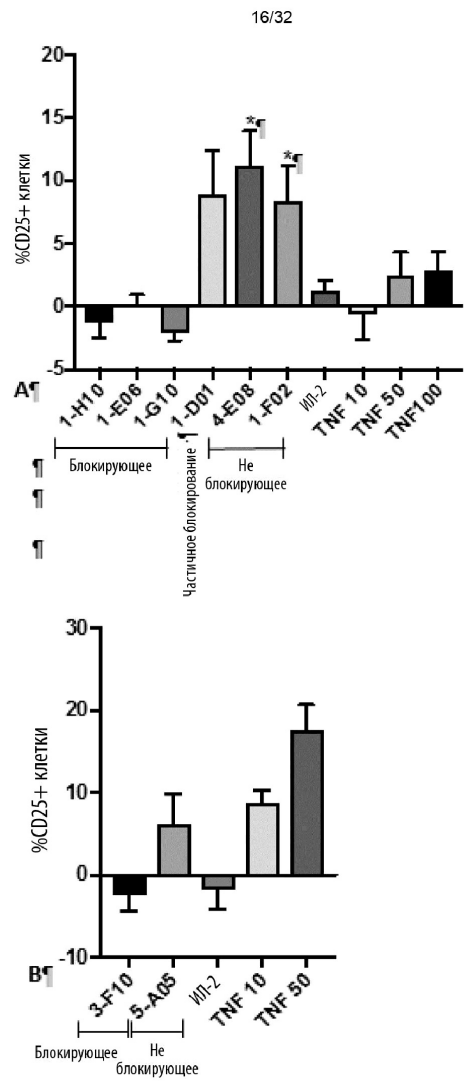


Фиг. 8, продолж.

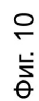
15/32

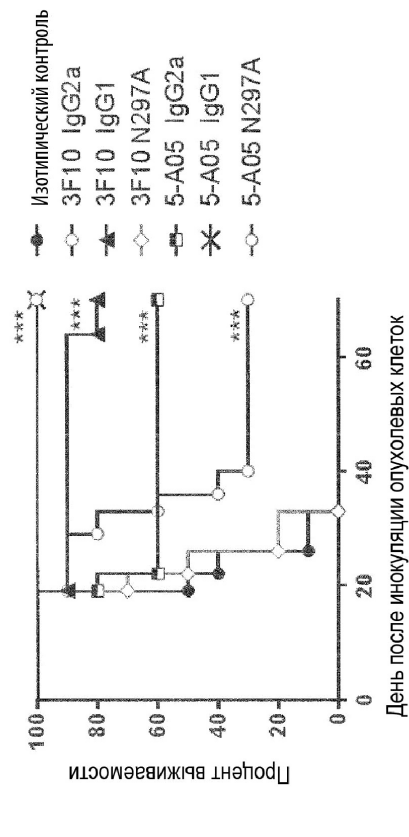


Фиг. 8, продолж.



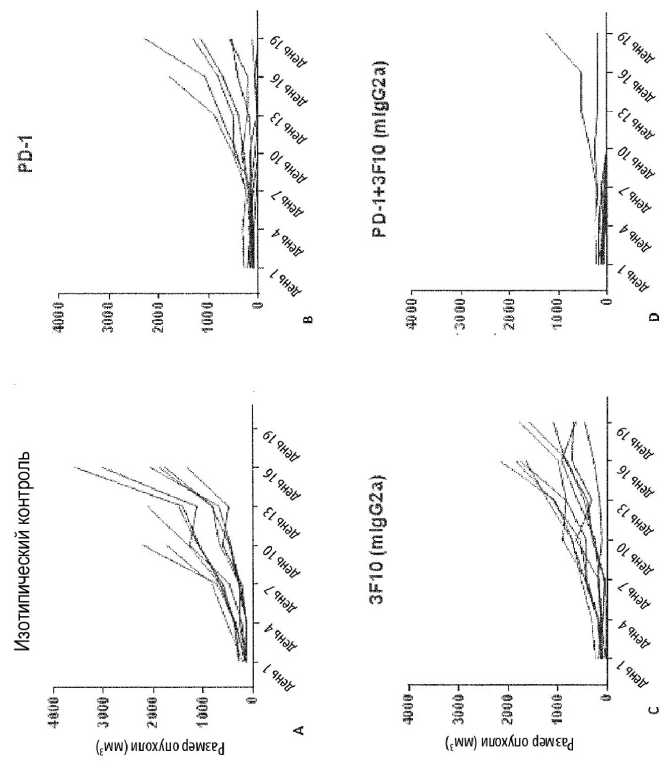
Фиг. 9



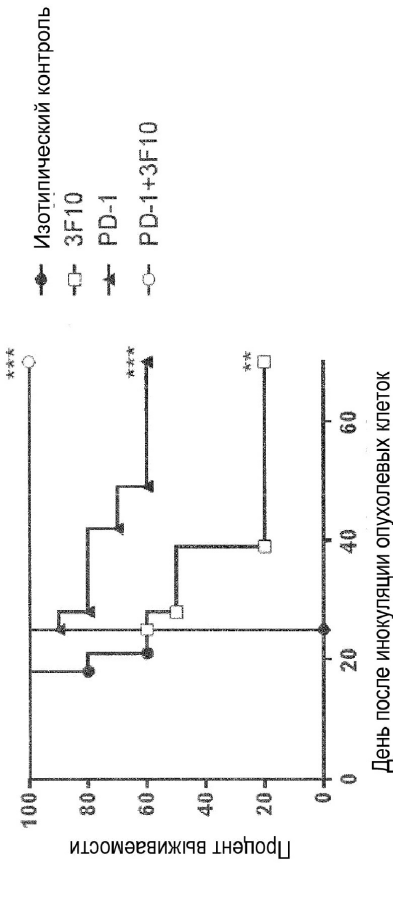


Фиг. 10, продолж.

В



Фиг. 11

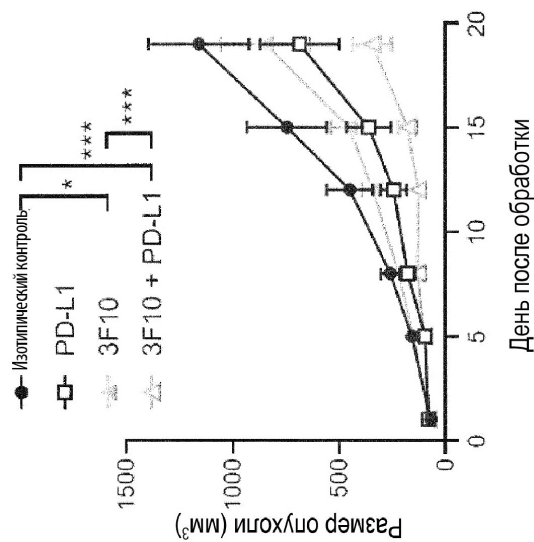


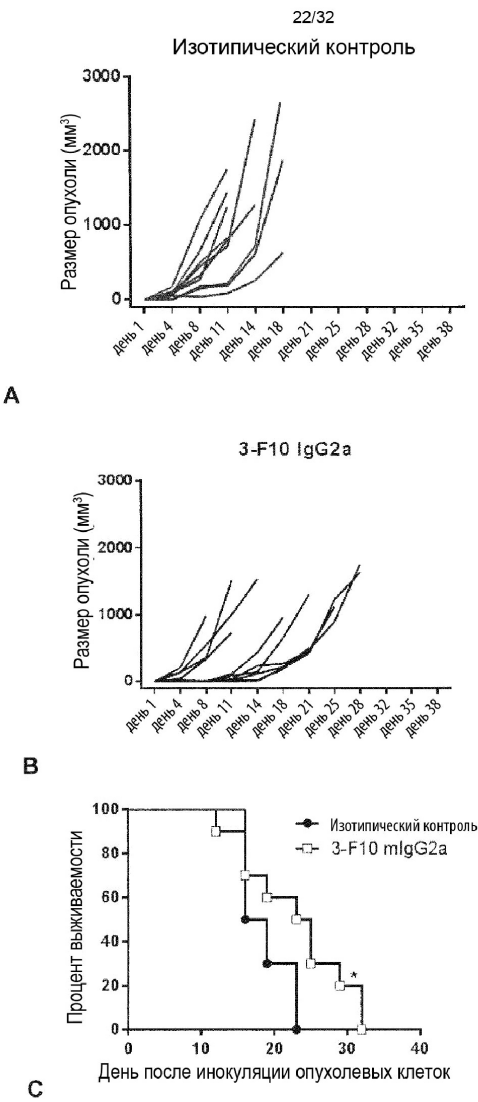
E

Фиг. 11, продолж.

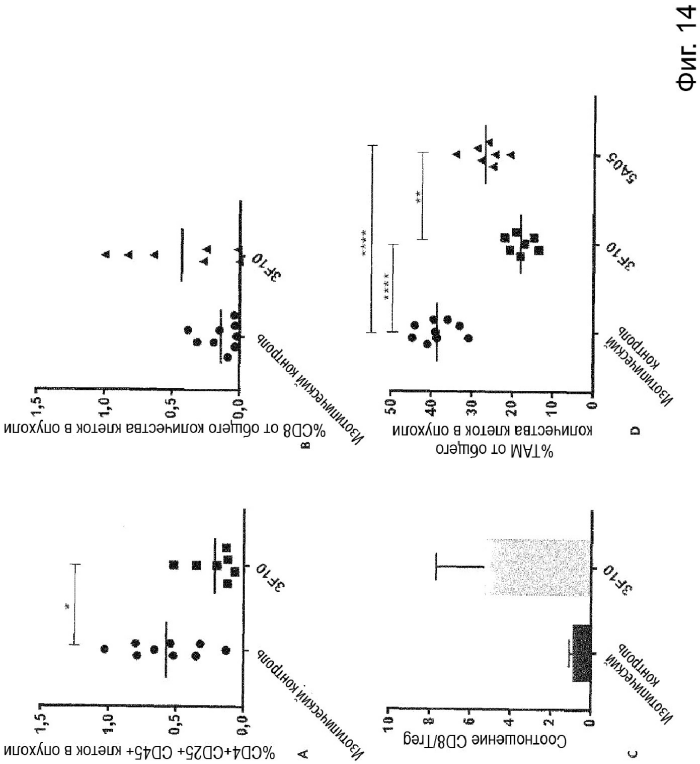


Фиг. 12

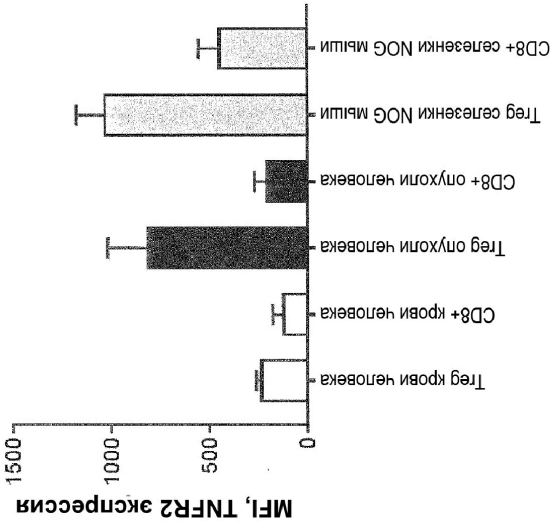




Фиг. 13



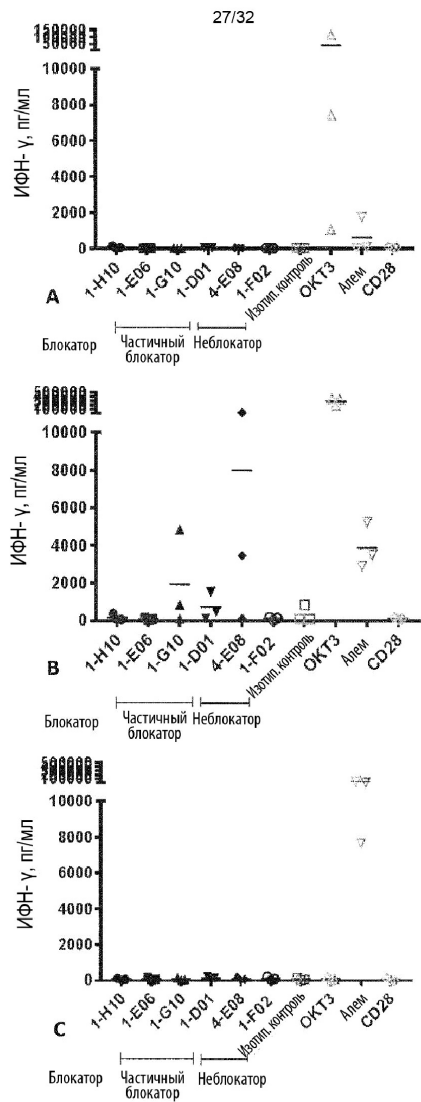
Фиг. 15



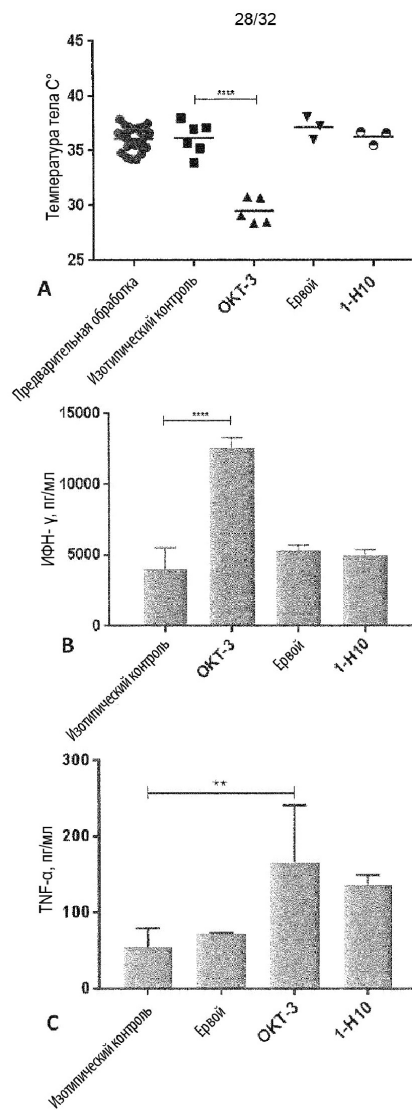




Фиг. 16, продолж.

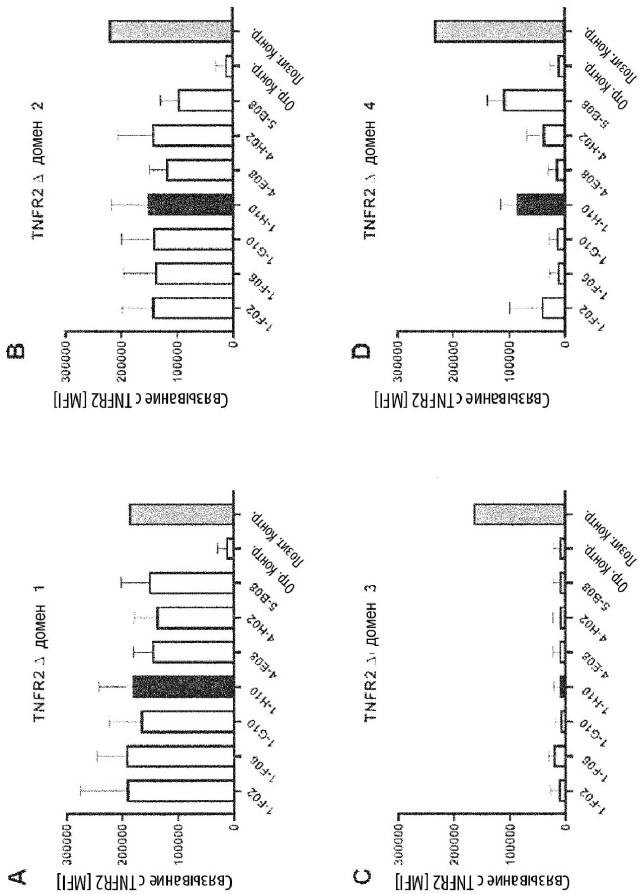


Фиг. 17

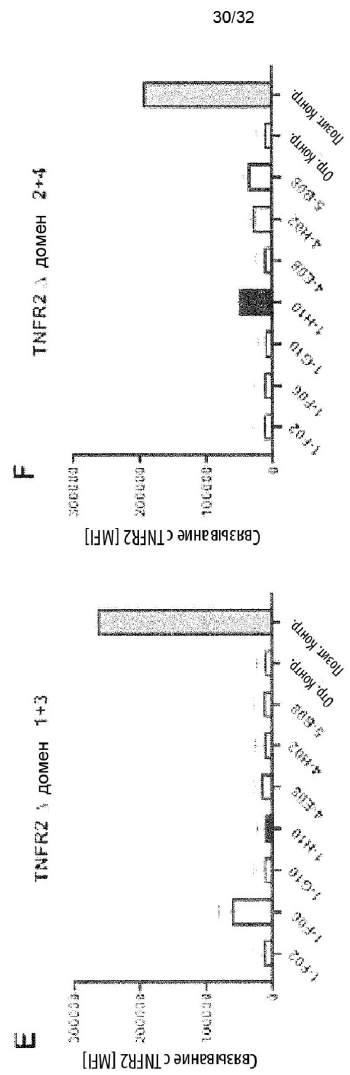


Фиг. 18





Фиг. 19



Фиг. 19, продолж.

TNFR2 домен 3

Последовательность человека-D3  
Последовательность мыши-D3

ДТ

Последовательность мыши 1

Аминокислота 119-132

Последовательность мыши 2

Аминокислота 134-144

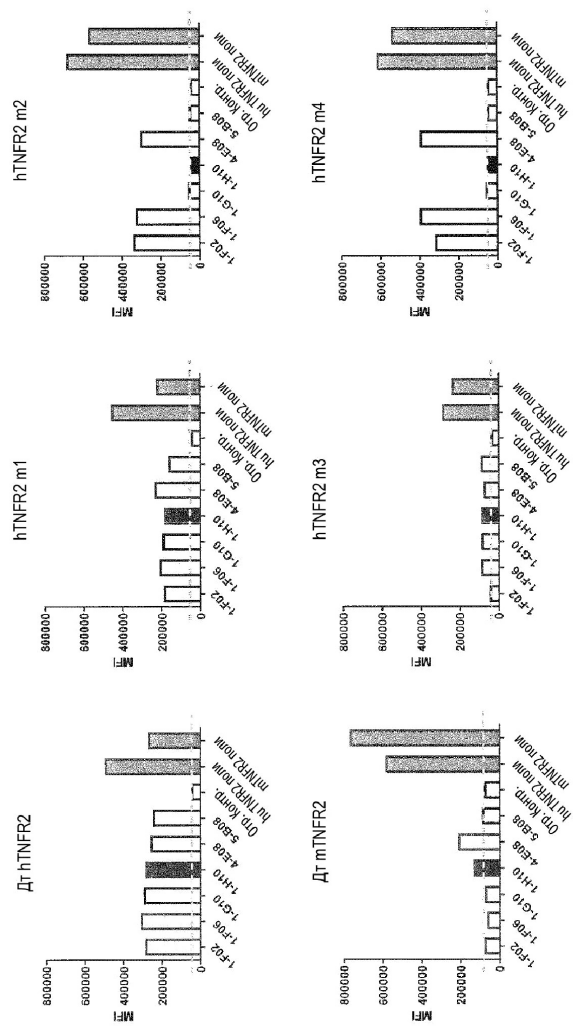
Последовательность мыши 3

Аминокислота 151-160

Последовательность мыши 4

Аминокислота 130-144

Фиг. 20



Фиг. 21