

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201790288 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.06.30

(22) Дата подачи заявки
2015.07.31

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(54) АНТИ-СТЛА4 МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ИЛИ ЕГО
АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И
ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 201410377352.9

(32) 2014.08.01

(33) CN

(86) PCT/CN2015/085721

(87) WO 2016/015675 2016.02.04

(71) Заявитель:
АКЕСО БАЙОФАРМА, ИНК. (CN)

(72) Изобретатель:
Ли Байюн, Ся Юй, Ван Чжунминь,
Чжан Пэн, Пан Синхуа (CN)

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

(57) Настоящее изобретение относится к областям терапии опухолей и молекулярной иммунологии и относится к анти-СТЛА4 моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, их фармацевтической композиции и их применению. Моноклональное антитело настоящего изобретения может блокировать связывание СТЛА4 с В7, снимать иммуносупрессию организма СТЛА4 и активировать Т-лимфоциты.

A1

201790288

201790288

A1

**АНТИ-СТЛА4 МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ИЛИ ЕГО АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ
ФРАГМЕНТ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к областям терапии опухолей и молекулярной иммунологии. Настоящее изобретение относится к анти-СТЛА4 моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, их фармацевтической композиции, их кодирующим последовательностям и способу и применению их в диагностике, профилактике, терапии и/или адъювантной терапии.

Уровень техники

Ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами антиген 4 (сокращенно СТЛА4) обладает высокой степенью сходства с молекулой CD28 по генной структуре, хромосомной локализации, гомологии последовательности и генной эксперссии. Обе эти молекулы являются рецепторами для ко-стимулирующей молекулы В7, в основном экспрессирующейся на поверхности активированных Т-лимфоцитов. Однако, в качестве ко-стимулирующего сигнала активации лимфоцитов, СТЛА4 выполняет функцию, противоположную CD28. После связывания с В7 СТЛА4 может ингибировать активацию мышиных и человеческих Т-лимфоцитов, играя отрицательную регулирующую роль в активации Т-лимфоцитов.

СТЛА4 mAbs или лиганды СТЛА4 могут предотвращать связывание СТЛА4 с его нативными лигандами, блокируя тем самым передачу отрицательного регулирующего сигнала Т-лимфоцитам через СТЛА4 и повышая чувствительность Т-лимфоцитов к различным антигенам. В этом аспекте, результаты исследований *in vivo* и *in vitro* в значительной степени согласуются. В настоящее время получено несколько СТЛА4 mAbs (10D1, 11.2.2), которые проходят клинические испытания при лечении рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака печени, злокачественной меланомы и т.д. (CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. Grosso JF., Jure-Kunkel MN., Cancer Immun. 2013; 13:5. Epub 2013 Jan 22; US 6984720 B1; и US 6682736 B1). Среди этих антител, антитела 10D1 и 11.2.2 рассматриваются

в качестве анти-CTLA4 моноклональных антител, обладающих наилучшим эффектом.

Интерлейкин 2 (IL-2) продуцируется Т-лимфоцитами. Он представляет собой фактор роста, регулирующий подгруппу Т-лимфоцитов. Также он является важным фактором, модулирующим иммунный ответ. Он может стимулировать и активировать экспрессию В-лимфоцитов и принимает участие в гуморальном ответе, кроветворении и выживании опухолей. Рекомбинантный человеческий IL-2 был одобрен Управлением по контролю качества продуктов питания и лекарственных средств США для лечения злокачественных опухолей (включая меланому, опухоли почек и т.д.). Кроме того, его действие изучалось в клинических исследованиях при лечении хронической вирусной инфекции (Pharmacologic administration of interleukin-2 Chavez, A.R., et al., Ann N Y Acad Sci, 2009. 1182: 14-27).

В качестве важных факторов, влияющих на функцию Т-лимфоцитов, CTLA4 и CTLA4 mAbs могут оказывать специфичное терапевтическое воздействие на заболевания путем нарушения иммунного микроокружения в организме. Они обладают высокой эффективностью и устраняют недостатки традиционных лекарственных средств, открывая новый путь генной терапии. CTLA4 и CTLA4 mAbs тестируются в экспериментах на разных стадиях клинических испытаний. Например, при аутоиммунных заболеваниях они эффективно ингибировали гиперчувствительность дыхательных путей в животных моделях астмы, предотвращали развитие ревматических заболеваний, опосредовали иммунную толерантность к аллотрансплантанту в организме, и тому подобное. С другой стороны, хотя биологическая генная терапия не показала какого-либо нежелательного побочного эффекта в краткосрочных клинических испытаниях, следует обратить внимание на возможный эффект после длительного применения. Например, избыточная блокада передачи сигнала через CTLA4 при помощи CTLA4 mAbs может привести к развитию аутоиммунных заболеваний. Так как антитела могут специфично связываться со своими антигенами и индуцировать лизис клеток-мишеней или блокировать течение патологического процесса, разработка и применение лекарственных средств на

основе антител, в особенности гуманизированных антител, имеют важное значение для клинического лечения злокачественных опухолей и других иммунных заболеваний у человека.

В настоящее время все еще существует потребность в разработке новых антител, блокирующих связывание CTLA4 с B7, и их гуманизированных вариантов.

Сущность изобретения

После интенсивных исследований и творческих усилий авторами настоящего изобретения с использованием системы экспрессии в клетках млекопитающего был получен рекомбинантный CTLA4, который использовали в качестве иммуногена для иммунизации мышей. Клетки гибридомы получали путем слияния мышинных клеток селезенки с клетками миеломы. После скрининга большого количества образцов, авторами настоящего изобретения была получена гибридная клеточная линия, способная секретировать и продуцировать конкретное моноклональное антитело, которое специфично связывается с CTLA4 и может с высокой эффективностью блокировать связывание CTLA4 с B7. Кроме того, были получены гуманизированные антитела. Таким образом, предложены следующие изобретения.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где это моноклональное антитело содержит определяющее комплементарность области (CDRs), выбранные из следующих:

HCDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27,

HCDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и

HCDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29;

и/или

LCDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30,

LCDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и

LCDR3, содержащая аминокислотную последовательность,

выбранную из SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34.

Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, где аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) этого моноклонального антитела выбрана из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 18;

и/или

аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) этого моноклонального антитела выбрана из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24.

Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, где это моноклональное антитело содержит

(1) VH, представленную в SEQ ID NO: 6, и VL, представленную в SEQ ID NO: 8;

(2) VH, представленную в SEQ ID NO: 10, и VL, представленную в SEQ ID NO: 12;

(3) VH, представленную в SEQ ID NO: 14, и VL, представленную в SEQ ID NO: 16;

(4) VH, представленную в SEQ ID NO: 18, и VL, представленную в SEQ ID NO: 20;

(5) VH, представленную в SEQ ID NO: 14, и VL, представленную в SEQ ID NO: 22; или

(6) VH, представленную в SEQ ID NO: 14, и VL, представленную в SEQ ID NO: 24.

В настоящем изобретении вышеуказанные группы (1)–(6) имеют аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи антител 8D2/8D2(Re), 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 и 8D2H2L17, соответственно.

В частности, метионин (Met) в положении 18 в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 14 независимо заменен аминокислотой, выбранной из следующих аминокислот: лейцин (Leu), валин (Val), изолейцин (Ile) или аланин (Ala).

Терапевтические лекарственные средства на основе антител, в особенности моноклональных антител (MAB), показали превосходную

эффективность в лечении некоторых заболеваний. Стандартным способом получения таких терапевтических антител является иммунизация животного антигеном, получение от этого иммунизированного животного антител к этому антигену, или улучшение антител, обладающих низкой аффинностью к антигену, при помощи созревания аффинности. Однако такой способ требует больших затрат времени и является трудоемким, а также часто с его помощью не удается получить антитела, специфичные к конкретному эпитопу антигена.

Связывание с антигеном зависит от переменных областей легкой цепи и тяжелой цепи; переменная область каждой цепи содержит три гиперпеременных участка, также именуемых определяющая комплементарность область (CDR) (тяжелая цепь (H) содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и легкая цепь (L) содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3; определение см. в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition (1991), Vol. 1-3, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md).

Аминокислотные последовательности CDRs в последовательностях моноклональных антител вышеуказанных вариантов осуществления (1)–(6) анализировали при помощи технических способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, например, при помощи анализа базы данных VBASE2. Результаты представлены ниже.

(1) Аминокислотные последовательности 3 CDRs переменной области тяжелой цепи показаны ниже:

HCDR1: GFTFSDNW (SEQ ID NO: 27),

HCDR2: IRNKPYNLET (SEQ ID NO: 28),

HCDR3: TAQFAY (SEQ ID NO: 29).

Аминокислотные последовательности 3 CDRs переменной области легкой цепи показаны ниже:

LCDR1: ENIYGG (SEQ ID NO: 30),

LCDR2: GAT (SEQ ID NO: 31),

LCDR3: QNVLRSPFT (SEQ ID NO: 32).

(2) Аминокислотные последовательности 3 CDRs переменной области тяжелой цепи показаны ниже:

HCDR1: GFTFSDNW (SEQ ID NO: 27),

HCDR2: IRNKPYNYET (SEQ ID NO: 28),

HCDR3: TAQFAY (SEQ ID NO: 29).

Аминокислотные последовательности 3 CDRs переменной области легкой цепи показаны ниже:

LCDR1: ENIYGG (SEQ ID NO: 30),

LCDR2: GAT (SEQ ID NO: 31),

LCDR3: QNVLRSPFT (SEQ ID NO: 32).

(3) Аминокислотные последовательности 3 CDRs переменной области тяжелой цепи показаны ниже:

HCDR1: GFTFSDNW (SEQ ID NO: 27),

HCDR2: IRNKPYNYET (SEQ ID NO: 28),

HCDR3: TAQFAY (SEQ ID NO: 29).

Аминокислотные последовательности 3 CDRs переменной области легкой цепи показаны ниже:

LCDR1: ENIYGG (SEQ ID NO: 30),

LCDR2: GAT (SEQ ID NO: 31),

LCDR3: QNVLRSPFT (SEQ ID NO: 32).

(4) Аминокислотные последовательности 3 CDRs переменной области тяжелой цепи показаны ниже:

HCDR1: GFTFSDNW (SEQ ID NO: 27),

HCDR2: IRNKPYNYET (SEQ ID NO: 28),

HCDR3: TAQFAY (SEQ ID NO: 29).

Аминокислотные последовательности 3 CDRs переменной области легкой цепи показаны ниже:

LCDR1: ENIYGG (SEQ ID NO: 30),

LCDR2: GAT (SEQ ID NO: 31),

LCDR3: QNVLRSPFT (SEQ ID NO: 32).

(5) Аминокислотные последовательности 3 CDRs переменной области тяжелой цепи показаны ниже:

HCDR1: GFTFSDNW (SEQ ID NO: 27),

HCDR2: IRNKPYNYET (SEQ ID NO: 28),

HCDR3: TAQFAY (SEQ ID NO: 29).

Аминокислотные последовательности 3 CDRs переменной области легкой цепи показаны ниже:

LCDR1: ENIYGG (SEQ ID NO: 30),

LCDR2: GAT (SEQ ID NO: 31),

LCDR3: QNVLSRHPG (SEQ ID NO: 33).

(6) Аминокислотные последовательности 3 CDRs переменной области тяжелой цепи показаны ниже:

HCDR1: GFTFSDNW (SEQ ID NO: 27),

HCDR2: IRNKPYNLET (SEQ ID NO: 28),

HCDR3: TAQFAY (SEQ ID NO: 29).

Аминокислотные последовательности 3 CDRs переменной области легкой цепи показаны ниже:

LCDR1: ENIYGG (SEQ ID NO: 30),

LCDR2: GAT (SEQ ID NO: 31),

LCDR3: QNVLSRPG (SEQ ID NO: 34).

Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, где это моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, фрагмента определяющей комплементарность области, одноцепочечного антитела (например, scFv), гуманизированного антитела, гибридного антитела или диатела.

Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, где это моноклональное антитело связывается с белком CTLA4 с K_D менее чем примерно 10⁻⁵ М, например, менее чем примерно 10⁻⁶ М, 10⁻⁷ М, 10⁻⁸ М, 10⁻⁹ М или 10⁻¹⁰ или меньше.

Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, где это моноклональное антитело содержит области, не являющиеся CDR, и эти не являющиеся CDR области получены из антитела вида, отличного от мыши, например, человека.

Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения представляет собой анти-CTLA4 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое может специфично связываться с CTLA4.

Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения для применения в профилактике и/или терапии и/или адъювантной

терапии и/или диагностике опухоли; в частности, опухоли, выбранной из меланомы, опухоли почки/рака почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака желудочно-кишечного тракта и опухоли печени/рака печени.

Моноклональное антитело по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения для применения в:

блокировании связывания CTLA4 с B7,
регуляции (например, подавления) активности CTLA4 или уровня CTLA4,
снятия иммуносупрессии организма CTLA4, или
активации Т-лимфоцитов или повышения уровня экспрессии IL-2 в Т-лимфоцитах.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, которая содержит нуклеотидную последовательность, способную кодировать вариабельную область тяжелой цепи антитела, где эта вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит CDRs с аминокислотными последовательностями SEQ ID NOs: 27-29; в частности вариабельная область тяжелой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 18; более конкретно, молекула нуклеиновой кислоты имеет нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 17.

Настоящее изобретение также относится к выделенным молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения. Такие молекулы нуклеиновой кислоты могут быть выделены из клеток гибридомы или получены при помощи рекомбинантных технологий генной инженерии или способов химического синтеза.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, которая содержит нуклеотидную последовательность, способную кодировать вариабельную область легкой цепи антитела, где эта вариабельная

область легкой цепи антитела содержит

1) CDRs с аминокислотными последовательностями SEQ ID NOs: 30-32;

2) CDRs с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 33; или

3) CDRs с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 34;

в частности переменная область легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, или SEQ ID NO: 24;

более конкретно, молекула нуклеиновой кислоты имеет нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 23.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к вектору, который содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения. Вектор настоящего изобретения может представлять собой клонирующий вектор или экспрессионный вектор. В предпочтительном варианте осуществления изобретения вектор настоящего изобретения представляет собой, например, плазмиду, космиду, бактериофаг или тому подобное.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, которая содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, или вектор настоящего изобретения. Такие клетки-хозяева включают в себя без ограничений прокариотические клетки, такие как клетки *E.coli*, и эукариотические клетки, такие как клетки дрожжей, клетки насекомых, растительные клетки и животные клетки (такие как клетки млекопитающих, включая мышечные клетки, клетки человека или тому подобное). Клетки настоящего изобретения также могут представлять собой клеточную линию, такую как клетки 293T.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения моноклонального антитела или его

антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, данный способ включает в себя этапы культивирования клетки-хозяина настоящего изобретения в подходящих условиях и выделения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из культуры клеток.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к конъюгату, который содержит моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и конъюгированную молекулу, где моноклональное антитело представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, и конъюгированная молекула представляет собой детектируемую метку. В частности, конъюгированная молекула представляет собой радиоизотоп, флуоресцентное вещество, люминесцентным вещество, хромогенное вещество или фермент (например, пероксидазу хрена).

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к набору реагентов, который содержит моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, или конъюгат настоящего изобретения; в частности набор реагентов дополнительно включает в себя второе антитело, которое специфично распознает указанное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; при необходимости указанное второе антитело дополнительно содержит детектируемую метку, например, радиоизотоп, флуоресцентное вещество, люминесцентным вещество, хромогенное вещество или фермент (например, пероксидазу хрена).

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения в приготовлении набора реагентов, который применяется для обнаружения наличия или уровня CTLA4 в образце.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, которая содержит моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, или конъюгат настоящего изобретения; при необходимости она дополнительно

содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, или конъюгата настоящего изобретения в приготовлении лекарственного препарата для применения в профилактике и/или терапии и/или адъювантной терапии и/или диагностике опухоли; в частности, опухоли, выбранной из меланомы, опухоли почки/рака почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака желудочно-кишечного тракта и опухоли печени/рака печени.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, или конъюгата настоящего изобретения в приготовлении следующего агента:

агента, который обнаруживает наличие или уровень CTLA4 в образце,

агента, который блокирует связывание CTLA4 с B7,

агента, который регулирует (например, подавляет) активность CTLA4 или уровень CTLA4,

агента, который снимает иммуносупрессию организма CTLA4,

агента, который активирует Т-лимфоциты, или

агента, который повышает уровень экспрессии IL-2 в Т-лимфоцитах.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к *in vivo* или *in vitro* способу, включающему в себя этап введения в клетки эффективного количества моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, или конъюгата настоящего изобретения, где это способ выбран из следующих способов:

способ обнаружения наличия или уровня CTLA4 в образце,

способ блокирования связывания CTLA4 с B7,

способ регуляции (например, подавления) активности CTLA4 или уровня CTLA4,

способ снятия иммуносупрессии организма CTLA4,
способ активации Т-лимфоцитов, или
способ повышения уровня экспрессии IL-2 в Т-лимфоцитах.

Такие способы могут применяться для диагностических или терапевтических целей или недиагностических или нетерапевтических целей (например, в тех случаях, когда образец представляет собой образец клеток, а не образец, полученный от пациента).

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу профилактики и/или терапии и/или адъювантной терапии и/или диагностики опухоли, включающему в себя введение субъекту эффективного количества моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, или конъюгата настоящего изобретения; в частности, опухоли, выбранной из меланомы, опухоли почки/рака почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака желудочно-кишечного тракта и опухоли печени/рака печени.

В настоящем изобретении, если не указано иное, используемые здесь научные и технические термины имеют то же значение, которое обычно понимается специалистами в данной области техники. Кроме того, используемые здесь способы культивирования клеток, молекулярной генетики, химии нуклеиновых кислот, иммунологии являются методиками, широко используемыми в данной области техники. В то же время, для лучшего понимания настоящего изобретения ниже приводятся определения и пояснения соответствующих терминов.

В настоящем описании при упоминании аминокислотной последовательности белка CTLA4 (ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами антиген 4) этот термин включает в себя полноразмерный белок CTLA4 или внеклеточный фрагмент CTLA4 CTLA4ECD (SEQ ID NO: 2), или фрагмент, содержащий CTLA4ECD; Он также включает в себя слитый белок CTLA4ECD, например, фрагмент, слитый с фрагментом Fc-белка мышинного IgG (mFc) (SEQ ID NO: 3). Однако, как понятно специалистам в данной области техники, мутация или изменение (включая без ограничений замену, делецию

и/или добавление) могут возникнуть естественным образом или могут быть искусственно введены в аминокислотную последовательность белка CTLA4 без нарушения его биологических функций. Таким образом, в настоящем изобретении термин «белок CTLA4» включает в себя все такие последовательности, в том числе последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, а также ее нативный или искусственный варианты. Кроме того, при упоминании фрагмента последовательности белка CTLA4 этот термин включает в себя не только фрагмент последовательности SEQ ID NO: 2, но также он включает в себя соответствующие фрагменты последовательности нативного или искусственного вариантов.

Используемый здесь термин «B7», если специально не указано иное, относится к B7-1 и/или B7-2; их конкретные белковые последовательности принадлежат к числу последовательностей, известных из уровня техники. Ссылка может быть сделана на последовательности, раскрытые в литературе предшествующего уровня техники или в базе данных GenBank, например, B7-1 (CD80, NCBI Gene ID: 941), B7-2 (CD86, NCBI Gene ID: 942).

Используемый здесь термин «EC₅₀» относится к концентрации, обладающей 50% от максимального эффекта, т.е. концентрации, обеспечивающей 50% максимального эффекта.

Используемый здесь термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, которая, как правило, состоит из двух пар полипептидных цепей (каждая пара имеет «легкую» (L) цепь и «тяжелую» (H) цепь). Легкие цепи антитела могут быть классифицированы как κ и λ легкая цепь. Тяжелые цепи могут быть классифицированы как μ , δ , γ , α или ϵ , и изотипы антител определяют как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. Внутри легкой цепи и тяжелой цепи переменная область и константная область соединяются через область «J», состоящую из примерно 12 или более аминокислот, и тяжелая цепь дополнительно содержит область «D», состоящую из примерно 3 или более аминокислот. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (V_H) и константной области тяжелой цепи (C_H). Константная область тяжелой цепи состоит из 3 доменов (C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая

цепь состоит из переменной области легкой цепи (V_L) и константной области легкой цепи (C_L). Константная область легкой цепи состоит из домена C_L . Константная область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами организма-хозяина, в том числе с различными клетками иммунной системы (например, эффекторными клетками) и первым компонентом классической системы комплемента ($C1q$). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области, обладающие высокой переменной (именуемые определяющее комплементарность области (CDRs)), разделенные областями, именуемыми каркасные области (FR), которые являются относительно консервативными. Каждая V_H или V_L состоит из 3 CDRs и 4 FR, расположенных в следующем порядке от аминокислотного конца к карбоксикислотному концу: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области (V_H и V_L) каждой пары тяжелая цепь/легкая цепь образуют антигенсвязывающий сайт, соответственно. Отнесение аминокислот к каждой области или домену осуществляется в соответствии с определением, данным в Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), или Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342: 878-883. Термин «антитело» не ограничивается каким-либо конкретным способом получения антитела. Например, он, в частности, включает в себя рекомбинантные антитела, моноклональные антитела и поликлональные антитела. Антитела могут представлять собой антитела различных изотипов, например, антитела IgG (например, субтипы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM.

Используемый здесь термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела относится к полипептиду, содержащему фрагмент полноразмерного антитела, который сохраняет способность специфично связываться антигеном, с которым связывается это полноразмерное антитело, и/или конкурировать с этим полноразмерным антителом за специфичное связывание с антигеном. Также этот фрагмент именуется как «антигенсвязывающая часть». Общее описание см. в книге Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul,

W., ed., Second Edition, Raven Press, N.Y. (1989)), которая полностью включена в настоящее изобретение путем ссылки для всех целей. Антигенсвязывающие фрагменты антител могут быть получены при помощи технологии рекомбинантных ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных антител. В некоторых случаях антигенсвязывающие фрагменты включают в себя фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, фрагмент определяющей комплементарности области, одноцепочечное антитело (например, scFv), гибридное антитело, диатело и такие полипептиды, которые содержат, по меньшей мере, часть антитела, достаточную для придания данному полипептиду способности специфично связываться с антигеном.

Используемый здесь термин «Fd-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_H и C_{H1}; термин «Fv-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_L и V_H одного плеча антитела; термин «dAb-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из домена V_H (Ward et al., Nature 341: 544-546 (1989)); термин «Fab-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_L, V_H, C_L и C_{H1}; и термин «F(ab')₂-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из двух Fab-фрагментов, соединенных дисульфидными мостиками на шарнирной области.

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой одноцепочечное антитело (например, scFv), где домены V_L и V_H соединены друг с другом через линкер, который позволяет получить одну полипептидную цепь с образованием моновалентной молекулы (см., например, Bird et al., Science 242: 423-426 (1988) и Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988)). Такие молекулы scFv могут иметь общую структуру NH₂-V_L-Линкер-V_H-COOH или NH₂-V_H-Линкер-V_L-COOH. Подходящие линкеры, известные из уровня техники, состоят из повторяющейся аминокислотной последовательности GGGGS или ее вариантов. Например, может быть использован линкер, имеющий аминокислотную последовательность (GGGGS)₄, но также могут быть использованы и его варианты (Holliger et al. (1993) Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 90: 6444-6448). Другие линкеры, пригодные для использования в настоящем изобретении, описаны в Alfthan et al. (1995) Protein Eng. 8: 725-731; Choi et al. (2001) Eur. J. Immunol. 31: 94-106; Hu et al. (1996) Cancer Res. 56: 3055-3061; Kipriyanov et al. (1999) J. Mol. Biol. 293: 41-56 и Roovers et al. (2001) Cancer Immunol.

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой диатело (бивалентное антитело), где домены V_H и V_L экспрессируются на одной полипептидной цепи. Однако используемый линкер является слишком коротким, и эти два домена на одной и той же цепи не могут образовывать пару друг с другом, и вынуждены образовывать пару с комплементарным доменом на другой цепи. Благодаря этому образуются два антигенсвязывающих сайта (см., например, Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) and Poljak R. J. et al., Structure 2: 1121-1123 (1994)).

Антигенсвязывающие фрагменты антител (например, вышеуказанные фрагменты антител) могут быть получены из указанных антител (например, из моноклонального антитела 8D2, описанного в настоящем изобретении) при помощи стандартных методов, известных специалистам в данной области техники (например, технологии рекомбинантных ДНК или способа ферментативного или химического расщепления), и могут быть подвергнуты скринингу на специфичность теми же способами, что и интактные антитела.

В настоящем изобретении, если из контекста явным образом не следует иное, термин «антитело» включает в себя не только интактные антитела, но также и антигенсвязывающие фрагменты антител.

Используемый здесь термин «mAb» или «моноклональное антитело» относится к антителу или фрагменту антитела из группы в высокой степени однородных молекул антител, т.е. отдельные антитела, составляющие группу, являются идентичными за исключением возможных естественных мутаций. Моноклональные антитела являются высоко специфичными по отношению к одному эпитопу антигена. В отличие от моноклональных антител, препараты

поликлональных антител, как правило, включают в себя, по меньшей мере, два или несколько типов различных антител, распознающих различные эпитопы антигена. Моноклональные антитела, как правило, могут быть получены с использованием технологии гибридом, впервые описанной в Kohler et al. (Nature, 256: 495, 1975), или могут быть получены при помощи технологии рекомбинантных ДНК (см., например, Патент США No.4816567).

В настоящем изобретении моноклональное антитело с номером является идентичным моноклональному антителу, полученному из гибридомы с тем же номером. Например, моноклональное антитело 8D2 является идентичным антителу, полученному из гибридной клеточной линии 8D2 или ее субклонов или дочерних клеток.

Используемый здесь термин «гибридное антитело» относится к такому антителу, в котором часть легкой цепи и/или тяжелой цепи получена из одного антитела (которое может быть получено из конкретного вида или принадлежать к конкретному классу или подклассу антител), в то время как другая часть легкой цепи и/или тяжелой цепи получена из другого антитела (которое может быть получено из идентичного или другого вида или принадлежать к идентичному или другому классу или подклассу антител), при условии, что оно сохраняет активность связывания с целевым антигеном (Патент США No.4816567, выданный Cabilly et al.; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)).

Используемый здесь термин «гуманизированное антитело» относится к антителу или фрагменту антитела, полученному после замены всех или нескольких CDRs иммуноглобулина человека (антитело-реципиент) CDRs нечеловеческого антитела (антитело-донор), где антитело-донор может представлять собой нечеловеческое (например, мышинное, крысиное или кроличье) антитело, обладающее желаемой специфичностью, аффинностью или реактивностью. Кроме того, некоторые аминокислотные остатки каркасных областей (FRs) антитела-реципиента могут быть заменены соответствующими аминокислотными остатками нечеловеческого антитела или аминокислотными остатками других антител с целью дополнительного улучшения или оптимизации характеристик

антитела. Более подробную информацию о гуманизированных антителах см., например, в Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992); и Clark, *Immunol. Today* 21: 397-402 (2000).

Используемый здесь термин «нейтрализующее антитело» относится к антителу или фрагменту антитела, которое способно устранять или значительно уменьшать вирулентность целевого вируса (например, его способность инфицировать клетки).

Используемый здесь термин «эпитоп» относится к части антигена, специфично связывающейся с иммуноглобулином или антителом. В данной области техники «эпитоп» также называется «антигенной детерминантой». Эпитоп или антигенная детерминанта, как правило, состоит из химически активных поверхностных групп молекулы, например, аминокислот или углеводных соединений или углеводных боковых цепей, и, как правило, обладает специфичными характеристиками трехмерной структуры и специфичными свойствами заряда. Например, эпитоп, как правило, содержит, по меньшей мере, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 последовательных или непоследовательных аминокислот в пространственной конформации, определяемой расстоянием между ними. Это может быть «линейный» или «конформационный» эпитоп. См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996). В линейном эпитопе все точки взаимодействия между белком и взаимодействующей молекулой (например, антителом) расположены по первичной аминокислотной последовательности белка линейно. В конформационном эпитопе взаимодействующие точки образованы связанными мостиками аминокислотными остатками белка, которые удалены друг от друга.

Используемый здесь термин «выделенный» означает полученный из нативного состояния искусственным путем. Если «выделенное» вещество или компонент встречается в природе, то вероятно, что его естественное окружение было изменено, или вещество было выделено из естественного окружения или и то, и другое. Например, невыделенные полинуклеотиды или полипептиды в природе

находятся в живых организмах *in vivo*, и идентичные полинуклеотиды или полипептиды высокой чистоты, выделенные из такого естественного состояния, описываются как «выделенные». Термин «выделенный» не исключает смесь с искусственными или синтетическими веществами и не исключает наличие других примесей, которые не оказывают влияния на активность вещества.

Используемый здесь термин «экспрессионная система *E.coli*» относится к экспрессионной системе, состоящей из *E.coli* (штамм) и вектора, где *E.coli* (штамм) получен из коммерчески доступных штаммов, например, но без ограничений, GI698, ER2566, BL21(DE3), B834(DE3) и BLR(DE3).

Используемый здесь термин «вектор» относится к несущей нуклеиновую кислоту системе, в которую может быть встроен полинуклеотид. Когда вектор обеспечивает экспрессию белка, кодируемого встроенным полинуклеотидом, этот вектор называется экспрессионным вектором. Вектор может быть введен в клетку-хозяин путем трансформации, трансдукции или трансфекции, таким образом, что генетический компонент, содержащийся в этом векторе, экспрессируется в клетке-хозяине. Векторы, хорошо известные специалистам в данной области техники, включают в себя без ограничений плазмиду; фатмиду; космиду; искусственную хромосому, например, искусственную хромосому дрожжей (YAC), бактериальную искусственную хромосому (BAC) или искусственную хромосому на основе бактериальной P1-плазмиды (PAC); бактериофаг, например, фаг λ или фаг M13, а также, вирус животных и тому подобное. Вирусы животных, которые могут быть использованы в качестве вектора, включают в себя без ограничений ретровирус (в том числе лентивирус), аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус герпеса (например, вирус простого герпеса), поксвирус, бакуловирус, вирус папилломы, паповавирус (например, SV40). Вектор может содержать несколько компонентов для контроля экспрессии, включающих в себя без ограничений промоторную последовательность, последовательность инициации транскрипции, энхансерную последовательность, селекционный компонент и репортерный ген. Кроме того, вектор также может

содержать сайт инициации репликации.

Используемый здесь термин «клетка-хозяин» относится к клеткам, которые могут быть использованы для введения вектора. Эти клетки включают в себя без ограничений прокариотические клетки, такие как *E.coli* или *Bacillus subtilis*, клетки грибов, такие как клетки дрожжей или *Aspergillus*, клетки насекомых, такие как клетки дрозофилы S2 или Sf9, или клетки животных, такие как фибробласты, клетки CHO, клетки COS, клетки NSO, клетки HeLa, клетки ВНК, клетки HEK 293 или клетки человека.

Используемый здесь термин «идентичность» предназначен для описания совпадения последовательности между двумя полипептидами или между двумя нуклеиновыми кислотами. Когда соответствующие положения в двух сравниваемых последовательностях заняты одинаковыми мономерными субъединицами (основаниями или аминокислотами) (например, соответствующие положения в двух молекулах ДНК оба заняты аденином, или соответствующие положения в двух полипептидах оба заняты лизином), эти молекулы являются идентичным в этом положении. «Процент идентичности» между двумя последовательностями представляет собой следующую функцию: число совпадающих положений для этих двух последовательностей, разделенное на число сравниваемых положений $\times 100$. Например, если 6 из 10 положений в двух последовательностях совпадают, то эти две последовательности имеют 60% идентичности. Например, ДНК последовательности CTGACT и CAGGTT имеют 50% идентичности (в общей сложности совпадают 3 из 6 положений). Как правило, две последовательности сравнивают после выравнивания для получения максимальной идентичности. Например, такое выравнивание удобно проводить с использованием компьютерной программы, например, программы Align (DNASTar, Inc.), способом, описанным в Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453. Кроме того, алгоритм E. Meyers and W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17 (1988)), включенный в программу ALIGN (версия 2.0) может быть использован для определения процента идентичности между двумя аминокислотными последовательностями, с применением таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за продление гэпа 12 и

штрафа за гэп 4. Кроме того, алгоритм Needleman and Wunsch (J MoI Biol. 48: 444-453 (1970)), включенный в программу GAP из пакета GCG (доступного на сайте www.gcg.com), может быть использован для определения процента идентичности между двумя аминокислотными последовательностями, с применением матрицы Blossum 62 или матрицы PAM250, веса гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса продолжения гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Используемый здесь термин «консервативная замена» относится к аминокислотным заменам, которые не оказывают отрицательного влияния или не изменяют существенных свойств белка/полипептида, содержащего эту аминокислотную последовательность. Например, консервативные замены могут быть введены при помощи стандартных методов, известных из уровня техники, таких как сайт-направленный мутагенез, ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замены включают в себя замены, при которых аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь, например, остатком, аналогичным соответствующему аминокислотному остатку с точки зрения физических свойств или функции (например, имеющий сходный размер, форму, заряд, химические свойства, в том числе способность образовывать ковалентную связь или водородную связь, или тому подобное). Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи определены в соответствующей области техники. Эти семейства включают в себя аминокислоты, имеющие основную боковую цепь (например, лизин, аргинин и гистидин), кислотную боковую цепь (например, аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота), незаряженную полярную боковую цепь (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин и триптофан), неполярную боковую цепь (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин и метионин), бета-разветвленную боковую цепь (например, треонин, валин и изолейцин) и ароматическую боковую цепь (например, тирозин, фенилаланин, триптофан и гистидин). Таким образом, предпочтительной является замена соответствующего аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком из того же семейства боковой цепи. Способы идентификации консервативных

аминокислотных замен хорошо известны из уровня техники (см., например, Brummell et al., Biochem., 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al., Protein Eng. 12(10): 879-884 (1999); и Burks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 412-417 (1997), которые включены в настоящее изобретение путем ссылки).

Используемый здесь термин «иммуногенность» относится к способности стимулировать организм вырабатывать специфичные антитела или сенсibilизировать лимфоциты. Он относится не только к свойствам антигена, который может стимулировать конкретные иммунные клетки таким образом, чтобы индуцировать активацию, пролиферацию и дифференциацию иммунных клеток, и в конечном итоге продуцирование иммунных эффекторных веществ, таких как антитела, и может сенсibilизировать лимфоциты, но также относится к специфичным иммунным реакциям иммунной системы организма, вызывающим продуцирование антител или сенсibilизированных Т-лимфоцитов после стимуляции организма антигеном. Иммуногенность является наиболее важным свойством антигена. Сможет ли антиген успешно индуцировать иммунный ответ в организме хозяина зависит от трех факторов: природы антигена, реактивности организма хозяина и способа иммунизации.

Используемый здесь термин «специфичное связывание» относится к неслучайным реакциям связывания между двумя молекулами, такими как реакция между антителом и его целевым антигеном. В некоторых вариантах осуществления изобретения специфичное связывание антитела с антигеном (или антитело специфично по отношению к антигену) означает, что антитело связывается с антигеном с аффинностью (K_D) менее чем примерно 10^{-5} М, например, менее чем примерно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или меньше.

Используемый здесь термин « K_D » относится к константе равновесия диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, который используется для описания аффинности связывания между антителом и антигеном. Чем меньше константа равновесия диссоциации, тем сильнее связывание антитела с антигеном, и тем выше аффинность между антителом и антигеном. Как правило, антитело (например, моноклональное антитело 8D2 настоящего

изобретения) связывается с антигеном (например, белком L1) с константой равновесия диссоциации (K_D) меньшей, чем примерно 10^{-5} М, например, менее чем примерно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или меньше, например, как определено при помощи поверхностного плазмонного резонанса (ППР) на приборе BIACORE.

Используемые здесь термины «моноклональное антитело» и «mAb» имеют одно и то же значение и могут быть использованы взаимозаменяемо. Также термины «поликлональное антитело» и «pAb» имеют одно и то же значение и могут быть использованы взаимозаменяемо. Также термины «полипептид» и «белок» имеют одно и то же значение и могут быть использованы взаимозаменяемо. Кроме того, в настоящем изобретении аминокислоты, как правило, обозначаются однобуквенными или трехбуквенными аббревиатурами, хорошо известными в данной области техники. Например, аланин может быть обозначен как А или Ala.

Используемые здесь термины «гибридома» и «гибридная клеточная линия» могут быть использованы взаимозаменяемо. Кроме того, при упоминании термина «гибридома» или «гибридная клеточная линия» он также включает в себя субклоны и дочерние клетки гибридной клеточной линии 4В3.

Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемый вектор и/или вспомогательное вещество» относится к вектору и/или вспомогательному веществу, совместимому с субъектом и активным компонентом в фармакологии и/или физиологии, которые хорошо известны в данной области техники (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), и включает в себя без ограничений: регулирующий pH агент, поверхностно-активное вещество, адъювант, усилитель ионной интенсивности. Например, регулирующий pH агент включает в себя без ограничений фосфатный буфер; поверхностно-активное вещество включает в себя без ограничений катионной, анионное или неионное поверхностно-активное вещество, например Твин-80; и усилитель ионной интенсивности включает в себя без ограничений хлорид натрия.

Используемый здесь термин «адъювант» относится к неспецифичному усилителю иммунитета, который может усиливать

иммунный ответ организма на антиген или изменять тип иммунного ответа при введении в организм вместе с антигеном или до введения антигена. Существует много адъювантов, включая без ограничений алюминиевый адъювант (например, гидроксид алюминия), адъювант Фрейнда (например, полный адъювант Фрейнда и неполный адъювант Фрейнда), липополисахарид *Corynebacterium parvum*, цитокин и тому подобное. Адъювант Фрейнда наиболее широко применяется в экспериментах на животных в настоящее время, а гидроксид алюминия широко используется в клинических испытаниях.

Используемый здесь термин «эффективное количество» относится к количеству, достаточному для достижения или, по меньшей мере, частичного достижения желаемых эффектов. Например, термин «профилактически эффективное количество» для заболевания (например, заболевания, связанного с избыточным связыванием CTLA4 с B7 или активностью CTLA4, такого как опухоль) относится к количеству, достаточному для предотвращения, купирования или задержки развития заболевания (например, заболевания, связанного с избыточным связыванием CTLA4 с B7 или активностью CTLA4, такого как опухоль); и термин «терапевтически эффективное количество» для заболевания относится к количеству, достаточному для лечения или, по меньшей мере, частичного купирования заболевания и его осложнений у пациента, страдающего этим заболеванием. Определение такого эффективного количества находится в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Например, терапевтически эффективное количество будет зависеть от тяжести подлежащего лечению заболевания, общего состояния иммунной системы пациента, общего состояния пациента, например, возраста, массы тела и пола, способа введения агента, других видов терапии, проводимых одновременно, и тому подобного.

Полезный эффект изобретения

Моноклональное антитело 8D2 и его гуманизированные антитела настоящего изобретения могут очень хорошо и специфически связываться с CTLA4. Из них, антитела 8D2 и 8D2(Re) связываются с мышинным антигеном CTLA4 с эффективностью связывания лучшей, чем у контрольных антител 10D1 (Alan J. Korman, Edward L. Halk, et al., HUMAN CTLA-4 ANTIBODIES, Патент США No.US6984720B1) и

11.2.1 (Douglas Charles Hanson, Mark Joseph Neveu, et al., Human monoclonal antibodies to CTLA-4, Патент США No.US682736B1). Гуманизированное антитело 8D2H1L1 связывается с мышинным антигеном CTLA4 с эффективностью связывания лучшей, чем контрольное антитело 10D1, и сравнимой с 11.2.1. Гуманизированное антитело 8D2H2L2 связывается с антигеном CTLA4 человека с эффективностью связывания, сравнимой с 10D1. Гуманизированные антитела 8D2H2L2 и 8D2H3L3 связываются с антигеном CTLA4 обезьяны с эффективностью связывания, сравнимой с 10D1. Антитела 8D2H2L15 и 8D2H2L17 связываются с антигеном CTLA4 человека с эффективностью связывания лучшей, чем контрольные антитела 10D1 и 11.2.1.

Антитела 8D2, 8D2(Re) и гуманизированные антитела 8D2 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 и 8D2H2L17 могут конкурировать с B7 за связывание с антигеном CTLA4. Из них, 8D2, 8D2(Re), 8D2H1L1 и 8D2H2L2 сильнее, чем 10D1 конкурируют с B7-2 за связывание с CTLA4; и 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 и 8D2H2L17 все сильнее, чем антитела 10D1 и 11.2.1 конкурируют с B7-1 и B7-2 за связывание с CTLA4.

Моноклональное антитело 8D2 и его гуманизированные антитела настоящего изобретения могут блокировать связывание CTLA4 с B7, в частности, облегчая иммуносупрессию организма CTLA4 и активируя Т-лимфоциты с высокой степенью эффективности. Из них, 8D2H2L2 и 8D2H2L15 сильнее, чем контрольные антитела 10D1 и 11.2.1 активируют Т-лимфоциты.

Краткое описание чертежей

Фигура 1. Результаты ДСН-ПААГ-электрофореза слитого белка CTLA4ECD-mFc. Образцы и их наносимые количества в 4 дорожках слева направо: М, маркер, 10 мкл; слитый белок CTLA4ECD-mFc, 1 мкг; слитый белок CTLA4ECD-mFc, 2 мкг; слитый белок CTLA4ECD-mFc, 3 мкг.

Фигура 2. Результаты ДСН-ПААГ-электрофореза антитела 8D2. Образцы и их наносимые количества в 4 дорожках слева направо: М, маркер, 10 мкл; образец антитела в восстанавливающем буфере для нанесения для белкового электрофореза, 0,3 мкг; невосстанавливающий буфер для нанесения для белкового

электрофореза, 2 мкл; образец антитела в невозстанавливающем буфере для нанесения для белкового электрофореза, 0,3 мкг.

Фигура 3. Результаты ДСН-ПААГ-электрофореза рекомбинантного антитела 8D2 (8D2(Re)). Образцы и их наносимые количества в 4 дорожках слева направо: М, маркер, 10 мкл; образец антитела в восстанавливающем буфере для нанесения для белкового электрофореза, 1 мкг; невозстанавливающий буфер для нанесения для белкового электрофореза, 2 мкл; образец антитела в невозстанавливающем буфере для нанесения для белкового электрофореза, 1 мкг.

Фигура 4. Результаты ДСН-ПААГ-электрофореза рекомбинантного антитела 8D2, 8D2H1L1. Образцы и их наносимые количества в 4 дорожках слева направо: М, маркер, 10 мкл; образец антитела в восстанавливающем буфере для нанесения для белкового электрофореза, 1 мкг; невозстанавливающий буфер для нанесения для белкового электрофореза, 2 мкл; образец антитела в невозстанавливающем буфере для нанесения для белкового электрофореза, 1 мкг.

Фигура 5. Результаты ДСН-ПААГ-электрофореза рекомбинантного антитела 8D2, 8D2H2L2. Образцы и их наносимые количества в 4 дорожках слева направо: М, маркер, 10 мкл; образец антитела в восстанавливающем буфере для нанесения для белкового электрофореза, 1 мкг; невозстанавливающий буфер для нанесения для белкового электрофореза, 2 мкл; образец антитела в невозстанавливающем буфере для нанесения для белкового электрофореза, 1 мкг.

Фигура 6. Результаты ДСН-ПААГ-электрофореза рекомбинантного антитела 8D2, 8D2H3L3. Образцы и их наносимые количества в 4 дорожках слева направо: М, маркер, 10 мкл; образец антитела в восстанавливающем буфере для нанесения для белкового электрофореза, 1 мкг; невозстанавливающий буфер для нанесения для белкового электрофореза, 2 мкл; образец антитела в невозстанавливающем буфере для нанесения для белкового электрофореза, 1 мкг.

Фигура 7. Результаты ДСН-ПААГ-электрофореза рекомбинантного антитела 8D2, 8D2H2L15. Образцы и их наносимые количества: М,

маркер, 10 мкл; образец антитела в невосстанавливающем буфере для нанесения для белкового электрофореза, 1 мкг; образец антитела в восстанавливающем буфере для нанесения для белкового электрофореза, 1 мкг.

Фигура 8. Результаты ДСН-ПААГ-электрофореза рекомбинантного антитела 8D2, 8D2H2L17. Образцы и их наносимые количества: М, маркер, 10 мкл; образец антитела в невосстанавливающем буфере для нанесения для белкового электрофореза, 1 мкг; образец антитела в восстанавливающем буфере для нанесения для белкового электрофореза, 1 мкг.

Фигура 9. Результаты определения динамических характеристических параметров mAb 8D2.

Фигура 10. Результаты определения динамических характеристических параметров 8D2H1L1.

Фигура 11. Результаты определения динамических характеристических параметров 8D2H2L2.

Фигура 12. Результаты определения динамических характеристических параметров 8D2H3L3.

Фигура 13. Результаты определения динамических характеристических параметров 8D2H2L15.

Фигура 14. Результаты определения динамических характеристических параметров 8D2H2L17.

Фигура 15. Гистограмма, показывающая экспрессию CTLA4 на немеченых клетках 293F, в изотипическом контроле и клетках 293F-CTLA4, как определено при помощи проточной цитометрии (количество клеток – флуоресценция (ФИТЦ)).

Фигура 16. Средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) экспрессии CTLA4 на немеченых клетках 293F, в изотипическом контроле и клетках 293F-CTLA4, как определено при помощи проточной цитометрии.

Фигура 17. Результаты EC_{50} связывания mAb 8D2 с мечеными клетками 293F-CTLA4.

Фигура 18. Результаты EC_{50} связывания антитела 8D2 (Re) с мечеными клетками 293F-CTLA4.

Фигура 19. Результаты EC_{50} связывания 8D2H1L1 с мечеными клетками 293F-CTLA4.

Фигура 20. Результаты EC_{50} связывания 8D2H2L2 с мечеными клетками 293F-CTLA4.

Фигура 21. Результаты EC_{50} связывания 8D2H3L3 с мечеными клетками 293F-CTLA4.

Фигура 22. Определение связывания антител 8D2, 8D2H1L1 и 8D2(Re) с CTLA4 с использованием метода ИФА.

Фигура 23. Определение связывания рекомбинантных антител 8D2H2L2 и 8D2H3L3 с CTLA4 человека с использованием метода ИФА.

Фигура 24. Определение связывания рекомбинантных антител 8D2H2L2 и 8D2H3L3 с CTLA4 обезьяны с использованием метода ИФА.

Фигура 25. Определение связывания рекомбинантных антител 8D2H2L15 и 8D2H2L17 с CTLA4 обезьяны с использованием метода ИФА.

Фигура 26. Результаты ИФА для конкурирования антител 8D2, 8D2H1L1 и 8D2(Re) с B7-1.

Фигура 27. Результаты ИФА для конкурирования антител 8D2, 8D2H1L1 и 8D2(Re) с B7-2.

Фигура 28. Результаты ИФА для конкурирования антител 8D2H2L2 и 8D2H3L3 с B7-1.

Фигура 29. Результаты ИФА для конкурирования антител 8D2H2L2 и 8D2H3L3 с B7-2.

Фигура 30. Результаты ИФА для конкурирования антител 8D2H2L15 и 8D2H2L17 с B7-1.

Фигура 31. Результаты ИФА для конкурирования антител 8D2H2L15 и 8D2H2L17 с B7-2.

Фигура 32. Влияние на уровень секреции IL-2 Т-лимфоцитами, определенное при помощи метода ИФА, после совместного культивирования в течение 72 часов с моноклеарными клетками периферической крови (МПК), клетками Раджи и гуманизированными антителами 8D2H1L1, 8D2H2L2 или 8D2H3L3, соответственно. Результаты показывают, что гуманизированные антитела mAb 8D2 повышают секрецию IL-2 Т-лимфоцитами, путем блокирования рецептора CTLA4.

Фигура 33. Влияние на уровень секреции IL-2 Т-лимфоцитами, определенное при помощи метода ИФА, после совместного культивирования в течение 72 часов с моноклеарными клетками

периферической крови (МКПК), клетками Раджи и гуманизированными антителами 8D2H2L15 или 8D2H2L17, соответственно. Результаты показывают, что гуманизированные антитела mAb 8D2 повышают секрецию IL-2 Т-лимфоцитами, путем блокирования рецептора CTLA4.

Фигура 34. Кривая роста опухоли, подкожно трансплантированной модели hu-SCID-raji, получавшей лечение 8D2H2L2.

Конкретные варианты осуществления изобретения

Варианты осуществления настоящего изобретения будут подробно описаны ниже со ссылкой на Примеры. Специалистам в данной области техники будет понятно, что следующие Примеры предназначены только для иллюстрации настоящего изобретения. Их ни при каких обстоятельствах не следует рассматривать как ограничивающие объем изобретения. Примеры, для которых не описаны конкретные методы или условия, выполняли с использованием методов или условий, раскрытых в литературе данной области техники (например, J. Sambrook et al., переведенной Peitang HUANG et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Science Press), или в соответствии с инструкциями к продуктам. Реагенты и инструменты, для которых не указан поставщик, представляют собой обычные продукты, которые являются коммерчески доступными.

В следующих Примерах настоящего изобретения мышей линии BALB/C приобретали у Guangdong Medical Laboratory Animal Center.

В следующих Примерах настоящего изобретения Т-лимфоциты получали от Akeso Biopharma Inc., Zhongshan.

Контрольное антитело 10D1 получали, как описано в Патенте США No.6984720B1; и антитело 11.2.1 получали, как описано в Патенте США No.6682736B1.

Пример 1. Получение CTLA4-8D2 гибридной клеточной линии LT001 и получение моноклонального антитела 8D2

Рекомбинантный CTLA4 экспрессировали в экспрессионной системе клеток млекопитающего для иммунизации им мышей в качестве антигена, и клетки гибридомы получали путем слияния мышинных клеток селезенки с клетками миеломы. Гибридную клеточную линию (CTLA4-8D2 гибридную клеточную линию LT001)

получали после скрининга большого количества образцов. Указанная клеточная линия могла секретировать моноклональное антитело 8D2, которое специфично связывается с CTLA4. Конкретные способы описаны ниже.

1. Синтез гена CTLA4ECD-mFc

В соответствии со схемой строения слитого белка (SEQ ID NO: 3), аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 2), соответствующую внеклеточному фрагменту гена CTLA4 (Ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами антиген 4 NCBI Gene ID: 1493, SEQ ID NO: 1) (CTLA4ECD) сливали с фрагментом Fc-белка мышиного IgG (mFc), где mFc означает фрагмент Fc-белка мышиного IgG с аминокислотной последовательностью, показанной в виде подчеркнутой части в SEQ ID NO: 3.

Для повышения эффективности экспрессии целевого гена в клеточной экспрессионной системе 293f, нуклеотидную последовательность, кодирующую белковую последовательность SEQ ID NO: 3, оптимизировали в Genscript Co., учитывая, главным образом, такие факторы как предпочтительные кодоны, содержание GC, вторичная структура мРНК и повторяющиеся последовательности. Окончательный оптимизированный ген, кодирующий слитый белок CTLA4ECD-mFc, имел следующую последовательность (SEQ ID NO: 4) и был синтезирован в Genscript Co..

Последовательность гена CTLA4ECD (375 п.н.):

**GCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAG
CCGAGGCATCGCCAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCA
AAGCCACTGAGGTCCGGGTGACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAG
CCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATGGGGAAT
GAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGGCACCTCCAG
TGGAATCAAGTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGG
ACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTGGAGCTCATGTACCCACCG
CCATACTACCTGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTAAT
TGATCCAGAACCGTGCCCAGATTCTGAC (SEQ ID NO: 1)**

Последовательность белка, кодируемого CTLA4ECD (125 а.к.):

**AMHVAQPAVVCLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADS
QVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDT
GLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDS (SEQ ID NO:
2)**

Последовательность слитого белка CTLA4ECD-mFc (364 а.к.), где часть CTLA4ECD подчеркнута волнистой линией, а часть mFc подчеркнута жирной линией.

**AMHVAQPAVVCLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADS
QVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDT
GLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDSDENLYFQGPRG
PTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVS
EDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHOD
WMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEM
TKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGS
YFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
(SEQ ID NO: 3)**

Кодирующая последовательность гена, соответствующая слитому белку CTLA4ECD-mFc, (1092 п.н.), где часть CTLA4ECD подчеркнута волнистой линией, а часть mFc подчеркнута жирной линией.

GCAATGCATGTCGCACAGCCTGCAGTGGTCCTGGCAAGCTC
CAGGGGAATCGCTAGCTTCGTGTGCGAATACGCTTCCCCAGGCA
AGGCAACCGAGGTCCGGGTGACAGTCCTGAGACAGGCCGACAG
CCAGGTGACAGAAGTCTGCGCCGCTACTTATATGATGGGCAACG
AGCTGACCTTTCTGGACGATAGCATTTGTACCGGGACATCTAGT
GGAAACCAAGTGAATCTGACCATCCAGGGCCTGCGCGCTATGG
ACACAGGGCTGTACATTTGTAAAGTGGAGCTGATGTATCCCCCT
CCATACTATCTGGGAATCGGCAACGGGACCCAGATCTACGTGAT
TGATCCTGAACCATGCCCCGACTCCGATGAGAATCTGTATTTC
AGGGACCACGAGGGCCCCACAATTAAGCCATGTCCCCCTTGCAA
TGTCCTGCACCAAACCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTTCATCTT
TCCACCCAAGATCAAGGACGTGCTGATGATCTCACTGAGCCCCA
TTGTGACCTGCGTGGTCGTGGACGTGAGCGAGGACGATCCTGA
TGTGCAGATCAGTTGGTTCGTCAACAATGTGGAAGTCCACACAG
CTCAGACTCAGACCCATAGGGAGGATTACAATAGTACTCTGCGC
GTCGTGTCAGCACTGCCCATTCAGCACCAGGACTGGATGAGCG
GCAAGGAGTTCAAGTGCAAAGTGAACAACAAGGATCTGCCCCG
ACCTATCGAGAGAACTATTTCCAAGCCTAAAGGGTCTGTGAGGG
CCCCACAGGTGTATGTCCTGCCTCCACCCGAGGAAGAGATGACT
AAGAAACAGGTGACACTGACTTGTATGGTCACCGACTTCATGCC
CGAAGATATCTACGTGGAGTGGACTAACAATGGGAAGACCGAA
CTGAACTATAAAAATACAGAGCCTGTGCTGGACTCAGATGGAAG
CTACTTTATGTATAGCAAGCTGCGAGTGGAAGAAAGAAACTGGG
TCGAGCGGAACAGCTACTCTTGTAGTGTGGTCCACGAAGGGCTG
CATAATCACCACACCACTAAATCATTCTCCCGAACTCCAGGCAA
A (SEQ ID NO: 4)

2. Получение плазмиды pUC57simple-CTLA4ECD-mFc

Синтезированный слитый ген CTLA4ECD-mFc (SEQ ID NO: 4) клонировали в экспрессионный вектор pUC57simple (предоставленный Genscript Co.) в Genscript Co., получая плазмиду pUC57simple-CTLA4ECD-mFc.

3. Конструирование рекомбинантной плазмиды pcDNA3.1-CTLA4ECD-mFc

Плазмиду pUC57simple-CTLA4ECD-mFc расщепляли эндонуклеазами

XbaI и BamHI. Фрагмент слитого белка CTLA4ECD-mFc выделяли при помощи электрофореза и лигировали в экспрессионный вектор pcDNA3.1 (приобретенный у Invitrogen Co.). Полученную плазмиду pcDNA3.1-CTLA4ECD-mFc использовали для трансфекции компетентных клеток *E.coli* штамма DH5a (приобретены у TIANGEN Co.). Трансфекцию и культивирование проводили в соответствии с инструкциями. Положительные по pcDNA3.1-CTLA4ECD-mFc колонии *E.coli* отбирали и размножали общепринятыми способами. Затем рекомбинантную плазмиду экстрагировали при помощи набора реагентов (приобретенного у Tiangen Biotech (Beijing) Co. LTD, DP103-03) в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к этому набору.

4. Клетки 293F (приобретенные у Invitrogen Co.) трансфицировали рекомбинантной плазмидой pcDNA3.1-CTLA4ECD-mFc с использованием набора реагентов для трансфекции Lipofectamine (приобретенный у Invitrogen Co.).

5. Через семь дней после трансфекции клеток 293F рекомбинантной плазмидой pcDNA3.1-CTLA4ECD-mFc слитый белок CTLA4ECD-mFc выделяли из культуральной жидкости при помощи высокоскоростного центрифугирования, вакуумной фильтрации через микропористую фильтровальную мембрану и хроматографии на колонке HiTrap с белком А НР. После очистки образцы отбирали, добавляли в восстанавливающий буфер для белкового электрофореза и анализировали при помощи ДСН-ПААГ-электрофореза. Как показано на Фигуре 1, целевой белок виден в виде зоны электрофоретической подвижности массой примерно 45 кДа.

6. Получение CTLA4-8D2 гибридной клеточной линии LT001

Используя слитый белок CTLA4ECD-mFc в качестве иммуногена, клетки гибридомы получали путем слияния клеток селезенки иммунизированных мышей линии BALB/C (приобретены у Guangdong Medical Laboratory Animal Center) с мышинными клетками миеломы по стандартному протоколу (например, Stewart, S. J., «Monoclonal Antibody Production», in Basic Methods in antibody Production and Characterization, Eds. G. C. Howard and D. R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000). CTLA4 использовали в качестве антигена для покрытия ИФА-планшета, и клетки гибридомы, секретирующие

новые антитела, специфично связывающиеся с CTLA4, получали путем скрининга при помощи непрямого ИФА. Гибридомные клеточные линии, секретирующие моноклональные антитела, которые конкурируют с лигандом B7-1 (CD80, NCBI Gene ID: 941) или B7-2 (CD86, NCBI Gene ID: 942) за связывание с CTLA4, получали путем скрининга при помощи конкурентного ИФА из клеток гибридомы, полученных на этапе скрининга при помощи непрямого ИФА. Стабильную гибридную клеточную линию получали при помощи лимитирующего разведения. Гибридную клеточную линию обозначали как CTLA4-8D2 гибридная клеточная линия, и CTLA4-8D2 стабильную клеточную линию получали при помощи лимитирующего разведения (также именуемую в настоящем изобретении как LT001; моноклональное антитело, секретируемое этой линией, обозначали как 8D2).

7. Получение антитела 8G2

Клеточную линию CTLA4-8D2 (LT001) настоящего изобретения культивировали в среде, дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки с низким содержанием IgG. Через семь суток супернатант клеточной культуры отбирали для очистки антитела 8G2.

8. Определение антитела 8G2 при помощи ДСН-ПААГ-электрофореза

Очищенные образцы добавляли в восстанавливающий буфер для нанесения для белкового электрофореза и в невосстанавливающий буфер для нанесения для белкового электрофореза. После кипячения проводили обнаружение. Результаты показывают, что целевой белок виден в виде двух зон электрофоретической подвижности размером массой примерно 50 кДа и 25 кДа для образца белка в восстанавливающем буфере, или в виде зоны электрофоретической подвижности массой примерно 150 кДа для образца белка в невосстанавливающем буфере (Фигура 2).

Пример 2 Определение последовательностей легкой цепи и тяжелой цепи моноклонального антитела 8D2

Следуя инструкциям к набору реагентов для ОТ-ПЦР системы синтеза первой цепи SuperScript® III (Invitrogen), синтезировали кДНК и амплифицировали ее при помощи ПЦР. Продукт ПЦР амплификации немедленно подвергали ТА-клонированию по инструкции

к набору реагентов для клонирования pEASY-T1 (TransGen, Cat. No. ST101). Продукты ТА-клонирования немедленно секвенировали, результаты секвенирования приведены ниже.

Результаты секвенирования ДНК вариабельной области тяжелой цепи (345 п.н.):

**GAGGTGAAACTGGACGAACTGGCGGGGGGCTGGTGCAGC
CCGGACGACCTATGAAGCTGTCATGCGTCGCCAGCGGCTTCACC
TTAGCGACAACCTGGATGAATTGGGTGAGGCAGAGCCCAGAGA
AGGGGCTGGAATGGCTGGCTCAGATCCGCAACAAACCTACAAT
TATGAGACCTACTATTCTGACAGTGTGAAGGGCCGGTTCACAAT
TTCCAGAGACGATTCTAAAAGCTCCGTCTACCTGCAGATGAACA
ATCTGAGAGGGCGAAGATATGGGGATCTACTATTGCACAGCACAG
TTCGCTTATTGGGGACAGGGCACTCTGGTCACAGTCTCCGCC
(SEQ ID NO: 5)**

Кодируемая ей белковая последовательность (115 а.к.):

**EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDNWMNWVRQSP
EKGLEWLAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNN
LRGEDMGIYYCTAQFAYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 6)**

Результаты секвенирования ДНК вариабельной области легкой цепи (318 п.н.):

**GACATTCAGATGACACAGAGTCCTGCTTCCCTGAGTGCCTC
AGTGGGGGAGACCGTCACAATCACTTGCGGCACCTCTGAAAACA
TCTACGGCGGGCTGAATTGGTATCAGCGGAAGCAGGGCAAAAG
TCCCCAGCTGCTGATCTTCGGAGCAACAAACCTGGCCGACGGCA
TGAGCTCCCGGTTTAGCGGGTCCGGATCTGGCAGACAGTACAG
CCTGAAGATTTCTAGTCTGCACCCAGACGATGTGGCTACTTACT
ATTGCCAGAATGTCCTGAGGAGTCCCTTCACCTTTGGGTCAGGA
ACAAAGCTGGAGATC (SEQ ID NO: 7)**

Кодируемая ей белковая последовательность (106 а.к.):

**DIQMTQSPASLSASVGETVTITCGTSENIYGGGLNHWYQRKQGKS
PQLLIFGATNLADGMSSRFSGSGSGRQYSLKISSLHPDDVATYYCQN
VLRSPFTFGSGTKLEI (SEQ ID NO: 8)**

Пример 3. Дизайн последовательностей легкой цепи и тяжелой цепи гуманизированных антител 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3,

8D2H2L15 и 8D2H2L17

На основе трехмерной кристаллической структуры белка CTLA4 (Nat. Struct. Biol. (1997) 4, p. 527) и последовательностей антитела 8D2, полученных в Примере 2, структуру антитела моделировали на компьютере. Последовательности вариабельной области антител 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 и 8D2H2L17 были сконструированы на основе последовательностей антитела и структурной модели (последовательности константной области антитела были взяты из базы данных NCBI). Последовательности вариабельной области приведены ниже.

1. Последовательности легкой цепи и тяжелой цепи моноклонального антитела 8D2H1L1

Последовательность ДНК вариабельной области тяжелой цепи (345 п.н.):

**GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGCCTGGTGCAGC
CAGGAGGATCAATGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCACC
TTCAGCGACAACCTGGATGAATTGGGTCAGGCAGGCACCAGGAA
AGGGACTGGAGTGGCTGGCACAGATCCGCAACAAACCTTACAA
CTACGAAACTTACTACAGCGACTCCGTGAAGGGGCGGTTCACCA
TTTCTAGAGACGATTCTAAAAACAGTGTGTACCTGCAGATGAAT
AGCCTGAAGACCGAGGATACAGGAGTCTACTATTGTACCGCACA
GTTTGCTTATTGGGGGCAGGGCACTCTGGTGACAGTCTCTTCA
(SEQ ID NO: 9)**

Кодируемая ей белковая последовательность (115 а.к.):

**EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFSDNWMNWVRQAP
GKGLEWLAQIRNKPYNKYETYYSDSVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNS
LKTEDTGVYYCTAQFAYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 10)**

Последовательность ДНК вариабельной области легкой цепи (321 п.н.):

**GACATTCAGATGACTCAGAGCCCTTCAAGCCTGTCCGCATC
TGTGGGCGACCGAGTCACCATCACATGCAGAACCTCCGAGAACA
TCTACGGCGGGCTGAATTGGTATCAGCGAAAGCAGGGGAAAAG
TCCCAAGCTGCTGATCTACGGGGCAACAAACCTGGCCAGCGGA
ATGAGCTCCAGATTCAGTGGATCAGGCAGCGGGACAGATTATAC
TCTGAAAATTTCTAGTCTGCACCCAGACGATGTGGCAACCTACT
ATTGCCAGAATGTCCTGAGGTCACCCTTCACCTTTGGAAGCGGC
ACAAAACCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 11)**

Кодируемая ей белковая последовательность (107 а.к.):

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRTSENIYGGLNWDYQRKQGKS
PKLLIYGATNLAAGMSSRFSGSGSGTDYTLKISSLHPDDVATYYCQN
VLRSPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 12)**

2. Последовательности легкой цепи и тяжелой цепи 8D2
гуманизированного моноклонального антитела 8D2H2L2

Последовательность ДНК варибельной области тяжелой цепи
(345 п.н.):

**GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGCCTGGTGCAGC
CAGGAGGATCAATGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCACC
TTCAGCGACAACCTGGATGAATTGGGTTCAGGCAGGCACCAGGAA
AGGGACTGGAGTGGCTGGCACAGATCCGCAACAAACCTTACAA
CTACGAAACTTACTACAGCGCCTCCGTGAAGGGGGCGGTTCACCA
TTTCTAGAGACGATTCTAAAAACAGTGTGTACCTGCAGATGAAT
AGCCTGAAGACCGAGGATACAGGAGTCTACTATTGTACCGCACA
GTTTGCTTATTGGGGGCAGGGCACTCTGGTGACAGTCTCTTCA
(SEQ ID NO: 13)**

Кодируемая ей белковая последовательность (115 а.к.):

**EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFSDNWMNWVRQAP
GKGLEWLAQIRNKPYNKYETYYASVKGRFTISRDDSKNSVYLMNS
LKTEDTGVIYCTAQFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14)**

Последовательность ДНК варибельной области легкой цепи
(321 п.н.):

**GACATTCAGATGACTCAGAGCCCTTCAAGCCTGAGTGCCTC
AGTGGGAGACCGGGTCACCATCACATGCAGAACCAGCGAGAAC
ATCTACGGCGGCCTGAACTGGTATCAGCGAAAGCCAGGCAAGA
GCCCCAAGCTGCTGATCTACGGGGCAACCAACCTGGCCTCTGGA
GTGAGCTCCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCTGGGACCGACTATA
CTCTGACCATTTCTAGTCTGCAGCCTGAAGATGTGGCAACATAC
TATTGCCAGAATGTCCTGAGGTCCCCATTACCTTTGGATCTGG
CACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 15)**

Кодируемая ей белковая последовательность (107 а.к.):

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRTSENIYGGLNHWYQRKPGKSP
KLLIYGATNLASGVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQNV
LRSPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 16)**

3. Последовательности легкой цепи и тяжелой цепи 8D2
гуманизированного моноклонального антитела 8D2H3L3

Последовательность ДНК вариабельной области тяжелой цепи
(345 п.н.):

**GAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGAGGCGGCCTGGTGCAGC
CCGGCGGGTCACTGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCAC
CTTCAGCGACAACCTGGATGAATTGGGTGAGGCAGGCACCCGGG
AAGGGGCTGGAGTGGGTGCTCAGATCCGCAACAAACCTTACA
ATTATGAGACAGAATACGCAGCCTCTGTGAAGGGGCGGTTCAC
ATTAGTAGAGACGATAGCAAGAACAGCGCCTATCTGCAGATGAA
TAGCCTGAAGACCGAAGATACAGCCGTCTACTATTGTACAGCTC
AGTTTGCATACTGGGGCCAGGGAACCTCTGGTGACCGTCAGCTCC
(SEQ ID NO: 17)**

Кодируемая ей белковая последовательность (115 а.к.):

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNWMNWVRQAPG
KGLEWVAQIRNKPYNYTEYAASVKGRFTISRDDSKNSAYLQMNSL
KTEDTAVYYCTAQFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 18)**

Последовательность ДНК вариабельной области легкой цепи
(321 п.н.):

**GACATTCAGATGACTCAGAGCCCTTCTTCTCTGTCCGCATCT
GTGGGAGACCGGGTCACCATCACATGCAGAGCCAGCGAGAACA
TCTACGGCGGCCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCAAAGC
TCCCAAGCTGCTGATCTACGGAGCAACCTCCCTGGCATCTGGAG
TGCCATCCCGGTTTCAGTGGATCAGGCAGCGGGACCGACTATACT
CTGACCATTAGCTCCCTGCAGCCTGAAGACTTCGCCACATACTA
TTGCCAGAACGTGCTGAGGTCCCCATTACCTTTGGATCTGGCA
CCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 19)**

Кодируемая ей белковая последовательность (107 а.к.):

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASENIYGGLNWDYQKPGKA
PKLLIYGATSLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQNV
LRSPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 20)**

4. Последовательности легкой цепи и тяжелой цепи 8D2
гуманизированного моноклонального антитела 8D2H2L15

Последовательность ДНК вариабельной области тяжелой цепи
(345 п.н.):

**GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGCCTGGTGC
AGCCAGGAGGATCAATGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGG
CTTCACCTTCAGCGACAACCTGGATGAATTGGGTCAGGCAGG
CACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGCACAGATCCGCAA
CAAACCTTACAACCTACGAACTTACTACAGCGCCTCCGTGA
AGGGGCGGTTCACCATTTCTAGAGACGATTCTAAAAACAGT
GTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAAGACCGAGGATACAGG
AGTCTACTATTGTACCGCACAGTTTGCTTATTGGGGGCAGG
GCACTCTGGTGACAGTCTCTTCA (SEQ ID NO: 13)**

Кодируемая ей белковая последовательность (115 а.к.):

**EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFSDNWMNWVR
QAPGKGLEWLAQIRNKPYNKYETYYSAVKGRFTISRDDSKNSV
YLQMNSLKTEDTGVYYCTAQFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID
NO: 14)**

Последовательность ДНК вариабельной области легкой цепи
(321 п.н.):

**GACATCCAGATGACTCAGTCTCCCAGCTCCCTGTCCGC
TTCTGTGGGCGATCGGGTCACTATCACCTGTAGAACCAGCG
AGAACATTTACGGCGGACTGAATTGGTATCAGAGGAAGCCC
GGGAAAAGTCCTAAGCTGCTGATCTACGGAGCAACAAACCT
GGCCTCCGGCGTGTCTAGTCGCTTCAGTGGATCAGGCAGCG
GGACCGACTATACACTGACTATTTCAAGCCTGCAGCCAGAG
GATGTGGCCACATACTATTGCCAGAATGTCCTGAGCCGGCA
CCCCGGATTTGGCTCAGGGACCAAACCTGGAAATTAAG (SEQ
ID NO: 21)**

Кодируемая ей белковая последовательность (107 а.к.):

**DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRTSENIYGGLNHWYQRKP
GKSPKLLIYGATNLASGVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVAT
YYCQNVLSRHPGFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 22)**

5. Последовательности легкой цепи и тяжелой цепи 8D2
гуманизированного моноклонального антитела 8D2H2L17

Последовательность ДНК вариабельной области тяжелой цепи
(345 п.н.):

**GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGGCCTGGTGC
AGCCAGGAGGATCAATGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGG
CTTCACCTTCAGCGACAACCTGGATGAATTGGGTCAGGCAGG
CACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGCACAGATCCGCAA
CAAACCTTACAACCTACGAACTTACTACAGCGCCTCCGTGA
AGGGGCGGTTACCATTTCTAGAGACGATTCTAAAAACAGT
GTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAAGACCGAGGATACAGG
AGTCTACTATTGTACCGCACAGTTTGCTTATTGGGGGGCAGG
GCACTCTGGTGACAGTCTCTTCA (SEQ ID NO: 13)**

Кодируемая ей белковая последовательность (115 а.к.):

**EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFSDNWMNWVR
QAPGKGLEWLAQIRNKPYNYYETYYASVKGRFTISRDDSKNSV
YLQMNSLKTEDTGVYYCTAQFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID
NO: 14)**

Последовательность ДНК вариабельной области легкой цепи
(321 п.н.):

**GACATCCAGATGACTCAGTCACCCAGCTCCCTGAGTG
CTTCAGTGGGCGATCGGGTCACTATCACCTGTAGAACCAGC
GAGAACATTTACGGCGGACTGAATTGGTATCAGAGGAAGCC
CGGGAAAAGCCCTAAGCTGCTGATCTACGGAGCAACAAACC
TGGCCTCCGGCGTGTCTAGTCGCTTCAGCGGCAGCGGCTCT
GGAACCGACTATACACTGACTATTTCAAGCCTGCAGCCAGA
GGATGTGGCCACATACTATTGCCAGAATGTCCTGTCCTCTC
GACCCGGATTTGGCAGTGGGACCAAACTGGAAATTAAG
(SEQ ID NO: 23)**

Кодируемая ей белковая последовательность (107 а.к.):

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRTSENIYGGLNWFYQRP
GKSPKLLIYGATNLSAGVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVAT
YYCQNVLSSRPGFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 24)**

Пример 4. Получение 8D2 рекомбинантного антитела, 8D2 (Re) и 8D2 гуманизированных антител 8D2H1L1, 8D2H2L3, 8D2H3L3, 8D2H2L15 и 8D2H2L17 и их обнаружение при помощи ДСН-ПААГ-электрофореза

1. Получение 8D2 рекомбинантного антитела, 8D2 (Re) и обнаружение при помощи ДСН-ПААГ-электрофореза

Последовательность кДНК тяжелой цепи (последовательность ее вариабельной области показана в SEQ ID NO: 5) и последовательность кДНК легкой цепи (последовательность ее вариабельной области показана в SEQ ID NO: 7) антитела 8D2 клонировали в вектор pUC57simple (предоставленный Genscript Co.), соответственно, получая плазмиду pUC57simple-8D2H и pUC57simple-8D2L.

Плазмиды pUC57simple-8D2H и pUC57simple-8D2L расщепляли эндонуклеазами (HindIII и EcoRI), соответственно. Фрагменты, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь, выделенные при помощи электрофореза, отдельно субклонировали в вектор pCDNA3.1. Рекомбинантные плазмиды экстрагировали и ко-трансфицировали ими клетки 293F. Через семь дней культивирования клеток культуральную жидкость подвергали высокоскоростному центрифугированию, вакуумной фильтрации через микропористую фильтровальную мембрану и очистке на колонке HiTrap с белком А

НР. Очищенные образцы добавляли в восстанавливающий буфер для нанесения для белкового электрофореза и в невосстанавливающий буфер для нанесения для белкового электрофореза. После кипячения проводили обнаружение при помощи ДСН-ПААГ-электрофореза. Как показано на Фигуре 3, целевой белок виден в виде двух зон электрофоретической подвижности массой примерно 50 кДа и 25 кДа для образца белка в восстанавливающем буфере, или в виде зоны электрофоретической подвижности массой примерно 150 кДа для образца белка в невосстанавливающем буфере.

2. Получение 8D2 гуманизированных антител 8D2H1L1, 8D2H2L2 и 8D2H3L3, и их обнаружение при помощи ДСН-ПААГ-электрофореза

Последовательности кДНК тяжелой цепи (последовательности их вариабельных областей показаны в SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 13, соответственно) и последовательности кДНК легкой цепи (последовательности их вариабельной области показана в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, соответственно) антител 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 и 8D2H2L17 клонировали в вектор pUC57simple (предоставленный Genscript Co.), соответственно, получая плазмиды pUC57simple-8D2H1L1, pUC57simple-8D2H2L2, pUC57simple-8D2H3L3, pUC57simple-8D2H2L15 и pUC57simple-8D2H2L17. Эти плазмиды отдельно субклонировали в вектор pcDNA3.1 по методике, описанной выше для 8D2 (Re).

Рекомбинантными плазмидами ко-трансфицировали клетки 293F. Культуральную жидкость от клеток 293F подвергали детектированию после очистки по методике, описанной выше для 8D2 (Re). Результаты показаны на Фигуре 4, Фигуре 5, Фигуре 6, Фигуре 7 и Фигуре 8. Целевой белок виден в виде двух зон электрофоретической подвижности массой примерно 50 кДа и 25 кДа для образцов белка в восстанавливающем буфере, или в виде зоны электрофоретической подвижности массой примерно 150 кДа для образцов белка в невосстанавливающем буфере.

8D2 рекомбинантное антитело, 8D2 (Re) и 8D2 гуманизированные антитела 8D2H1L1, 8D2H2L3, 8D2H3L3, 8D2H2L15 и 8D2H2L17, используемые в следующих примерах, получали по методике, описанной в этом примере.

Пример 5. Определение динамических параметров антител

Динамические параметры связывания антитела 8D2 и гуманизированных антител 8D2H1L1, 8D2H2L2 и 8D2H3L3 с антигеном CTLA4 (NCBI Gene ID: 1493 с кодирующей нуклеотидной последовательностью, показанной в SEQ ID NO:25, и кодируемой аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO:26) определяли с использованием анализатора молекулярного взаимодействия Fortebio.

1. Белок CTLA4-mFc (CTLA4-mFc получали таким же способом, как описано в Примере 1 для синтеза CTLA4ECD-mFc) расщепляли протеазой TEV, и антиген CTLA4 получали путем очистки на колонке.

Последовательность гена CTLA4 (636 п.н.):

**ATGGGCGTCCTGCTGACTCAGAGAACCCTGCTGTCCCTGGT
GCTGGCACTGCTGTTTCCTTCAATGGCTTCAATGGCTATGCATG
TGGCTCAGCCAGCAGTGGTCCTGGCAAGCTCCAGGGGGGATCGC
CAGTTTCGTGTGCGAGTACGCCTCACCTGGAAAGGCTACAGAAG
TCCGGGTGACTGTCCTGAGACAGGCTGACTCTCAGGTGACCGA
GGTCTGCGCCGCTACATATATGATGGGCAACGAACTGACCTTTC
TGGACGATTCCATTTGTA CTGGCACCTCTAGTGGGAACCAAGTG
AATCTGACTATCCAGGGACTGCGAGCAATGGACACCGGACTGTA
CATTTGCAAAGTGGAGCTGATGTATCCCCCTCCATACTATCTGG
GCATCGGGAATGGAACACAGATCTACGTGATTGATCCCGAACCT
TGTCCAGACAGCGATTTCTGCTGTGGATTCTGGCAGCCGTGTC
AAGCGGCCTGTTCTTTTATAGCTTTCTGCTGACTGCCGTCTCCCT
GTCTAAGATGCTGAAGAAACGATCCCCCTGACCACAGGGGTG
GTCGTGAAAATGCCACCTACCGAGCCCGAGTGCGAAAAACAGTT
CCAGCCATACTTTATCCCTATCAAT (SEQ ID NO: 25)**

Кодируемая ею соответствующая аминокислотная последовательность (212 а.к.):

**MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMAMHVAQPAVVLASSRGI
 ASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFL
 DDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGIG
 NGTQIYVIDPEPCPDSDFLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLK
 KRSPLTTGVVVKMPPTPEPECEKQFQPYFIPIN (SEQ ID NO: 26)**

2. Антитело 8D2 и его гуманизированные антитела 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 и 8D2H2L17 иммобилизовали на поверхности датчика AR2G путем связывания аминокислот, и блокировали этаноламином. После уравнивания в ФСБТ добавляли антиген CTLA4 для связывания. CTLA4 2-кратно серийно разводили в ФСБТ, и получали следующие концентрации: 300, 150, 75, 37,5, 18,75, 9,38, 4,69, 0 нМ. Диссоциация проходила в ФСБТ. Обнаружение гуманизированных антител 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 и 8D2H2L17 проводили таким же способом, что и 8D2, и концентрации антигена составили 180, 90, 45, 22,5, 11,25, 5,625, 2,813, 0 нМ.

Динамические параметры антитела 8D2 и его гуманизированных антител 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 и 8D2H2L17 приведены в Таблице 1, а результаты определения параметров динамических характеристик показаны на Фигурах 9-14, соответственно.

Таблица 1. Динамические параметры антител 8D2, 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 и 8D2H2L17

Название антитела	K_D (М)	k_{on} (1/Мс)	k_{on} Ошибка	k_{dis} (1/с)	k_{dis} Ошибка
8D2	1,66E-10	1,42E+05	1,22E+03	2,36E-05	2,09E-06
8D2H1L1	6,08E-10	3,40E+05	1,17E+04	2,07E-04	1,81E-05
8D2H2L2	9,55E-10	4,07E+05	1,59E+04	3,88E-04	1,60E-05
8D2H3L3	1,05E-09	3,12E+05	1,01E+04	3,27E-04	1,41E-05
8D2H2L15	1,02E-09	4,54E+05	8,18E+03	4,65E-04	9,50E-06
8D2H2L17	7,66E-10	4,59E+05	8,21E+03	3,52E-04	8,30E-06
10D1	1,21E-09	4,67E+05	1,15E+04	5,65E-04	1,51E-05
11.2.1	9,03E-10	3,87E+05	5,46E+03	3,49E-04	7,32E-06

K_D , аффинная константа; k_{on} , скорость ассоциации антиген-антитело; k_{dis} , скорость диссоциации антиген-антитело; $K_D = k_{dis}/k_{on}$.

Эти результаты показывают, что все шесть антител обладают хорошей аффинностью к антигену, сравнимой или даже превышающей

аффинность контрольных антител 10D1 и 11.2.1.

Пример 6. Определение активности антител по связыванию антигена CTLA4 на поверхности гибридной клеточной линии при помощи проточной цитометрии

Сначала получали клетки-хозяева 293F, экспрессирующие антиген CTLA4 и метили их моноклональным антителом 8D2 (Пример 1) и 8D2 (Re) и 8D2 гуманизированными антителами 8D2H1L1, 8D2H2L2 и 8D2H3L3 (Пример 4), полученными в настоящем изобретении, соответственно. Затем способность антител специфично связываться с антигеном, имеющим нативную конформацию, на поверхности клеток оценивали при помощи проточной цитометрии.

Конкретные этапы приводятся ниже.

1. Получение клеток-хозяев 293F, экспрессирующих антиген CTLA4

Клетки 293F трансфицировали плазмидой pLenti6.3-CTLA4 для CTLA4 (вектор pLenti6.3 был приобретен у Invitrogen Co.) с использованием набора реагентов для трансфекции Lipofectamine (приобретен у Invitrogen Co.). После скрининга получали клональную популяцию клеток, стабильно экспрессирующую CTLA4 (293F-CTLA4).

2. Мечение антител и обнаружение при помощи проточного цитометра

Клетки-хозяева 293F, экспрессирующие антиген CTLA4, полученные на вышеуказанных этапах, обрабатывали трипсином по общепринятой методике и 2×10^5 клеток добавляли в каждую пробирку для сбора. Разбавленные растворы антитела 8D2 в ФСБ, содержащем 1% БСА, готовили, чтобы получить концентрации 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 1 нМ, 0,1 нМ, 0,01 нМ и 0 нМ, соответственно. После инкубации клеток 293F, экспрессирующих CTLA4, на льду в течение 2 часов, в каждую пробирку добавляли 100 мкл ФИТЦ-козьего-антимышиного IgG (1:500), и инкубировали эти пробирки на льду в течение 1 часа. После добавления 300 мкл ФСБ, флуоресцентный сигнал регистрировали, используя ФИТЦ-канал проточного цитометра. Обнаружение других антител проводили таким же способом, как обнаружение антитела 8D2.

3. Результаты

Результаты оценки экспрессии CTLA4 на клетках 293F-CTLA4 показаны на Фигуре 15 и Фигуре 16, соответственно. Результаты связывания антител 8D2, 8D2(Re) и трех гуманизированных антител с клетками 293F показаны на Фигурах 17-21, соответственно. Как показано на этих фигурах, антитело 8D2 и его гуманизированные антитела могут эффективно связываться с целевым белком CTLA4 на поверхности клеток-хозяев 293F, и их эффективность связывания имеет дозозависимый характер. Значения интенсивности флуоресценции для каждой дозы приведены в Таблице 2.

Эффективность связывания EC_{50} антитела 8D2 и его гуманизированных антител получали с использованием моделирующей кривой в количественном анализе флуоресценции связанного антитела 8D2 и его гуманизированных антител, которая показана в Таблице 3.

Таблица 2. Анализ интенсивности флуоресценции, определяющий связывание антител 8D2, 8D2(Re) и 8D2 гуманизированных антител 8D2H1L1, 8D2H2L2 и 8D2H3L3 с антигеном CTLA4 на поверхности клеток-хозяев 293F-CTLA4, при помощи проточной цитометрии.

	8D2	8D2 (Re)	8D2H1L1	8D2H2L2	8D2H3L3
Концентрация (нМ)	Интенсивность флуоресценции				
0,001	7,60	24,62	10,84	10,85	10,85
0,01	7,70	24,72	10,85	32,48	25,14
0,1	9,10	66,72	21,25	124,03	108,29
1	25,50	321,27	103,04	624,65	623,25
5	182,60	713,87	558,75	972,03	970,80
10	638,60	897,63	943,84	1159,24	1084,74
25	721,80	873,24	1170,64	1132,39	1091,77

Таблица 3. Эффективность связывания EC_{50} антител 8D2, 8D2(Re) и 8D2 гуманизированных антител 8D2H1L1, 8D2H2L2 и 8D2H3L3 с антигеном CTLA4 на поверхности клеток-хозяев 293F-CTLA4, полученная с использованием моделирующей кривой в анализе при помощи проточной цитометрии

	8D2	8D2 (Re)	8D2H1L1	8D2H2L2	8D2H3L3
EC_{50} (нМ)	3,84	1,38	5,06	4,37	4,54

Эти результаты показывают, что антитела 8D2, 8D2(Re) и 8D2 гуманизированные антитела 8D2H1L1, 8D2H2L2 и 8D2H3L3 все

обладают очень сильной способностью связываться с антигеном CTLA4 на поверхности клеток-хозяев 293F-CTLA4.

Пример 7. Определение активности антител по связыванию антигена CTLA4 при помощи ИФА

ИФА-планшет покрывали CTLA4 при температуре 4°C в течение ночи. После блокирования 1% БСА при температуре 37°C в течение 2 часов, добавляли CTLA4 антитела 8D2, 8D2 (Re) и 8D2 гуманизированные антитела 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 и 8D2H2L17, и контрольные антитела 10D1 (Alan J. Korman, Edward L. Halk, et al., HUMAN CTLA-4 ANTIBODIES, Патент США No.US6984720B1) и 11.2.1 (Douglas Charles Hanson, Mark Joseph Neveu, et al., Human monoclonal antibodies to CTLA-4, Патент США No.US682736B1) для реагирования в течение 30 минут. Конъюгированное с ферментом вторичное антитело добавляли для инкубации в течение 30 минут. Затем определяли поглощение при длине волны 450 нм на ридере для ИФА-планшетов.

Результаты обнаружения связывания антитела 8D2 и его гуманизированных антител с антигеном CTLA4 показаны на Фигурах 22-25, соответственно. Как показано на этих фигурах, антитела 8D2, 8D2 (Re) и 8D2 гуманизированные антитела все могут эффективно связываться с белком CTLA4, и их эффективность связывания имеет дозозависимый характер. Значения интенсивности флуоресценции для каждой дозы приведены в Таблицах 4-8. Эффективность связывания EC₅₀ антител 8D2, 8D2 (Re) и гуманизированных антител получали с использованием моделирующей кривой в количественном анализе флуоресценции связанного антитела 8D2, 8D2 (Re) и гуманизированных антител (Таблица 9).

Таблица 4. Связывание 8D2 и 8D2 (Re) с мышинным CTLA4 (ИФА)

Концентрация антитела (мкг/мл)	Покрывающий антиген: мышинный CTLA4, 0,5 мкг/мл					
	8D2		8D2 (Re)		10D1	
1	2,823	2,682	2,672	2,769	2,995	2,975
0,3	2,806	2,763	2,690	2,735	2,852	2,900
0,1	2,754	2,718	2,796	2,685	2,429	2,538
0,03	2,336	2,381	2,305	2,259	1,507	1,704
0,01	1,614	1,560	1,397	1,446	0,673	0,794
0,003	0,784	0,760	0,662	0,674	0,292	0,328

0,001	0,358	0,355	0,315	0,321	0,136	0,142
0	0,063	0,052	0,053	0,046	0,046	0,050
Вторичное антитело	Козье антимышиное Вторичное антитело				Козье античеловеческое Вторичное антитело	

Таблица 5. Связывание 8D2, 8D2H1L1 и 8D2(Re) с человеческим CTLA4 (ИФА)

Концентрация антитела (мкг/мл)	Покрывающий антиген: человеческий CTLA4, 0,5 мкг/мл									
	10D1		11.2.1		8D2H1L1		8D2		8D2(Re)	
1	3,479	3,432	3,584	3,547	3,016	3,031	3,029	3,107	3,058	3,085
1:3	3,323	3,155	3,499	3,479	2,834	2,904	3,076	3,074	2,930	3,072
1:9	2,506	2,293	3,211	3,187	2,610	2,670	2,878	2,988	2,805	2,868
1:27	1,331	1,194	2,337	2,293	1,834	1,944	2,265	2,287	2,052	2,064
1:81	0,552	0,528	1,254	1,267	0,969	0,996	1,335	1,479	1,398	1,271
1:243	0,202	0,222	0,536	0,552	0,450	0,515	0,666	0,770	0,634	0,649
1:729	0,141	0,115	0,253	0,263	0,204	0,206	0,277	0,351	0,307	0,309
0	0,090	0,086	0,072	0,064	0,067	0,067	0,064	0,067	0,071	0,086
Вторичное антитело	Козий античеловеческий IgG Вторичное антитело					Козий антимышинный IgG Вторичное антитело				

Таблица 6. Связывание 8D2H2L2 и 8D2H3L3 с человеческим CTLA4 (ИФА)

Концентрация антитела (мкг/мл)	Покрывающий антиген: человеческий CTLA4, 0,5 мкг/мл							
	8D2H2L2		8D2H3L3		10D1		11.2.1	
1	1,489	1,411	1,631	1,601	1,775	2,069	2,206	2,150
1:3	1,178	1,262	1,192	1,455	1,527	1,480	1,825	2,047
1:9	0,710	0,872	0,943	1,007	1,073	1,204	1,292	1,409
1:27	0,336	0,370	0,642	0,658	0,663	0,585	0,893	0,682
1:81	0,192	0,195	0,415	0,374	0,349	0,323	0,499	0,426
1:243	0,097	0,109	0,230	0,214	0,132	0,146	0,223	0,219
1:729	0,075	0,083	0,100	0,130	0,099	0,099	0,127	0,136
0	0,052	0,055	0,052	0,057	0,056	0,053	0,057	0,061
Вторичное антитело	HRP-конъюгированный козий античеловеческий IgG Вторичное антитело							

Таблица 7. Связывание 8D2H2L2 и 8D2H3L3 с обезьяньим CTLA4 (ИФА)

Концентрация антитела	Покрывающий антиген: обезьяний CTLA4-hFc, 0,25 мкг/мл			
	8D2H2L2	8D2H3L3	10D1	11.2.1

(мкг/мл)								
1	1,576	1,624	1,235	1,321	1,788	1,846	1,718	1,632
1:3	1,223	1,199	0,921	0,873	1,250	1,344	1,540	1,460
1:9	0,793	0,775	0,654	0,724	0,845	0,868	1,114	1,054
1:27	0,471	0,426	0,441	0,403	0,429	0,402	0,625	0,665
1:81	0,220	0,230	0,239	0,218	0,190	0,191	0,297	0,313
1:243	0,114	0,117	0,123	0,119	0,104	0,108	0,130	0,172
1:729	0,071	0,076	0,088	0,096	0,063	0,067	0,082	0,094
0	0,048	0,048	0,048	0,050	0,049	0,053	0,048	0,051
Вторичное антитело	HRP-конъюгированный козий античеловеческий IgG, F(ab') ₂ Вторичное антитело							

Таблица 8. Связывание 8D2H2L15 и 8D2H2L17 с человеческим CTLA4 (ИФА)

Концентра- ция антитела (мкг/мл)	Покрывающий антиген: CTLA4, at 0,5 мкг/мл											
	8D2H2L2 20150327		8D2H2L15		8D2H2L17		10D1		11.2.1		8D2H2L2 20140422	
1	2,34	2,37	2,58	2,55	2,61	2,81	2,56	2,74	2,75	2,69	2,23	2,40
1:3	2,22	2,09	2,65	2,72	2,73	2,78	2,42	2,44	2,56	2,66	2,09	2,07
1:9	2,03	1,87	2,79	2,45	2,59	2,73	2,20	2,20	2,69	2,44	1,92	1,95
1:27	1,82	1,93	2,43	2,21	2,41	2,28	1,81	1,70	2,13	2,28	1,47	1,63
1:81	1,10	1,17	1,95	1,83	1,80	1,68	1,03	1,09	1,37	1,53	1,10	1,01
1:243	0,65	0,58	1,05	1,02	1,14	1,19	0,51	0,53	0,75	0,79	0,49	0,50
1:729	0,26	0,21	0,53	0,44	0,57	0,50	0,21	0,24	0,32	0,31	0,23	0,20
0	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04	0,05	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Вторичное антитело: HRP-конъюгированный козий античеловеческий IgG (1:5000)												

Таблица 9. Эффективность связывания EC₅₀ антител 8D2, 8D2 (Re) и 8D2 гуманизированных антител 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 и 8D2H2L17 с антигеном CTLA4, полученная с использованием моделирующей кривой в анализе при помощи ИФА

	Источник антигена CTLA4	Антитело EC ₅₀ (нМ)	10D1 EC ₅₀ (нМ)	11.2.1 EC ₅₀ (нМ)
8D2	Мышь	0,015	0,062	0,023
		0,071	0,24	
8D2 (Re)	Мышь	0,015	0,062	0,023
		0,085	0,24	
8D2H1L1	Мышь	0,025	0,062	0,023
8D2H2L2	Человек	0,12	0,125	0,09
8D2H2L2	Человек	0,082	0,125	0,09
8D2H2L2	Человек	0,118	0,125	0,09

8D2H3L3	Человек	0,129	0,125	0,09
8D2H2L2	Обезьяна	0,227	0,258	0,075
8D2H3L3	Обезьяна	0,385	0,258	0,075
8D2H2L15	Человек	0,042	0,138	0,075
8D2H2L17	Человек	0,047	0,138	0,075

Примечание: 8D2H2L2 измеряли в трех повторностях.

Приведенные выше результаты показывают, что антитела 8D2 и 8D2(Re) связываются с мышинным антигеном CTLA4 с лучшей эффективностью по сравнению с контрольными антителами 10D1 и 11.2.1. Гуманизированное антитело 8D2H1L1 связывается с мышинным антигеном CTLA4 с более высокой эффективностью по сравнению с контрольным антителом 10D1, и с эффективностью, сопоставимой с 11.2.1.

Гуманизированное антитело 8D2H2L2 связывается антигеном CTLA4 человека с эффективностью, сравнимой с эффективностью связывания 10D1. Гуманизированные антитела 8D2H2L2 и 8D2H3L3 связываются антигеном CTLA4 человека с эффективностью, сравнимой с эффективностью связывания 10D1. Гуманизированные антитела 8D2H2L15 и 8D2H2L17 связываются антигеном CTLA4 человека с эффективностью, значительно превышающей эффективность связывания контрольных антител 10D1 и 11.2.1.

Пример 8. Определение активности антител по конкурированию с В7-1/2 за связывание с антигеном CTLA4 при помощи конкурентного ИФА

1. Определение активности антител по конкурированию с В7-1 за связывание с антигеном CTLA4 при помощи ИФА

ИФА-планшеты покрывали В7-1 при температуре 4°C в течение ночи. После блокирования 1% БСА при температуре 37°C в течение 2 часов, добавляли анти-CTLA4 антитела, т.е. моноклональные антитела 8D2 и 8D2(Re) и 8D2 гуманизированные антитела 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 и 8D2H2L17, а также контрольные антитела 10D1 и 11.2.1. После инкубации в течение 10 минут добавляли CTLA4-mFc. После инкубации при температуре 37°C в течение 40 минут добавляли конъюгированное с ферментом вторичное антитело. После инкубации при температуре 37°C в течение 30 минут определяли поглощение при длине волны 450 нм на ридере для ИФА-

планшетов.

2. Определение активности антител по конкурированию с В7-2 за связывание с антигеном CTLA4 при помощи ИФА

ИФА-планшеты покрывали CTLA4-mFc при температуре 4°C в течение ночи. После блокирования 1% БСА при температуре 37°C в течение 2 часов, добавляли анти-CTLA4 антитела, т.е. моноклональные антитела 8D2 и 8D2(Re) и 8D2 гуманизированные антитела 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 и 8D2H2L17, а также контрольные антитела 10D1 и 11.2.1. После инкубации в течение 10 минут добавляли В7-2. После инкубации при температуре 37°C в течение 40 минут добавляли конъюгированное с ферментом вторичное антитело. После инкубации при температуре 37°C в течение 30 минут определяли поглощение при длине волны 450 нм на ридере для ИФА-планшетов. Результаты обнаружения связывания 8D2, 8D2(Re) и гуманизированных антител с антигеном CTLA4 показаны на Фигурах 26-31, соответственно. Как показано на этих фигурах, антитела 8D2, 8D2(Re) и 8D2 гуманизированные антитела могут эффективно связываться с белком CTLA4, и их эффективность связывания имеет дозозависимый характер. Значения интенсивности флуоресценции для каждой дозы приведены в Таблицах 10-16. Эффективность связывания EC_{50} антител 8D2, 8D2(Re) и гуманизированных антител получали с использованием моделирующей кривой в количественном анализе флуоресценции связанного антитела 8D2, 8D2(Re) и гуманизированных антител (Таблица 17).

Таблица 10. Антитела 8D2 и 8D2(Re) конкурируют с В7-1 в ИФА

Концентрация антитела (мкг/мл)	Покрывающий антиген: CTLA4-mFc, 0,2 мкг/мл			
	8D2		8D2 (Re)	
3	0,163	0,149	0,176	0,215
1	0,208	0,188	0,200	0,214
0,3	0,354	0,347	0,355	0,390
0,1	0,680	0,695	0,668	0,721
0,03	1,378	1,262	1,430	1,708
0,01	1,758	1,612	1,630	1,824
0,003	1,982	1,711	1,890	1,937
0	2,228	1,766	1,805	1,779
В7/1-hFc (0,3мкг/мл)				

Вторичное антитело	Козье античеловеческое вторичное антитело
--------------------	---

Таблица 11. Антитела 8D2, 8D2H1L1 и 8D2(Re) конкурируют с В7-1 в ИФА

Концентрация антитела (мкг/мл)	Покрывающий белок: В7/1-hFc, 0,2 мкг/мл							
	10D1		11.2.1		8D2 H1L1		CTLA4-mFc (0,6 мкг/мл) 1:2	
3	0,168	0,158	0,101	0,105	0,123	0,138	0,824	0,791
1:3	0,258	0,232	0,119	0,133	0,206	0,231	0,640	0,768
1:9	0,515	0,466	0,381	0,485	0,445	0,529	0,750	0,717
1:27	0,577	0,508	0,597	0,579	0,509	0,659	0,653	0,626
1:81	0,801	0,730	0,650	0,613	0,669	0,723	0,571	0,522
1:243	0,814	0,848	0,900	0,520	0,841	0,821	0,459	0,327
1:729	0,854	0,732	0,993	0,841	0,848	0,822	0,312	0,232
0	0,856	0,812	0,826	0,550	0,672	0,600	0,071	0,074
Антиген	CTLA4-mFc 0,3 мкг/мл						Контроль	
Вторичное антитело	HRP-конъюгированный козий антимышиный IgG Вторичное антитело							

Таблица 12. Антитела 8D2, 8D2H1L1 и 8D2(Re) конкурируют с В7-2 в ИФА

Концентрация антитела (мкг/мл)	Покрывающий антиген: CTLA4-mFc, 0,5 мкг/мл									
	10D1		11.2.1		8D2 H1L1		8D2		8D2(Re)	
3	0,569	0,550	0,492	0,442	0,450	0,384	0,407	0,336	0,367	0,375
1:3	0,500	0,466	0,387	0,402	0,404	0,332	0,359	0,306	0,331	0,289
1:9	0,736	0,782	0,412	0,482	0,467	0,371	0,456	0,355	0,384	0,315
1:27	0,982	1,137	0,676	0,585	0,671	0,633	0,675	0,675	0,464	0,443
1:81	1,196	1,355	1,120	0,965	1,038	1,007	1,091	1,050	0,713	0,622
1:243	1,171	1,380	1,237	1,214	1,215	1,069	1,154	1,172	0,862	0,766
1:729	1,307	1,388	1,362	1,229	1,231	1,253	1,242	1,264	0,826	0,725
0	1,030	1,171	1,187	1,100	1,130	1,076	1,034	1,183	0,915	0,861
Рецептор	В7/2-His, 1 мкг/мл									
Вторичное антитело	HRP-конъюгированное мышинное анти-His Вторичное антитело									

Таблица 13. Антитела 8D2H2L2 и 8D2H3L3 конкурируют с В7-1 в ИФА

Концентрация антитела (мкг/мл)	Покрывающий белок: В7/1-hFc, 0,3 мкг/мл							
	8D2 H2L2		8D2 H3L3		10D1		11.2.1	
5	0,207	0,232	0,187	0,202	0,166	0,172	0,080	0,089

[illegible]

Таблица 14. Антитела 8D2H2L2 и 8D2H3L3 конкурируют с B7-2 за связывание с CTLA4 в ИФА

Концентрация антитела (мкг/мл)	Покрывающий антиген: CTLA4-mFc, 0,5 мкг/мл							
	8D2 H2L2		8D2 H3L3		10D1		11.2.1	
1:5	0,377	0,376	0,417	0,432	0,449	0,408	0,372	0,494
1:3	0,616	0,537	0,540	0,511	0,553	0,602	0,437	0,348
1:9	0,988	0,927	0,548	0,614	0,806	0,788	0,479	0,412
1:27	1,085	1,038	0,717	0,728	0,969	0,890	0,622	0,529
1:81	1,227	1,059	1,010	0,951	0,974	0,916	0,805	0,649
1:243	1,136	1,066	1,255	1,160	0,935	0,921	0,930	0,754
1:729	1,218	1,158	1,239	1,162	1,108	1,045	0,981	0,746
0	1,094	1,068	1,198	1,214	1,082	1,047	0,987	0,819
Лиганд	B7/2-His, 1 мкг/мл							
Вторичное антитело	HRP-конъюгированное мышинное анти-His Вторичное антитело							

Таблица 15. Антитела 8D2H2L15 и 8D2H2L17 конкурируют с B7-1 за связывание с CTLA4 в ИФА

Разведение	Покрывающий антиген: B7/1-hFc, 0,5 мкг/мл											
антитела	8D2 H2L2 (20150327)		8D2 H2L15		8D2 H2L17		10D1		11.2.1		8D2 H2L2 (20140422)	
5 мкг/мл	0,09	0,10	0,07	0,07	0,06	0,07	0,08	0,11	0,06	0,06	0,12	0,14
1:3	0,13	0,14	0,07	0,07	0,06	0,07	0,33	0,24	0,09	0,08	0,26	0,24
1:9	0,29	0,26	0,07	0,09	0,08	0,08	0,71	0,78	0,33	0,30	0,45	0,49
1:27	0,66	0,58	0,70	1,03	0,89	0,93	1,11	1,17	1,14	1,19	1,06	1,10
1:81	0,69	0,62	0,68	1,18	0,97	0,79	1,16	1,35	1,17	1,20	1,09	1,09
1:243	0,66	0,64	0,75	1,13	1,05	0,99	1,27	1,48	1,30	1,31	1,19	0,99
1:729	0,69	0,64	0,74	1,07	1,25	1,35	1,33	1,56	1,32	1,31	1,16	1,12
0	0,59	0,66	0,53	1,09	1,18	1,18	1,33	1,29	1,28	1,30	1,11	1,04
Лиганд	CTLA4-mFc, 0,3 мкг/мл											
Вторичное	HRP-конъюгированное мышиное анти-His Вторичное антитело											

антитело	
----------	--

Таблица 16. Антитела 8D2H2L15 и 8D2H2L17 конкурируют с B7-2 за связывание с CTLA4 в ИФА

Разведение антитела	CTLA4-mFc, 2 мкг/мл											
	8D2H2L2 20140422		8D2H2L15		8D2H2L17		10D1		11.2.1		8D2H2L2 20150327	
1 мкг/мл	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,05	0,05
1:3	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,07	0,07	0,05	0,05	0,47	0,37
1:9	0,15	0,16	0,17	0,19	0,06	0,12	0,44	0,35	0,17	0,16	0,65	0,58
1:27	0,55	0,59	0,42	0,48	0,50	0,57	0,73	0,70	0,57	0,57	0,79	0,70
1:81	0,76	0,84	0,75	0,75	0,77	0,81	0,85	0,86	0,84	0,76	0,86	0,77
1:243	0,84	0,79	0,83	0,84	0,82	0,87	0,86	0,89	0,84	0,85	0,83	0,84
1:729	0,77	0,76	0,94	1,00	0,97	0,98	0,99	0,91	0,87	0,85	0,82	0,80
0	0,77	0,78	0,92	0,97	0,81	0,82	0,76	0,96	0,91	0,80	0,80	0,76
Лиганд	B7/2-His, 0,5 мкг/мл											
Вторичное антитело	HRP-конъюгированное мышиное анти-His Вторичное антитело (1:4000)											

Таблица 17. Эффективность связывания EC₅₀ антител 8D2, 8D2 (Re) и 8D2 гуманизированных антител 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 и 8D2H2L17 с антигеном CTLA4 в конкуренции с B7, полученная с использованием моделирующей кривой в анализе при помощи конкурентного ИФА

	Антитело EC ₅₀ (нМ)		10D1 EC ₅₀ (нМ)		11.2.1 EC ₅₀ (нМ)	
	B7-1	B7-2	B7-1	B7-2	B7-1	B7-2
8D2	0,44	0,208	–	0,464	–	0,15
8D2 (Re)	0,514	0,153	–	0,464	–	0,15
8D2H1L1	2,478	0,178	1,91	0,464	1,691	0,15
8D2H2L2	5,932	1,643	5,15	2,056	1,073	0,172
8D2H2L2	2,973	0,368	–	–	–	–
8D2H2L2	3,118	0,301	–	–	–	–
8D2H3L3	2,144	0,167	5,15	2,056	1,073	0,172
8D2H2L15	1,973	0,227	4,586	0,629	2,606	0,349
8D2H2L17	1,787	0,296	4,586	0,629	2,606	0,349

Примечание: 8D2H2L2 измеряли в трех повторностях.

Приведенные выше результаты показывают, что антитела 8D2 и 8D2 (Re) и 8D2 гуманизированные антитела 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 и 8D2H2L17 все могут конкурировать с B7 за связывание антигеном CTLA4. В частности, антитела 8D2, 8D2 (Re),

8D2H1L1 и 8D2H2L2 сильнее, чем 10D1 конкурируют с B7-2 за связывание с CTLA4, в то время как 8D2H2L17 сильнее, чем антитела 10D1 и 11.2.1 конкурирует как с B7-1, так и с B7-2 за связывание с CTLA4.

Пример 9. Анализ биологической активности моноклонального антитела 8D2 и гуманизированных антител 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 и 8D2H2L17 в клетках

Для того чтобы определить влияние моноклонального антитела 8D2 и гуманизированных антител 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 и 8D2H2L17 и контрольных антител 10D1 и 11.2.1 на экспрессию IL-2 мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК), периферическую кровь от здоровых доноров собирали в пробирки для сбора, содержащие гепарин натрия. МКПК получали в виде суспензии клеток после разведения в ФСБ и центрифугирования в среде разделения (при 2550 об/мин в течение 20 минут). В суспензию клеток добавляли SEB (1 мкг/мл)/ФГА (30 мкл/мл) и помещали в инкубатор при температуре 37°C с насыщенной влагой атмосферой, содержащей 5% CO₂ для дальнейшего культивирования. Добавляли лимфоциты Раджи и антитело. После совместной инкубации в течение 48 часов МКПК дважды промывали ФСБ и добавляли в 96-луночные планшеты по 10000 клеток на лунку. Затем добавляли антитела с соответствующим градиентом концентрации. После инкубации в течение 20 минут клетки Раджи, обработанные ММС в течение 1 часа, добавляли в количестве 10000 клеток на лунку для совместного культивирования в течение 72 часов. После совместного культивирования в течение 72 часов культуру клеток собирали для получения супернатанта, и профиль экспрессии IL-2 в супернатанте совместной культуры клеток определяли с использованием набора реагентов для ИФА по инструкции, прилагаемой к этому набору (Dakewe Co., DKW12-1020-096).

После статистического анализа результаты экспериментов показаны на Фигурах 32 и 33. По сравнению с группой Т-лимфоцитов и группой клеток Раджи в случае моноклонального антитела 8D2, все его гуманизированные антитела 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 и 8D2H2L17 могут эффективно блокировать связывание

CTLA4 с B7 и улучшать экспрессию IL-2 Т-лимфоцитами (Фигуры 32 и 33). В частности, авторами настоящего изобретения неожиданно было обнаружено, что антитела 8D2H2L2, 8D2H2L15 и 8D2H2L17 значительно превосходят контрольные антитела 10D1 и 11.2.1. При концентрации 10 нМ они обеспечивают уровень IL-2, сравнимый или даже превышающий уровень, который обеспечивают 10D1 или 11.2.1 при концентрации 100 нМ. Таким образом, антитела настоящего изобретения могут повышать уровень IL-2 при более низких концентрациях, например, примерно 10 нМ.

Пример 10. Противоопухолевая активность моноклонального антитела 8D2H2L2 *in vivo*

Противоопухолевую активность моноклонального антитела 8D2H2L2 *in vivo* оценивали с использованием животной модели hu-SCID-raji. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека выделяли с использованием реагента Фиколл и активировали, используя SEB в концентрации 1 мкг/мл в течение 3 суток. Затем $1,25 \times 10^6$ активированных МКПК смешивали с 5×10^6 клеток Раджи лимфомы Беркитта и 8D2H2L2 (20 мг/кг) и вводили подкожно в бок SCID-мышам с врожденным отсутствием естественных клеток-киллеров. Параллельно, формировали группу изотипического контроля по 5 животных на группу. Затем этим животным вводили дозу 20 мг/кг путем внутривенной инъекции раз в неделю в течение трех последовательных недель. Объем опухоли измеряли два раза в неделю до конца экспериментов или до того момента, когда объем опухоли достигал 1000 мм³.

Как показано на Фигуре 34, антитело 8D2H2L2 может заметно подавлять рост опухоли в модели hu-SCID-raji. Этот результат указывает на то, что это антитело может применяться клинически для лечения лимфомы.

В то время как конкретные варианты осуществления настоящего изобретения были подробно описаны, специалистам в данной области техники в свете раскрытой в описании информации будет понятно, что различные изменения и модификации могут быть сделаны в частных деталях, и все они находятся в объеме настоящего изобретения. Полный объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения и любыми ее эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где это моноклональное антитело содержит определяющее комплементарность области (CDRs), выбранные из следующих:

а. HCDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27,

б. HCDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и

с. HCDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29;

и/или

д. LCDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30,

е. LCDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и

ф. LCDR3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34.

2. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) этого моноклонального антитела выбрана из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 18;

и/или

аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) этого моноклонального антитела выбрана из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24.

3. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, где это моноклональное антитело содержит

(1) VH, представленную в SEQ ID NO: 6, и VL, представленную в SEQ ID NO: 8;

(2) VH, представленную в SEQ ID NO: 10, и VL, представленную в SEQ ID NO: 12;

(3) VH, представленную в SEQ ID NO: 14, и VL, представленную в SEQ ID NO: 16;

(4) VH, представленную в SEQ ID NO: 18, и VL,

представленную в SEQ ID NO: 20;

(5) VH, представленную в SEQ ID NO: 14, и VL, представленную в SEQ ID NO: 22; или

(6) VH, представленную в SEQ ID NO: 14, и VL, представленную в SEQ ID NO: 24;

в частности, метионин (Met) в положении 18 в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 14 независимо заменен аминокислотой, выбранной из следующих аминокислот: лейцин, валин, изолейцин или аланин.

4. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-3, где это моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, фрагмента определяющей комплементарность области, одноцепочечного антитела (например, scFv), гуманизированного антитела, гибридного антитела или диатела.

5. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-4, где это моноклональное антитело связывается с белком CTLA4 с K_D менее чем примерно 10⁻⁵ М, например, менее чем примерно 10⁻⁶ М, 10⁻⁷ М, 10⁻⁸ М, 10⁻⁹ М или 10⁻¹⁰ или меньше.

6. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-5, где это моноклональное антитело содержит области, не являющиеся CDR, и эти не являющиеся CDR области получены из антитела вида, отличного от мыши, например, человека.

7. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, способную кодировать переменную область тяжелой цепи антитела, где эта переменная область тяжелой цепи антитела содержит CDRs с аминокислотными последовательностями SEQ ID NOs: 27-29;

в частности переменная область тяжелой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 18;

более конкретно, молекула нуклеиновой кислоты имеет нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5,

SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 17.

8. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, способную кодировать вариабельную область легкой цепи антитела, где эта вариабельная область легкой цепи антитела содержит

1) CDRs с аминокислотными последовательностями SEQ ID NOs: 30-32;

2) CDRs с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 33;

3) CDRs с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 34;

в частности вариабельная область легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, или SEQ ID NO: 24;

более конкретно, молекула нуклеиновой кислоты имеет нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 23.

9. Вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п.7 и/или п.8.

10. Клетка-хозяин, содержащая выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п.7 и/или п.8, или вектор по п.9.

11. Способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из п.п. 1-6, включающий в себя этапы культивирования клетки-хозяина по п.10 в подходящих условиях и выделения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из культуры клеток.

12. Конъюгат, содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и конъюгированную молекулу, где моноклональное антитело представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-6, и указанная конъюгированная молекула представляет собой детектируемую метку, в частности, конъюгированная молекула представляет собой радиоизотоп, флуоресцентное вещество, люминесцентным вещество, хромогенное вещество или фермент.

13. Набор реагентов, содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-6, или конъюгат по п.12; в частности набор реагентов дополнительно включает в себя второе антитело, которое специфично распознает указанное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; при необходимости указанное второе антитело дополнительно содержит детектируемую метку, например, радиоизотоп, флуоресцентное вещество, люминесцентным вещество, хромогенное вещество или фермент.

14. Применение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из п.п. 1-6 в приготовлении набора реагентов, который применяется для обнаружения наличия или уровня CTLA4 в образце.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-6, или конъюгат по п.12; при необходимости она дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество.

16. Применение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из п.п. 1-6, или конъюгата по п.12 в приготовлении лекарственного препарата для применения в профилактике и/или терапии и/или адъювантной терапии и/или диагностике опухоли; в частности, опухоли, выбранной из меланомы, опухоли почки/рака почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака желудочно-кишечного тракта и опухоли печени/рака печени.

17. Применение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из п.п. 1-6, или конъюгата по п.12 в приготовлении следующего агента:

- агента, который обнаруживает уровень CTLA4 в образце,
- агента, который блокирует связывание CTLA4 с B7,
- агента, который регулирует (например, подавляет) активность CTLA4 или уровень CTLA4,
- агента, который снимает иммуносупрессию организма CTLA4,
- агента, который активирует Т-лимфоциты, или

агента, который повышает уровень экспрессии IL-2 в Т-лимфоцитах.

18. *in vivo* или *in vitro* способ, включающему в себя этап введения в клетки эффективного количества моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из п.п. 1-6, или конъюгата по п.12, где это способ выбран из следующих способов:

способ обнаружения уровня CTLA4 в образце,
 способ блокирования связывания CTLA4 с B7,
 способ регуляции (например, подавления) активности CTLA4 или уровня CTLA4,
 способ снятия иммуносупрессии организма CTLA4,
 способ активации Т-лимфоцитов, или
 способ повышения уровня экспрессии IL-2 в Т-лимфоцитах.

19. Способ профилактики и/или лечения и/или адъювантной терапии и/или диагностики опухоли, включающему в себя введение субъекту эффективного количества моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из п.п. 1-6, или конъюгата моноклонального пнтителя по п.12; в частности, опухоли, выбранной из меланомы, опухоли почки/рака почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака желудочно-кишечного тракта и опухоли печени/рака печени.

20. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-6 для применения в профилактике и/или лечении и/или адъювантной терапии и/или диагностике опухоли; в частности, опухоли, выбранной из меланомы, опухоли почки/рака почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака желудочно-кишечного тракта и опухоли печени/рака печени.

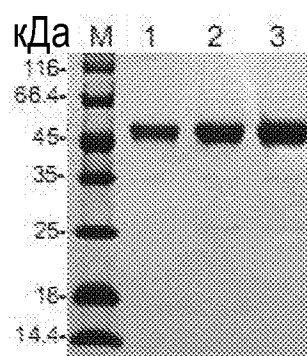
21. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-6 для применения в

блокировании связывания CTLA4 с B7,
 регуляции (например, подавлении) активности CTLA4 или уровня CTLA4,
 снятии иммуносупрессии организма CTLA4, или

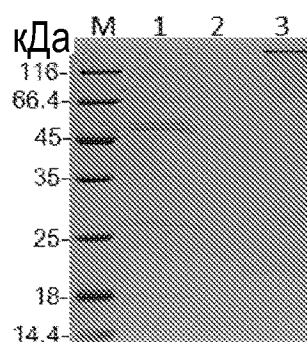
активации Т-лимфоцитов, или повышении уровня экспрессии IL-2 в Т-лимфоцитах.

По доверенности

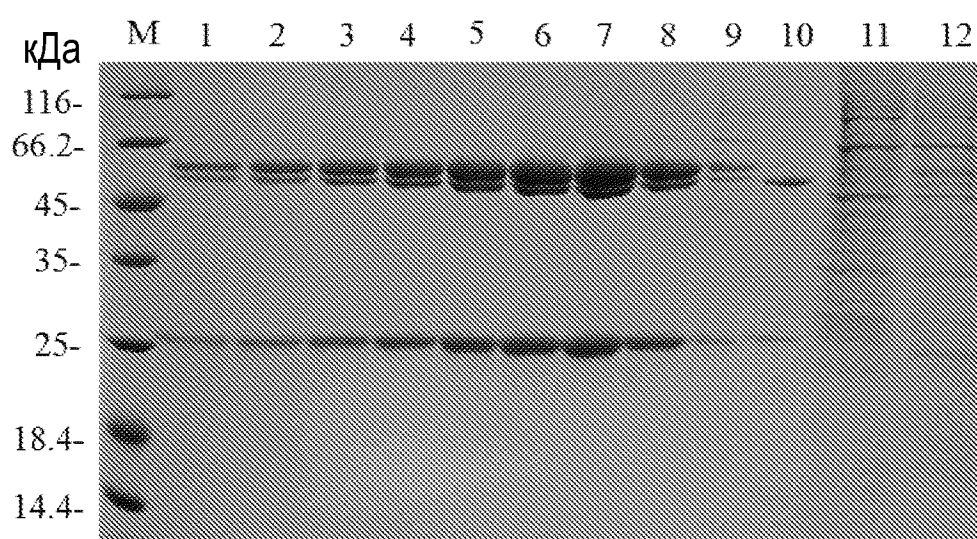
1/15



ФИГ. 1

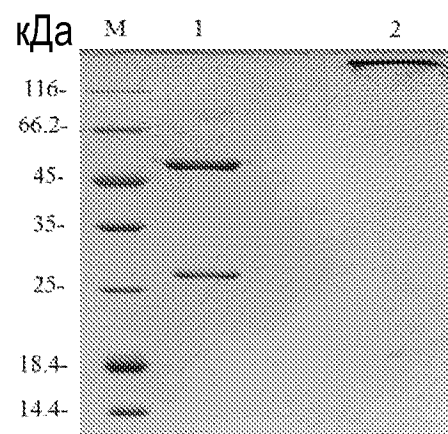


ФИГ. 2

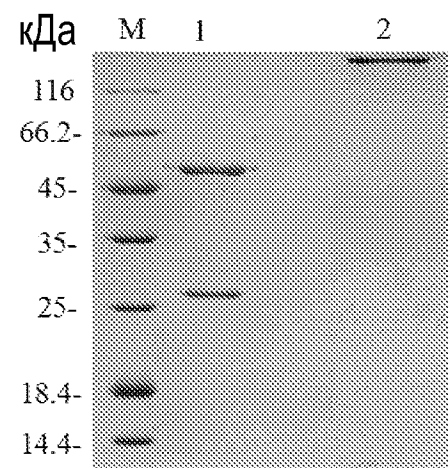


ФИГ. 3

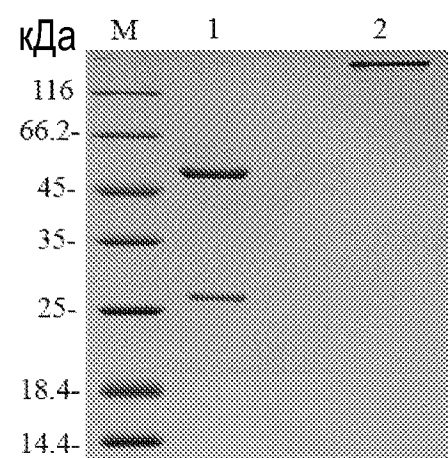
2/15



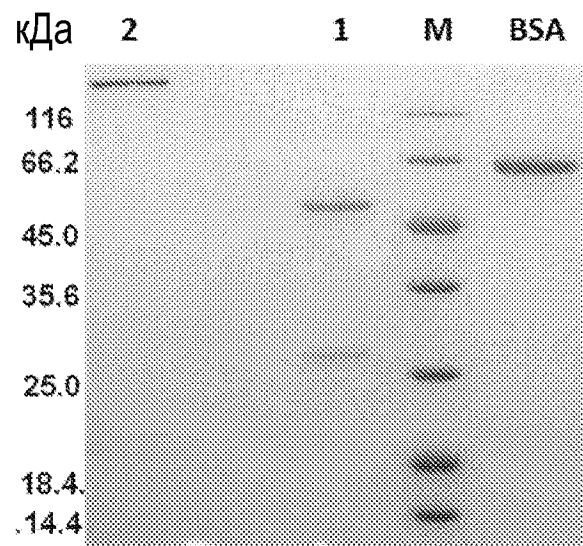
ФИГ. 4



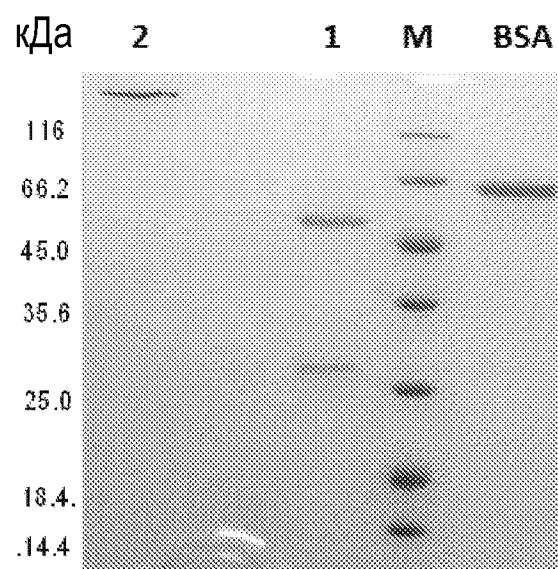
ФИГ. 5



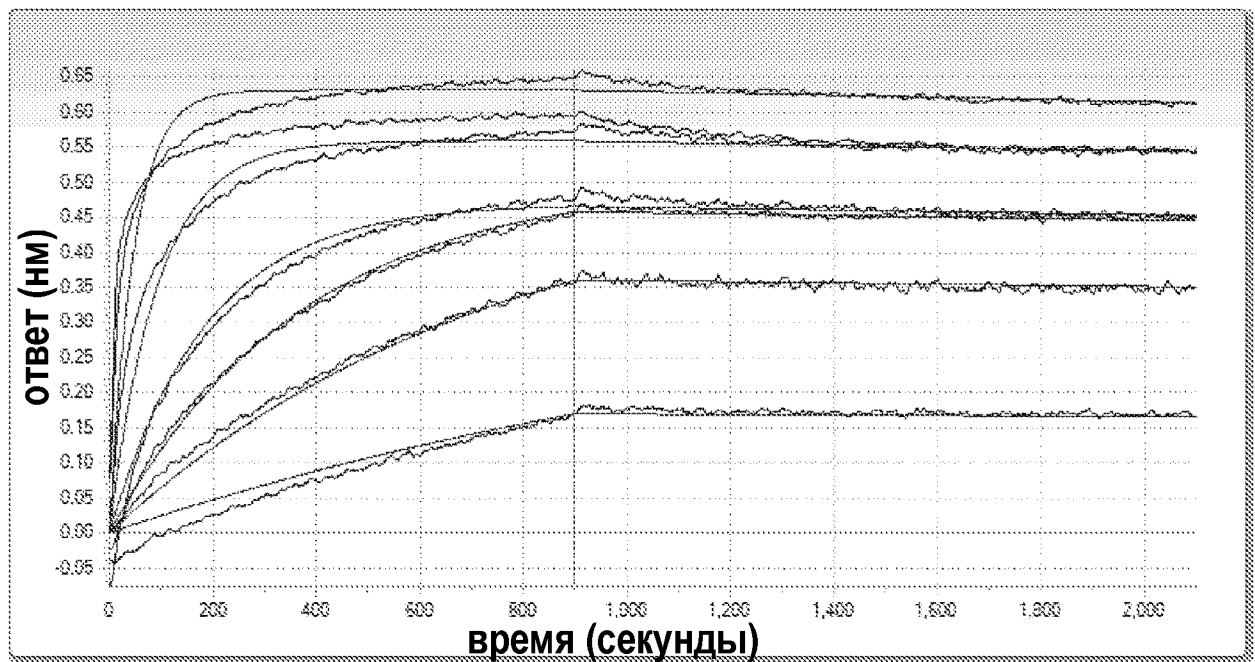
ФИГ. 6



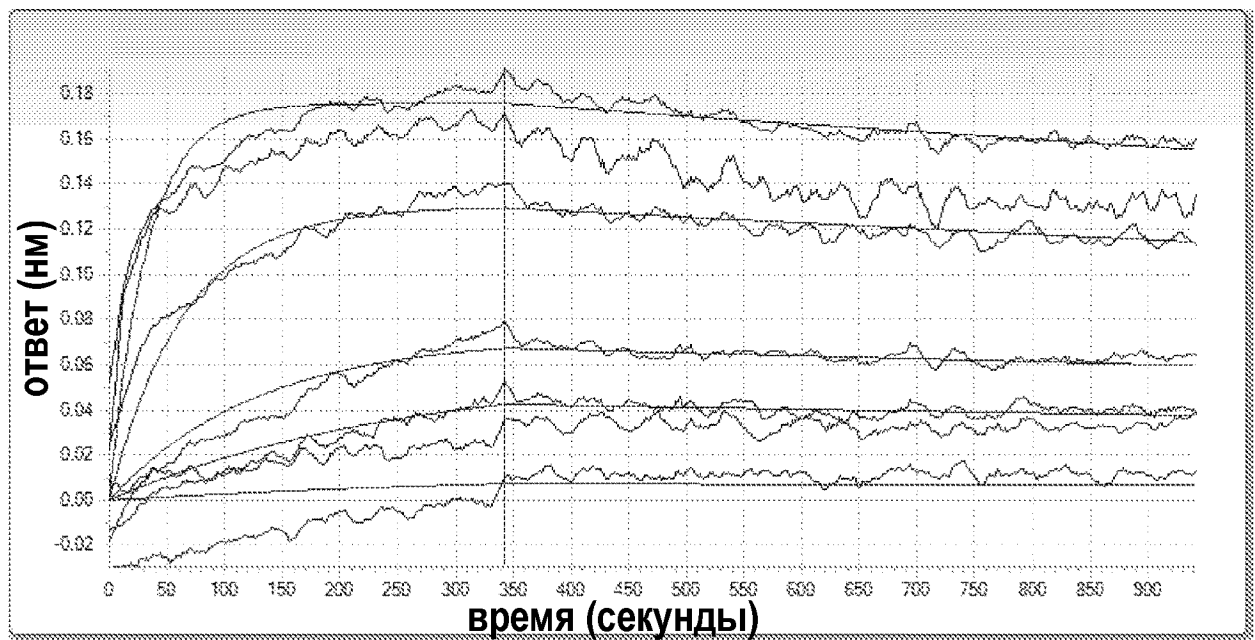
ФИГ. 7



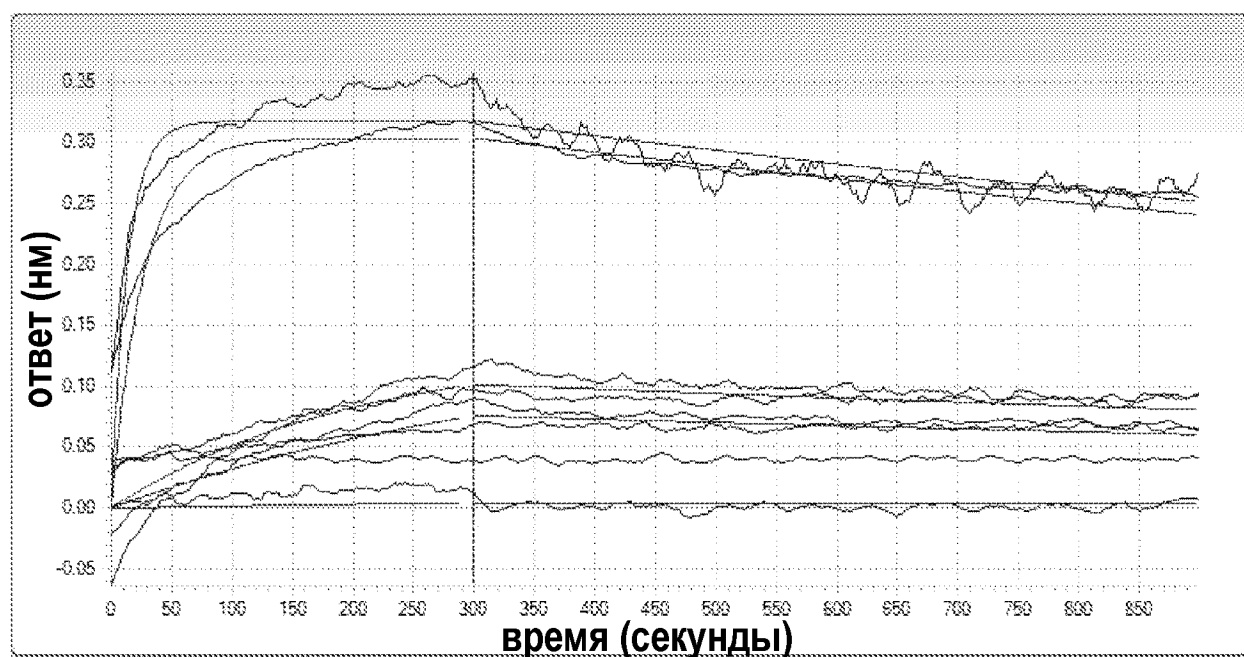
ФИГ. 8



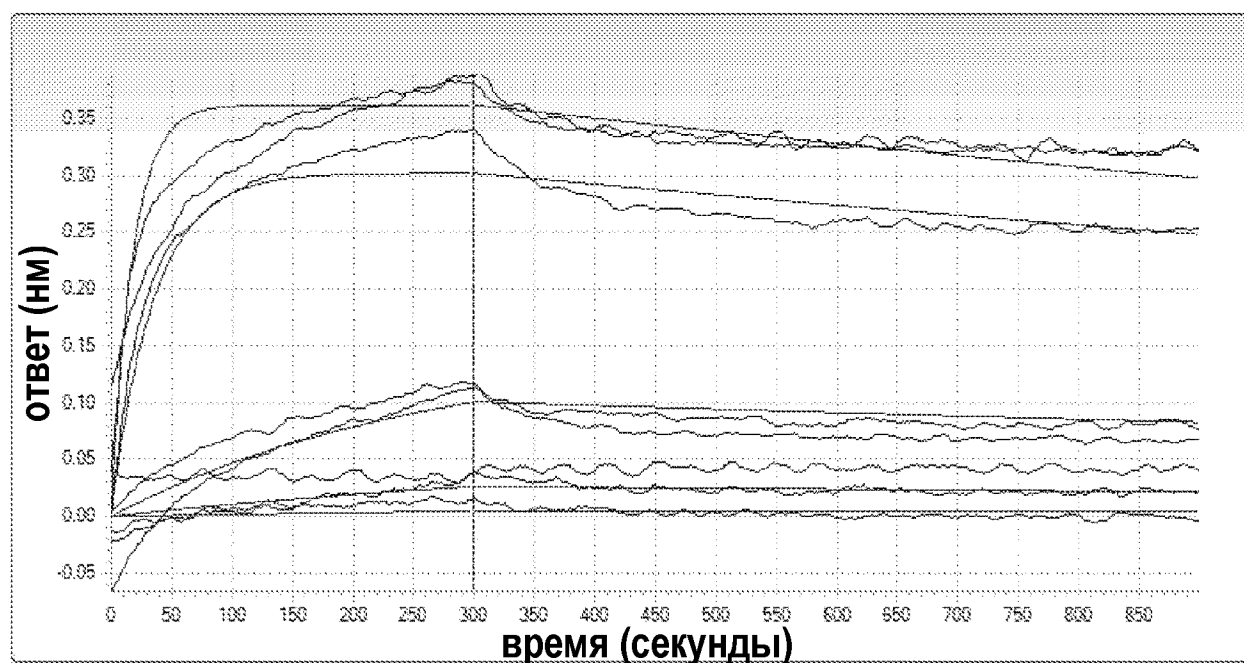
ФИГ. 9



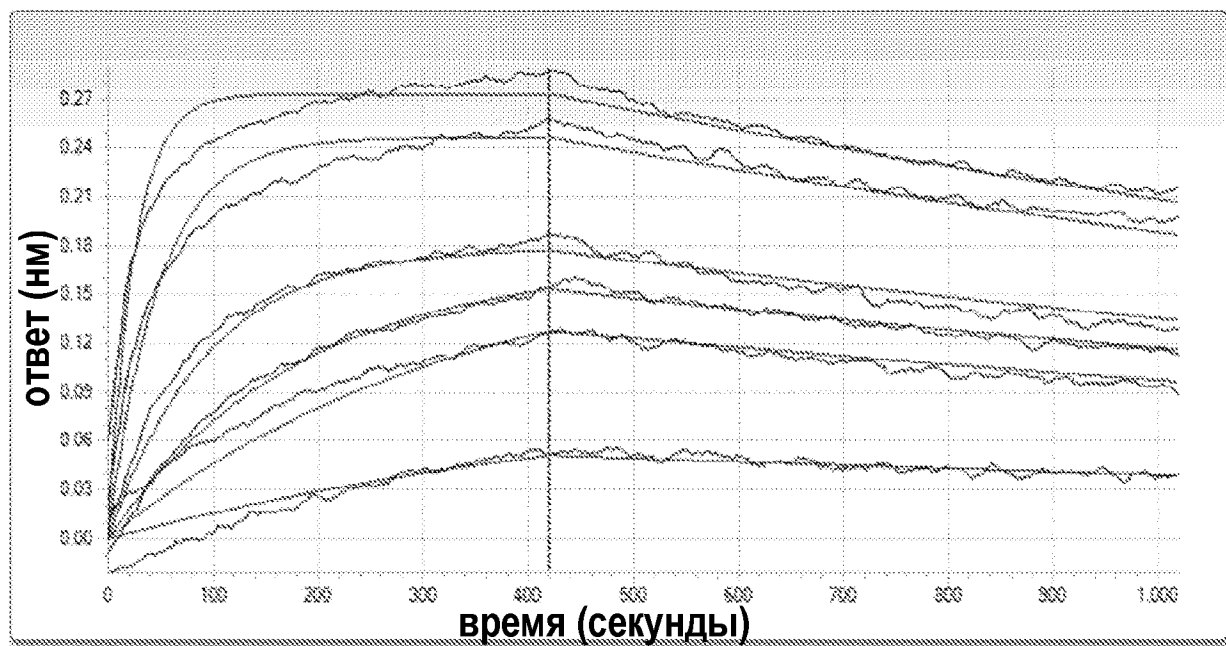
ФИГ. 10



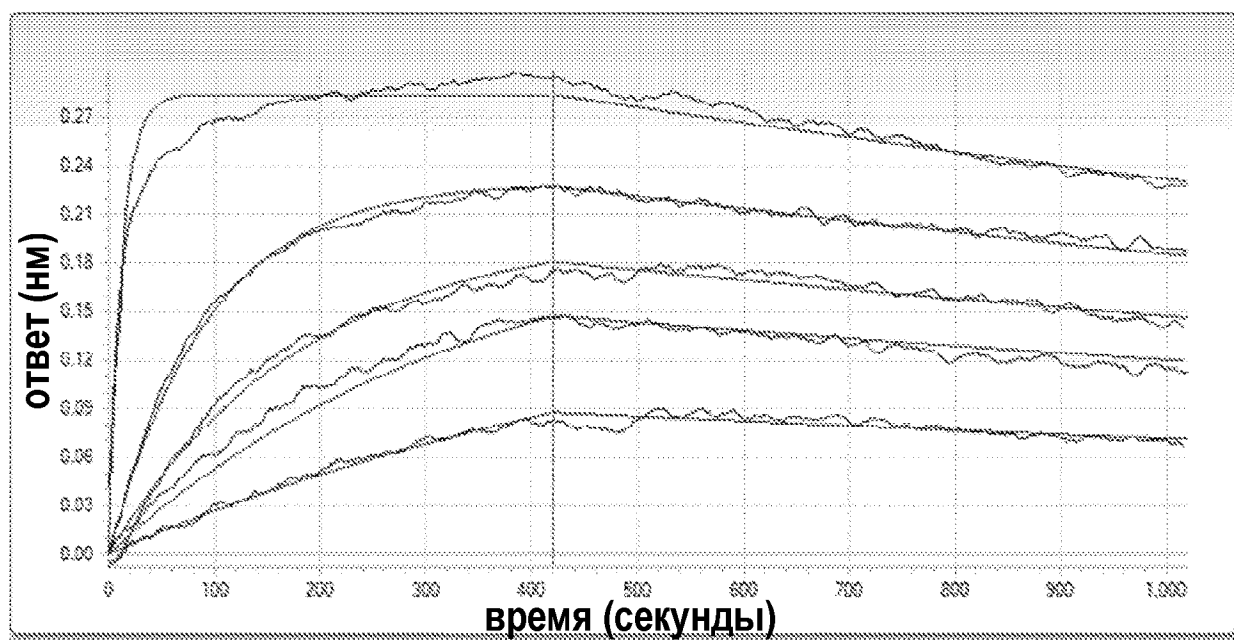
ФИГ. 11



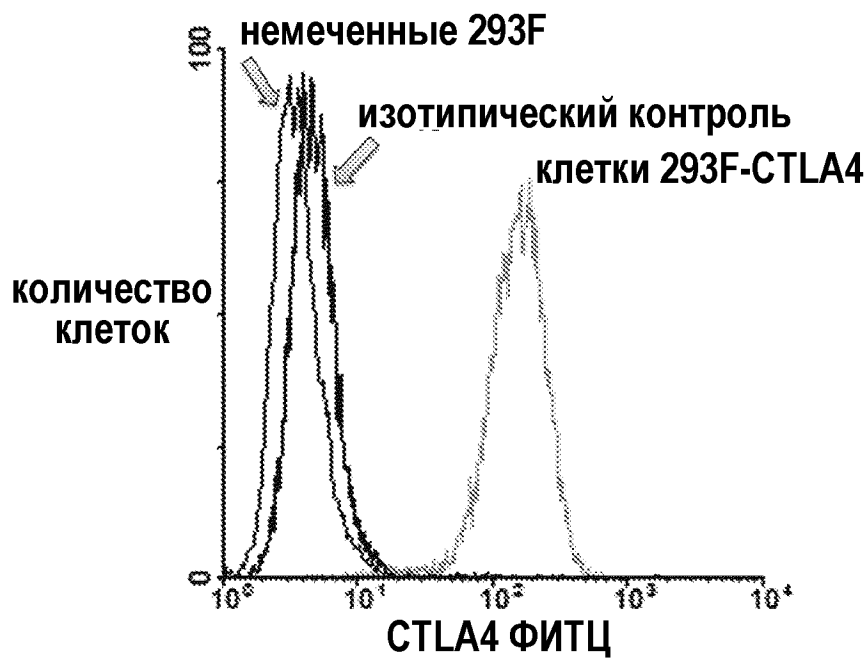
ФИГ. 12



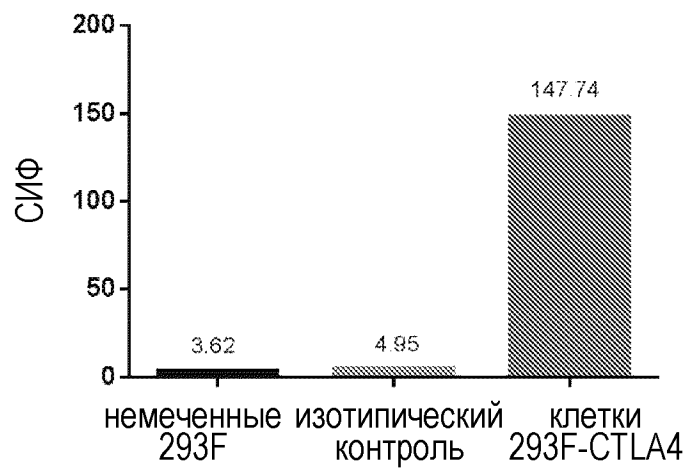
ФИГ. 13



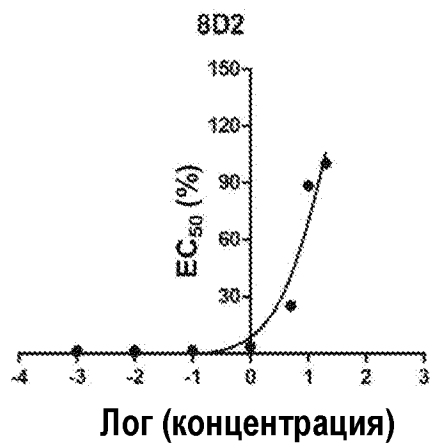
ФИГ. 14



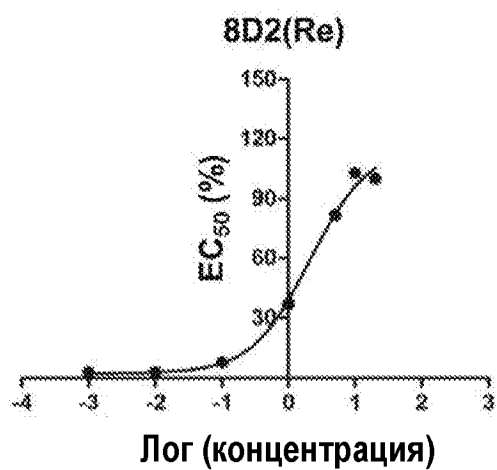
ФИГ. 15



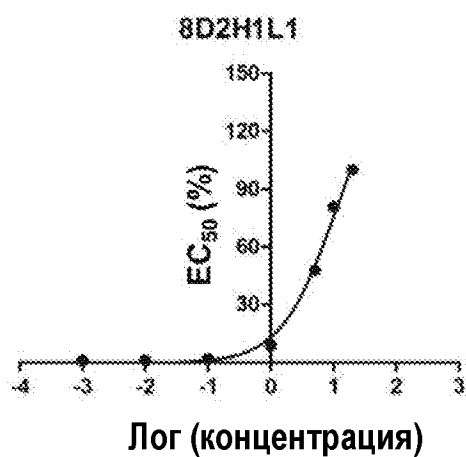
ФИГ. 16



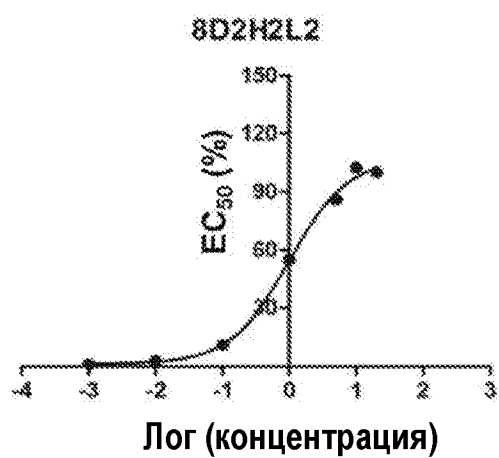
ФИГ. 17



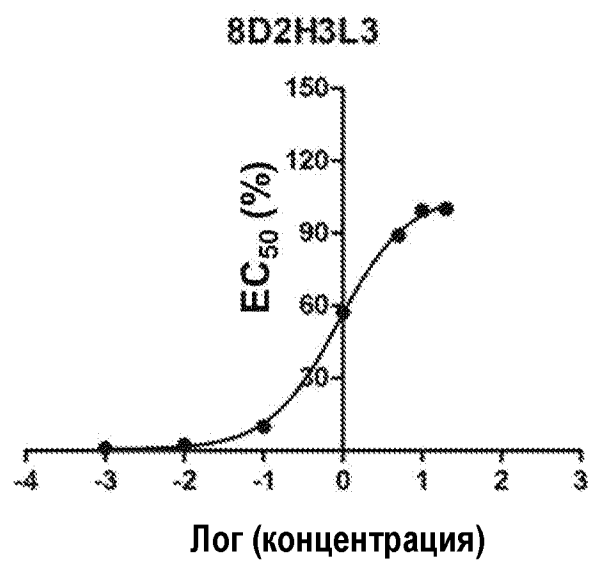
ФИГ. 18



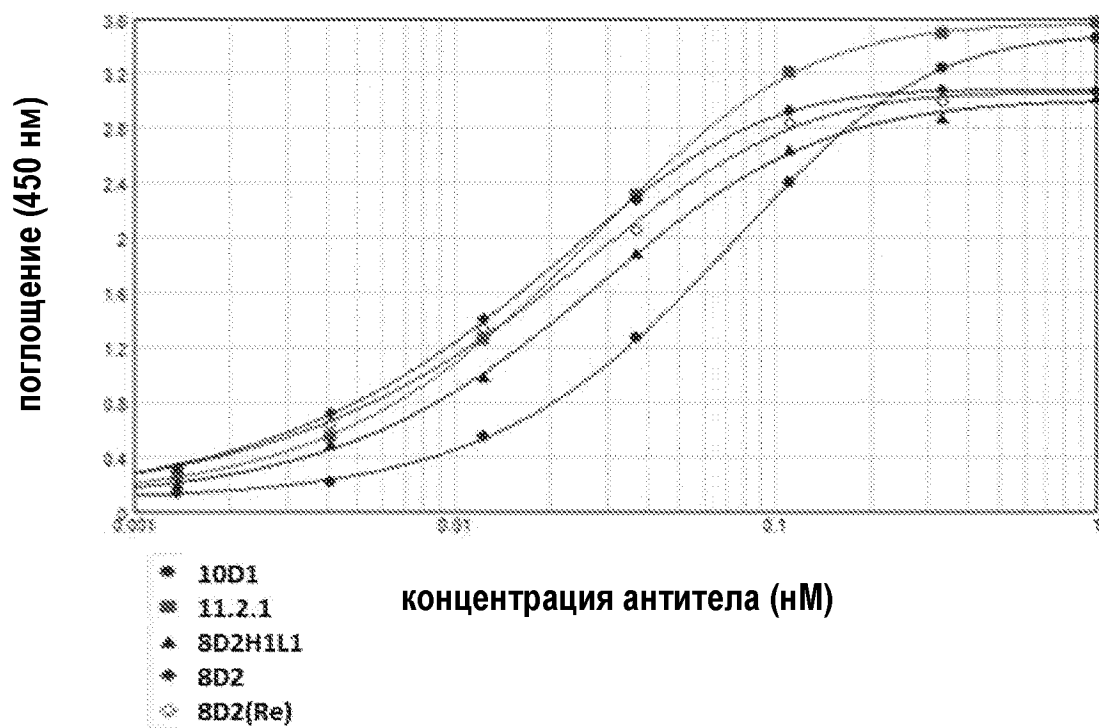
ФИГ. 19



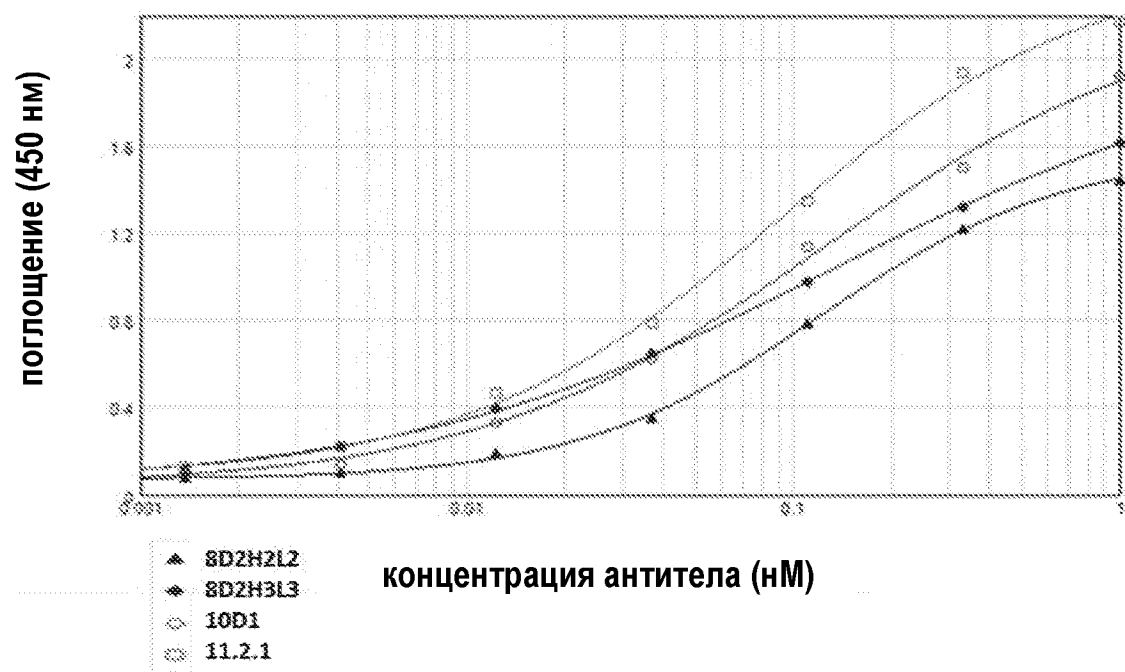
ФИГ. 20



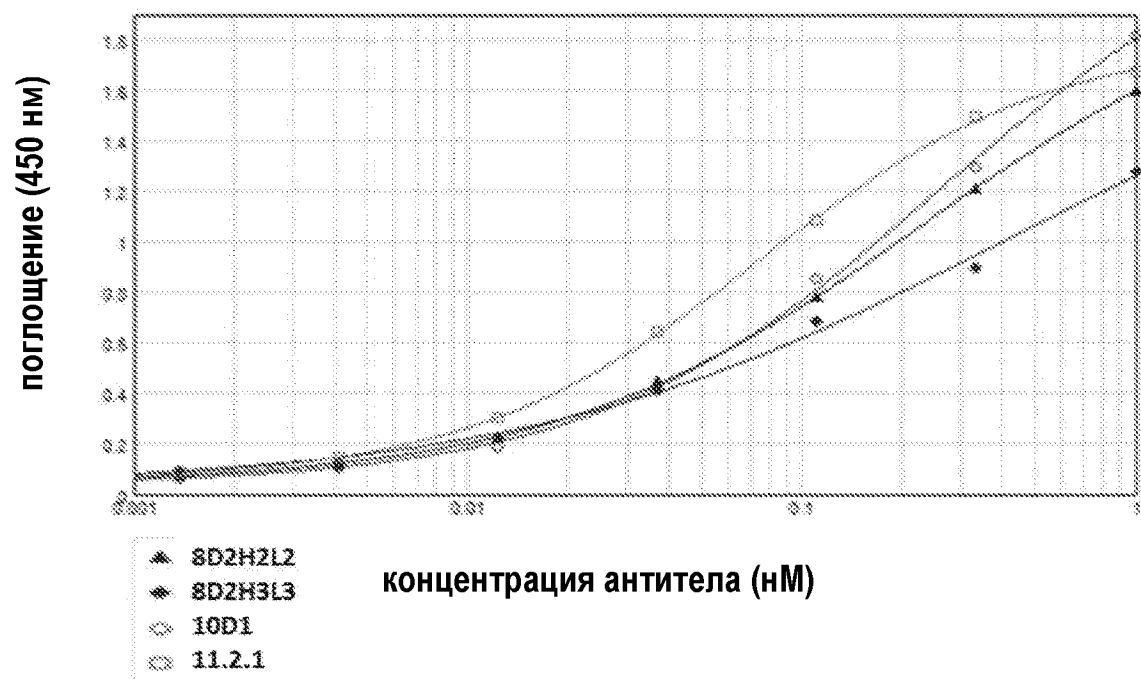
ФИГ. 21



ФИГ. 22

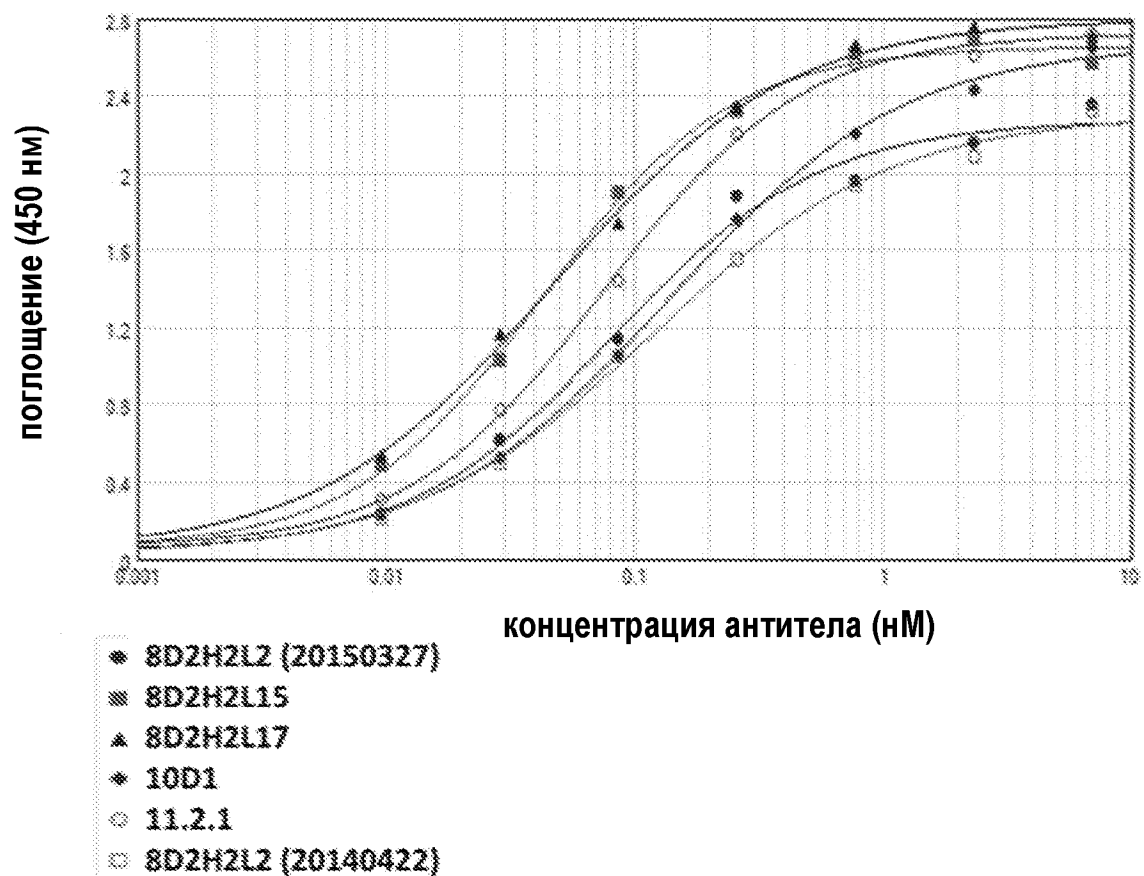


ФИГ. 23

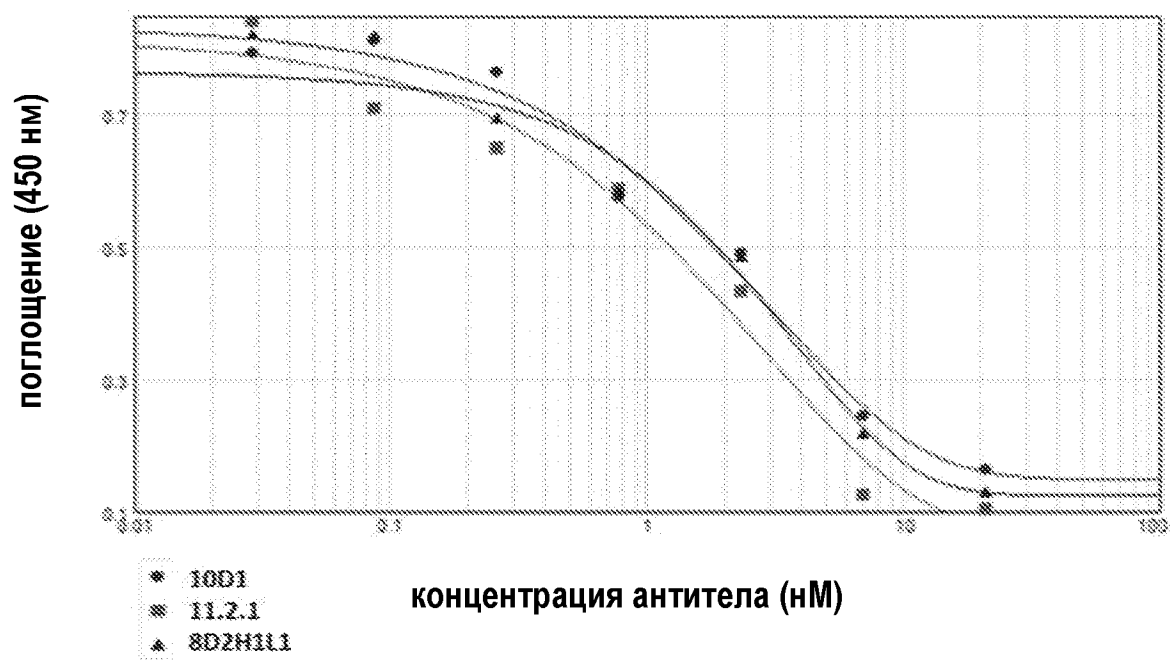


ФИГ. 24

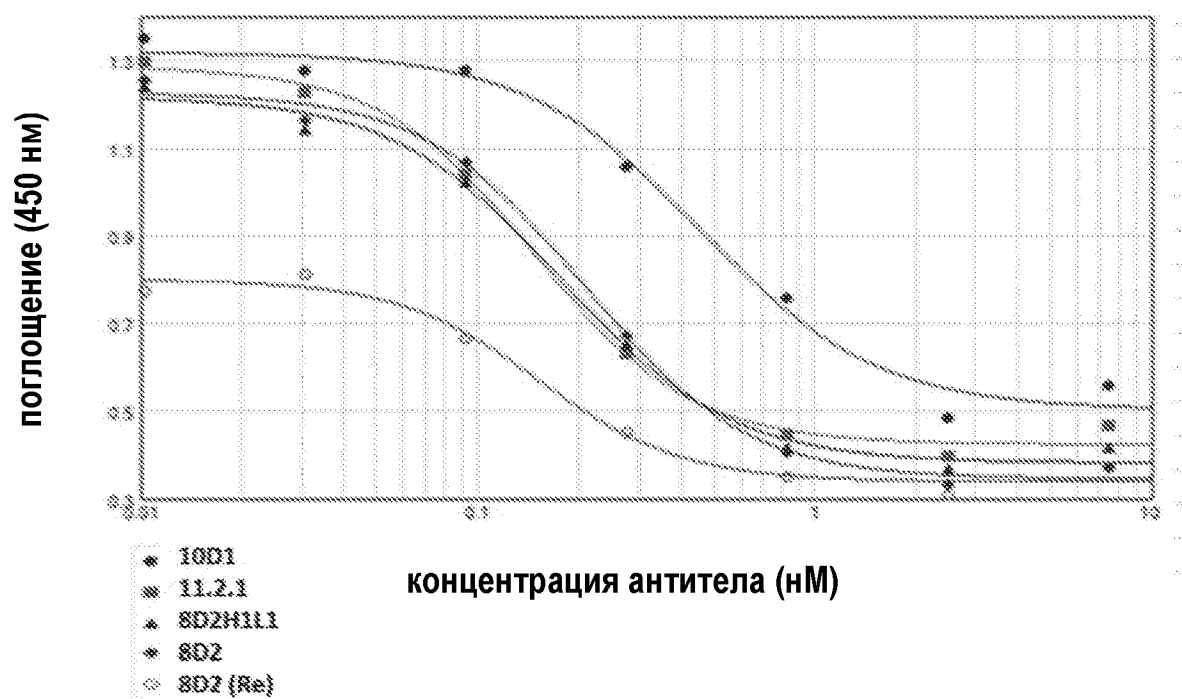
11/15



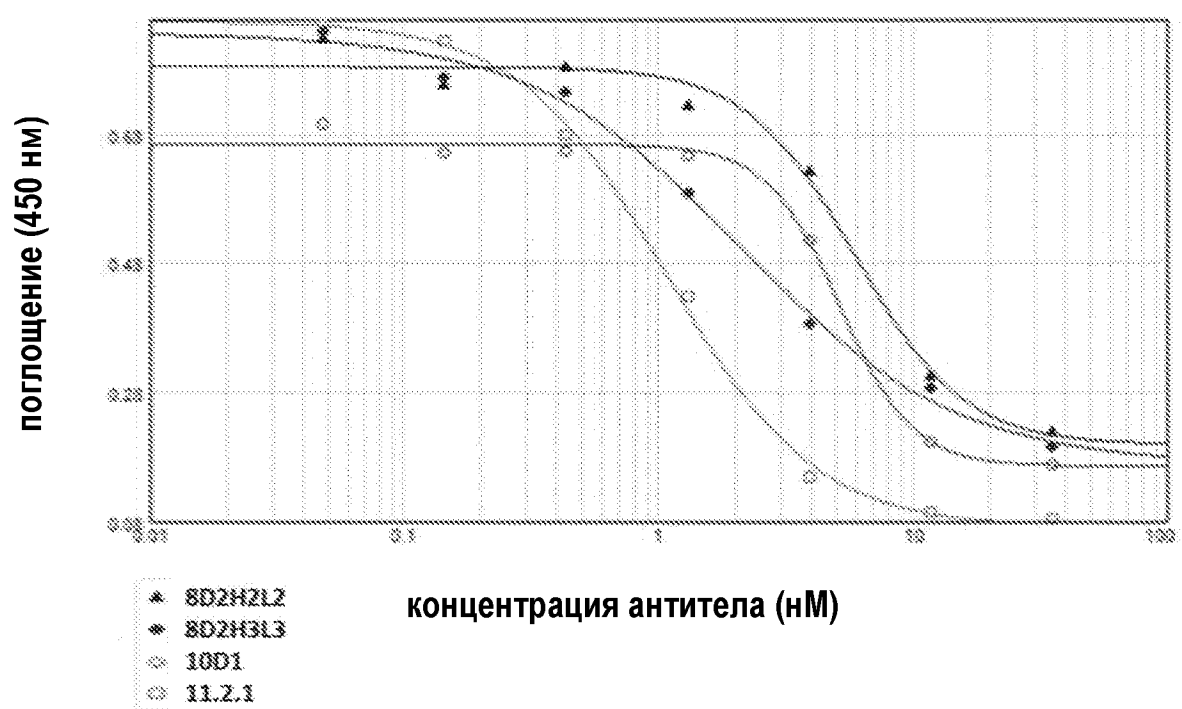
ФИГ. 25



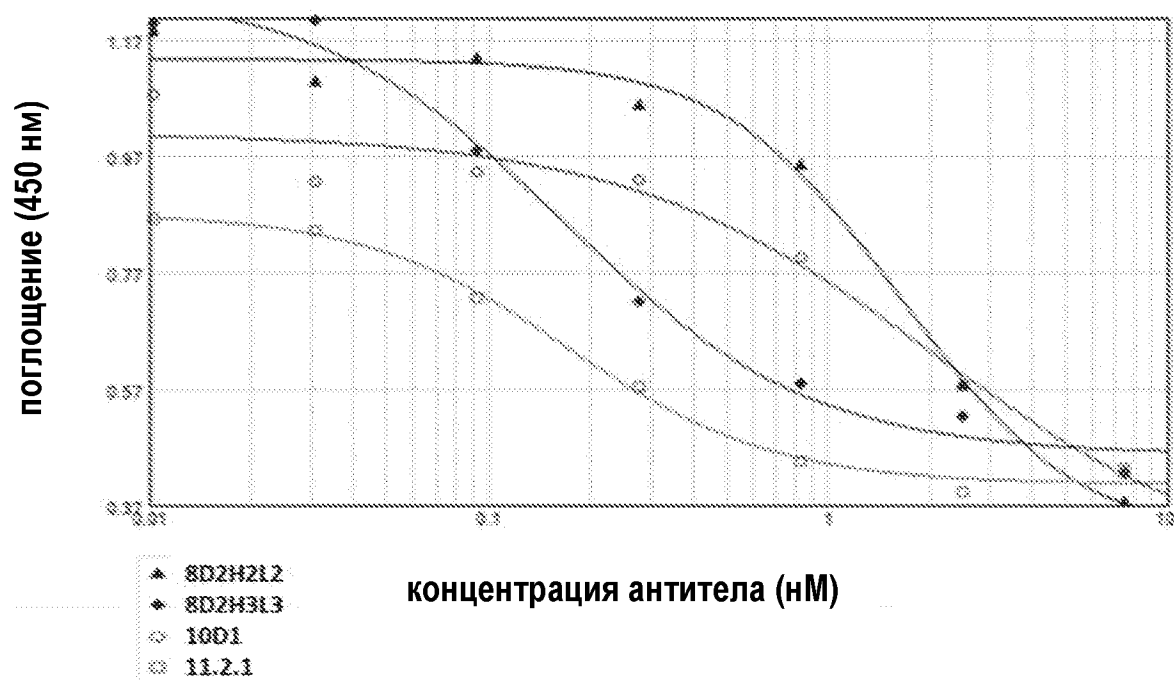
ФИГ. 26



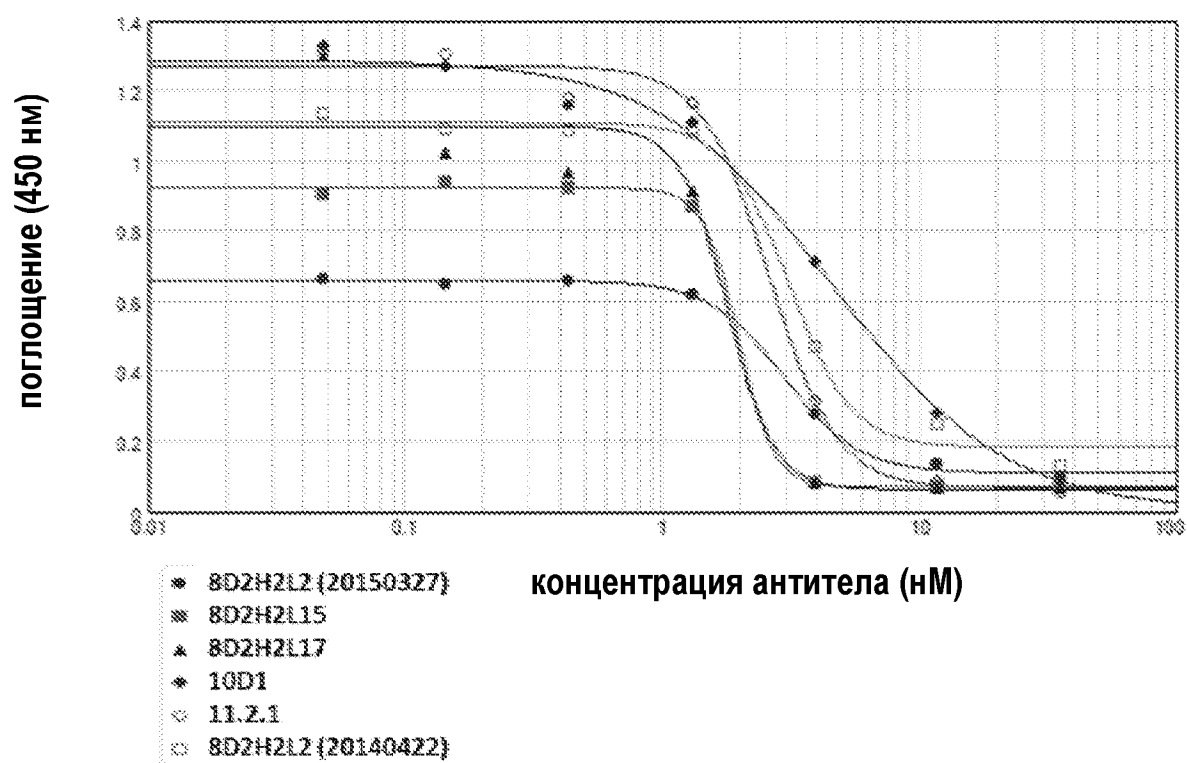
ФИГ. 27



ФИГ. 28

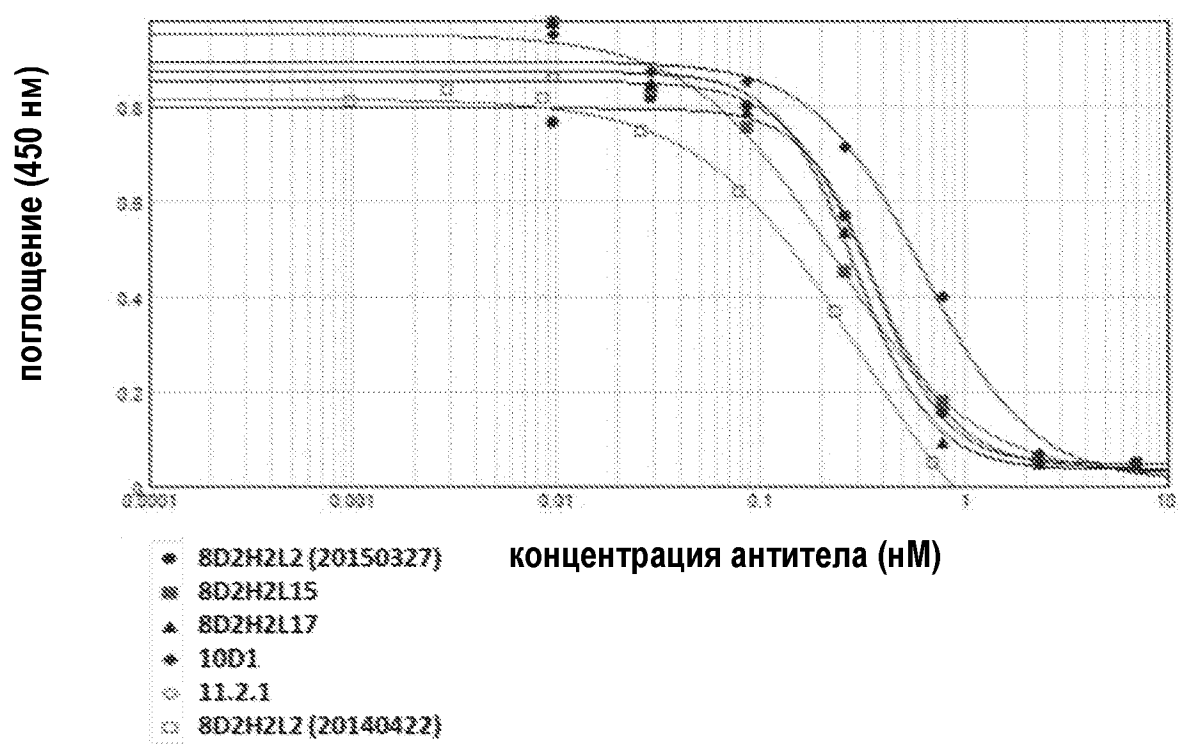


ФИГ. 29

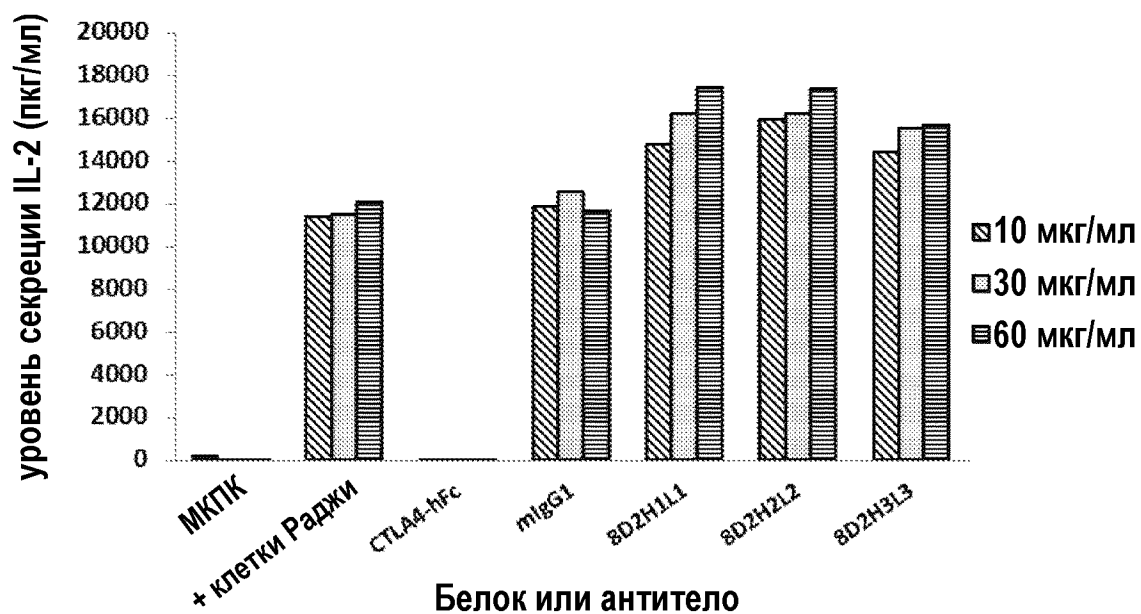


ФИГ. 30

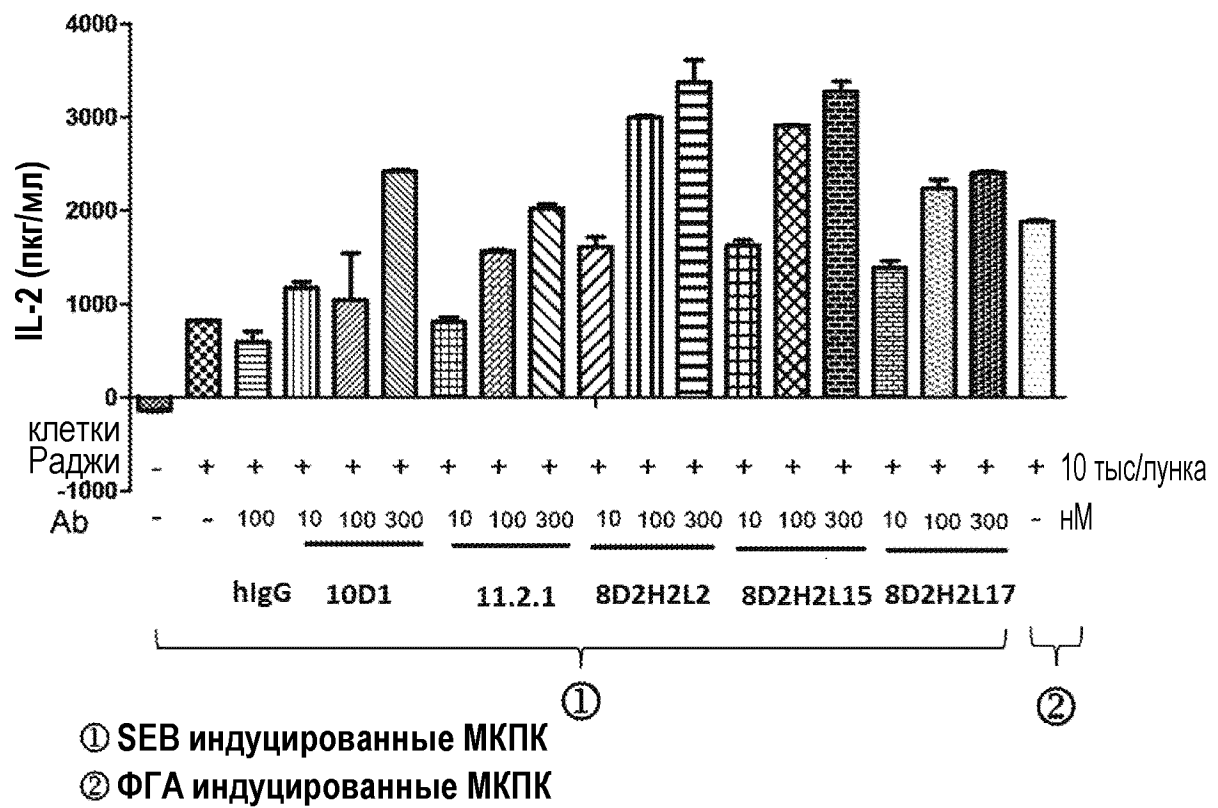
14/15



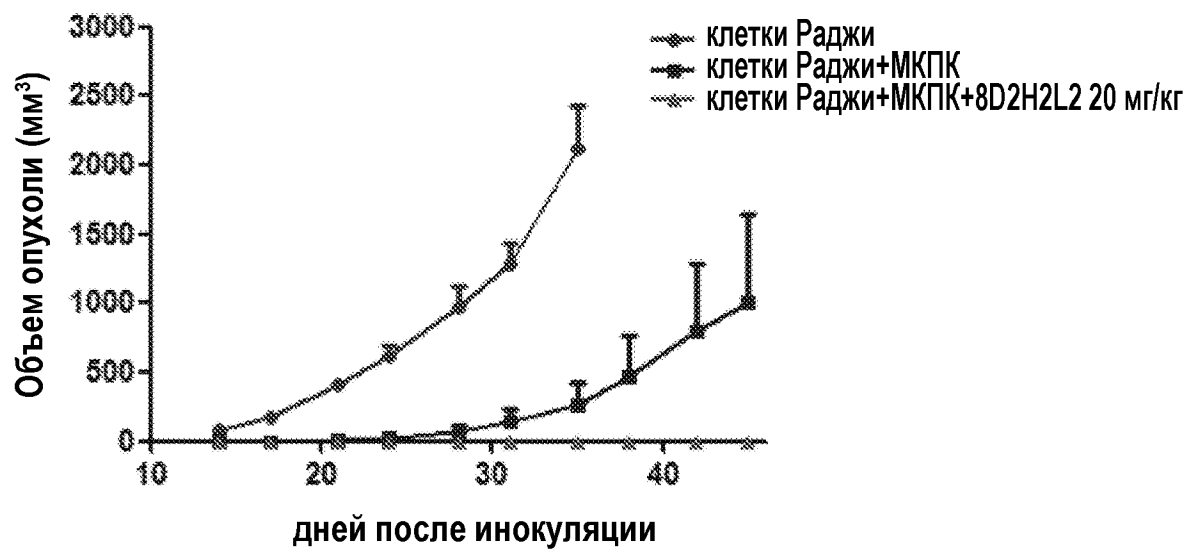
ФИГ. 31



ФИГ. 32



ФИГ. 33



ФИГ. 34