

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992003 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.10

(22) Дата подачи заявки
2018.02.27

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/21 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛ К СТЛА-4 С ПОВЫШЕННОЙ ADCC ДЛЯ УСИЛЕНИЯ
ИММУННОГО ОТВЕТА НА ВАКЦИНУ

(31) 62/464,738; 62/468,527

(32) 2017.02.28; 2017.03.08

(33) US

(86) PCT/US2018/019868

(87) WO 2018/160536 2018.09.07

(71) Заявитель:
БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
Лоффредо Джон Т., Льюис Кэтрин Е.,
Грациано Роберт Ф., Корман Алан Дж.
(US)

(74) Представитель:
Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Глухарёва А.О. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам усиления иммунного ответа на вакцину с применением вариантных форм антител к СТЛА-4, обладающих повышенной ADCC-активностью. Вариантные антитела к СТЛА-4 для применения в настоящем изобретении включают нефукозилированный ипилимумаб.

A1

201992003

201992003

A1

ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛ К CTLA-4 С ПОВЫШЕННОЙ ADCC ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ВАКЦИНУ

ОПИСАНИЕ

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

В настоящей заявке раскрыты способы усиления иммунного ответа на вакцину, и, в частности, применение иммуномодулирующего антитела в качестве адъюванта вакцины.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Вакцины предназначены для вызова иммунного ответа на определенный агент, такой как патоген или опухолевые клетки. Однако вакцины не всегда вызывают иммунный ответ. Адъюванты представляют собой соединения, которые вводят в сочетании с вакцинами для усиления иммунного ответа, но которые, как правило, усиливают гуморальный, а не клеточный иммунный ответ, который является особенно важным для обеспечения эффективности противораковых вакцин. Ikeda *et al.* (2004) *Cancer Sci.* 95:697. В качестве адъювантов вакцин были предложены антитела к иммуномодулирующим рецепторам. См. Keler *et al.* (2003) *J. Immunol.* 171:6251; Ponte *et al.* (2010) *Immunol.* 130:231; Kwek *et al.* (2012) *Nat. Rev. Cancer* 12:289; WO 2009/100140; WO 2014/089113. См. также клиническое испытание NCT00113984 (с применением антитела к CTLA-4 ипилимумаба в качестве потенциального адъюванта для терапевтической вакцины против рака предстательной железы.) Однако существующие адъюванты не всегда являются достаточно эффективными.

Существует потребность в средствах с улучшенной активностью в качестве адъюванта вакцины. Такие улучшенные адъюванты в идеале должны усиливать интенсивность иммунного ответа на вакцину при данной дозе вакцины, обеспечивать возможность уменьшения количества вакцины, необходимого для достижения требуемого уровня иммунного ответа, и/или обеспечивать увеличение продолжительности иммунного ответа. Такие средства предпочтительно будут усиливать не только гуморальный иммунный ответ, но также клеточный иммунный ответ.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к способам усиления иммунного ответа на вакцину с применением антитела к CTLA-4 с повышенной ADCC-активностью. Антитело к CTLA-4 с повышенной ADCC-активностью по настоящему изобретению вводят в

сочетании с вакциной, такой как противоопухолевая вакцина.

Согласно одному варианту осуществления антитело к CTLA-4 с повышенной ADCC-активностью содержит последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 3–8 соответственно. Согласно другому варианту осуществления антитело к CTLA-4 с повышенной ADCC-активностью содержит последовательности V_H и V_L SEQ ID NO: 9 и 10 соответственно. Согласно дополнительному варианту осуществления антитело к CTLA-4 с повышенной ADCC-активностью содержит последовательность HC SEQ ID NO: 11 или 12 и последовательность LC SEQ ID NO: 13.

Согласно альтернативному варианту осуществления антитело к CTLA-4 с повышенной ADCC-активностью содержит последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 14–19 соответственно. Согласно другому варианту осуществления антитело к CTLA-4 с повышенной ADCC-активностью содержит последовательности V_H и V_L SEQ ID NO: 20 и 21 соответственно. Согласно дополнительному варианту осуществления антитело к CTLA-4 с повышенной ADCC-активностью содержит последовательность HC SEQ ID NO: 22 или 23 и последовательность LC SEQ ID NO: 24.

Повышенную ADCC измеряют относительно ADCC-активности ипилимумаба. Согласно различным вариантам осуществления антитело к CTLA-4 по настоящему изобретению характеризуется 2-кратной, 10-кратной или более ADCC по сравнению с ипилимумабом. Согласно одному варианту осуществления ADCC измеряют с помощью анализа опосредованного клетками NK92 лизиса, описанного в примере 2. Согласно одному варианту осуществления антитело к CTLA-4 с повышенной ADCC по настоящему изобретению характеризуется EC50, которая по меньшей мере в два раза ниже, чем EC50 в случае ипилимумаба, в анализе, описанном в примере 2. Согласно другому варианту осуществления антитело к CTLA-4 с повышенной ADCC по настоящему изобретению характеризуется EC50, которая по меньшей мере в десять раз ниже, чем EC50 в случае ипилимумаба, в анализе, описанном в примере 2.

Согласно другим вариантам осуществления антитело к CTLA-4 с повышенной ADCC по настоящему изобретению характеризуется пониженной степенью фукозилирования, или является гипофукозилированным или нефукозилированным. Согласно дополнительным вариантам осуществления антитело к CTLA-4 с повышенной ADCC по настоящему изобретению предусматривает i) одну или несколько мутаций по аминокислоте в Fc-области для повышения способности к связыванию FcγR и необязательно ii) пониженную степень фукозилирования, или устраненное фукозилирование.

Согласно одному варианту осуществления антитело к CTLA-4 с повышенной ADCC по настоящему изобретению представляет собой ипилимумаб с пониженной степенью фукозилирования. Согласно другому варианту осуществления антитело к CTLA-4 с повышенной ADCC по настоящему изобретению представляет собой гипофукозилированный ипилимумаб. Согласно еще одному варианту осуществления антитело к CTLA-4 с повышенной ADCC по настоящему изобретению представляет собой нефукозилированный ипилимумаб.

Согласно другому варианту осуществления антитело к CTLA-4 с повышенной ADCC по настоящему изобретению представляет собой тремелимумаб с пониженной степенью фукозилирования. Согласно другому варианту осуществления антитело к CTLA-4 с повышенной ADCC по настоящему изобретению представляет собой гипофукозилированный тремелимумаб. Согласно еще одному варианту осуществления антитело к CTLA-4 с повышенной ADCC по настоящему изобретению представляет собой нефукозилированный тремелимумаб.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CTLA-4 с повышенной ADCC по настоящему изобретению включает по меньшей мере одну мутацию по аминокислоте, которая обеспечивает повышение способности к связыванию активирующих Fcγ-рецепторов (FcγR), такую как мутация или кластер мутаций, выбранные из группы, состоящей из i) G236A, ii) S239D, iii) F243L, iv) E333A, v) G236A/I332E, vi) S239D/I332E, vii) S267E/H268F, viii) S267E/S324T, ix) H268F/S324T, x) G236A/S239D/I332E, xi) S239D/A330L/I332E, xii) S267E/H268F/S324T и xiii) G236A/S239D/A330L/I332E. Согласно дополнительному варианту осуществления антитело к CTLA-4 человека с повышенной ADCC-активностью, содержащее одну или несколько аминокислот, которые обеспечивают повышение ADCC, также характеризуется пониженной степенью фукозилирования, или является гипофукозилированным или нефукозилированным.

Краткое описание чертежей

Результаты экспериментов, представленные в чертежах, получены на основе трех независимых повторов (повтор А, повтор В и повтор С) экспериментов на мавританских макаках-крабоедах, описанных в примере 1. В повторе А, который включал четыре макака-крабоеда/группа, представлены образцы, применяемые для получения данных, показанных на фигурах 1А, 2А, 3А, 4А, 5А, 7А, 8А и 9А. В повторе В, который включал шесть макаков-крабоедов/группа, представлены образцы, применяемые для получения данных, показанных на фигурах 1В, 2В, 3В, 4В, 5В, 6А (данные по Nef LT9 из повтора А

отсутствуют), 7В, 8В, 9В и 11. В повторе С, который включал шесть макаков-крабоедов/группа, представлены образцы, применяемые для получения данных, показанных на фигурах 1С, 2С, 3С, 4С, 5С, 6В (данные по Nef LT9 из повтора А отсутствуют), 7С, 8С и 9С. Хотя конкретные числовые значения для точек на графике могут варьировать между повторами вследствие незначительных различий в отдельных протоколах эксперимента (например, при сравнении повторов А и В с повтором С), качественные тенденции, и, следовательно, соответствующие научные выводы, являются одинаковыми.

В случае нефукозилированных антител к CTLA-4 в повторах В и С использовали mAb к CTLA-4 человека ипилимумаб (YERVOY®), тогда как в повторе А использовали аллотипический вариант IgG1f ипилимумаба. Оба аллотипа являются функционально эквивалентными в экспериментах в настоящем документе.

На фигурах 1А-1С показаны результаты долгосрочного отслеживания отсортированных с помощью FACS Nef RM9-специфических CD8⁺ CD3⁺ лимфоцитов в цельной крови, полученной от *Mafa-A1*063*⁺ мавританских макаков-крабоедов, обработанных указанными количествами (10 мг/кг или 1 мг/кг) указанных антител, или средой-носителем. Животных также обрабатывали двумя рекомбинантными Ad5-векторами, один из которых экспрессирует белок Nef SIV, а другой экспрессирует белок Gag SIV, как более подробно описано в примере 1. Nef RM9⁺ клетки отбирали на основе их связывания с тетрамерами нагруженных RM9 молекул МНС класса I. «Инертный» вариант, связывающийся с CTLA-4, относится к варианту последовательности тяжелой цепи с мутацией N297A, которая обуславливает удаление сайта N-сцепленного гликозилирования, в результате чего образуется негликозилированная Fc-область, не обладающая эффекторной функцией. На этой фигуре, и всех других фигурах, на которых идет речь о применении «инертного» антитела к CTLA-4, антитело вводили при 10 мг/кг. На всех фигурах 1А-1С 10 мг/кг антитела к CTLA4-NF (направленные вверх треугольники) соответствует самой верхней кривой.

На фигурах 2А-2С показаны результаты долгосрочного отслеживания отсортированных с помощью FACS Gag GW9-специфических CD8⁺ CD3⁺ лимфоцитов в цельной крови, полученной от *Mafa-A1*063*⁺ мавританских макаков-крабоедов, обработанных указанными количествами (10 мг/кг или 1 мг/кг) указанных антител, или средой-носителем. Животных также обрабатывали двумя рекомбинантными Ad5-векторами, один из которых экспрессирует белок Nef SIV, а другой экспрессирует белок Gag SIV, как более подробно описано в примере 1. Gag GW9⁺ клетки отбирали на основе их связывания с тетрамерами нагруженных GW9 молекул МНС класса I. На всех фигурах

2А-2С 10 мг/кг антитела к CTLA4-NF (направленные вверх треугольники) соответствует самой верхней кривой.

На фигурах 3А-3С показаны результаты долгосрочного отслеживания отсортированных с помощью FACS Nef LT9-специфических CD8⁺ CD3⁺ лимфоцитов в цельной крови, полученной от *Mafa-A1*063*⁺ мавританских макаков-крабоедов, обработанных указанными количествами (10 мг/кг или 1 мг/кг) указанных антител, или средой-носителем. Животных также обрабатывали двумя рекомбинантными Ad5-векторами, один из которых экспрессирует белок Nef SIV, а другой экспрессирует белок Gag SIV, как более подробно описано в примере 1. Nef LT9⁺ клетки отбирали на основе их связывания с тетрамерами нагруженных LT9 молекул МНС класса I. На всех фигурах 3А-3С 10 мг/кг антитела к CTLA4-NF (направленные вверх треугольники) соответствует самой верхней кривой.

На фигурах 4А-4С показаны результаты ELISPOT, демонстрирующие индуцированную пептидом Nef RM9 продукцию IFN, выраженную в виде числа клеток, образующих пятна IFN γ (SFC) после вычитания фона, выделенными на градиенте Ficoll PBMC, полученными от *Mafa-A1*063*⁺ мавританских макаков-крабоедов в дни 22 (фиг. 4А) или дни 22 и 43 (фигуры 4В и 4С) после обработки указанными количествами (10 мг/кг или 1 мг/кг) указанных антител, или средой-носителем. На этой и всех других фигурах в настоящем документе, в тех случаях, когда дозировка не указана, антитела вводили при 10 мг/кг. Животных также обрабатывали двумя рекомбинантными Ad5-векторами, один из которых экспрессирует белок Nef SIV, а другой экспрессирует белок Gag SIV, как более подробно описано в примере 1. PBMC стимулировали в течение 18 часов 10 мкМ пептида Nef RM9 для достижения минимального оптимального эффекта.

На фигурах 5А-5С показаны результаты ELISPOT, демонстрирующие индуцированную пептидом Nef GW9 продукцию IFN, выраженную в виде числа клеток, образующих пятна IFN γ (SFC) после вычитания фона, выделенными на градиенте Ficoll PBMC, полученными от *Mafa-A1*063*⁺ мавританских макаков-крабоедов в дни 22 (фиг. 5А) или дни 22 и 43 (фигуры 5В и 5С) после обработки указанными количествами (10 мг/кг или 1 мг/кг) указанных антител, или средой-носителем. Животных также обрабатывали двумя рекомбинантными Ad5-векторами, один из которых экспрессирует белок Nef SIV, а другой экспрессирует белок Gag SIV, как более подробно описано в примере 1. PBMC стимулировали в течение 18 часов 10 мкМ пептида Gag GW9 для достижения минимального оптимального эффекта.

На фигурах 6А-6В показаны результаты ELISPOT, демонстрирующие индуцированную пептидом Nef LT9 продукцию IFN, выраженную в виде числа клеток,

образующих пятна $\text{IFN}\gamma$ (SFC) после вычитания фона, выделенными на градиенте Ficoll PBMC, полученными от *Mafa-A1*063+* мавританских макаков-крабоедов в дни 22 и дни 43 после обработки указанными количествами (10 мг/кг или 1 мг/кг) указанных антител, или средой-носителем. Этот эксперимент не включает данные из повтора А, только повторов В и С. Животных также обрабатывали двумя рекомбинантными Ad5-векторами, один из которых экспрессирует белок Nef SIV, а другой экспрессирует белок Gag SIV, как более подробно описано в примере 1. PBMC стимулировали в течение 18 часов 10 мкМ пептида Nef LT9 для достижения минимального оптимального эффекта.

На фигурах 7А-7С показаны результаты долгосрочного отслеживания числа Ki-67^+ CD4^+ CD3^+ лимфоцитов (измеряемого с помощью проточной цитометрии), циркулирующих в цельной крови у *Mafa-A1*063+* мавританских макаков-крабоедов, обработанных указанными количествами (10 мг/кг или 1 мг/кг) указанных антител, или средой-носителем. Животных также обрабатывали двумя рекомбинантными Ad5-векторами, один из которых экспрессирует белок Nef SIV, а другой экспрессирует белок Gag SIV, как более подробно описано в примере 1. Ki-67 является внутриклеточным маркером пролиферации. Значения, представленные для дня 43 на фигурах 7С и 8С, оказались аномально высокими, и, вероятно, являются выпадающими значениями.

На фигурах 8А-8С показаны результаты долгосрочного отслеживания числа Ki-67^+ CD8^+ CD3^+ лимфоцитов (измеряемого с помощью проточной цитометрии), циркулирующих в цельной крови у *Mafa-A1*063+* мавританских макаков-крабоедов, обработанных указанными количествами (10 мг/кг или 1 мг/кг) указанных антител, или средой-носителем. Животных также обрабатывали двумя рекомбинантными Ad5-векторами, один из которых экспрессирует белок Nef SIV, а другой экспрессирует белок Gag SIV, как более подробно описано в примере 1. Ki-67 является внутриклеточным маркером пролиферации. На всех фигурах 8А-8С 10 мг/кг антитела к CTLA4-NF (направленные вверх треугольники) соответствует самой верхней кривой.

На фигурах 9А-9С показаны результаты ELISPOT, демонстрирующие индуцированную белками Ad5 продукцию $\text{IFN}\gamma$, выраженную в виде числа клеток, образующих пятна $\text{IFN}\gamma$ (SFC) после вычитания фона, выделенными на градиенте Ficoll PBMC, полученными от *Mafa-A1*063+* мавританских макаков-крабоедов в дни 22 и дни 43 после обработки указанными количествами (10 мг/кг или 1 мг/кг) указанных антител, или средой-носителем. В тех случаях, когда дозировка не указана, антитела вводили при 10 мг/кг. Животных также обрабатывали двумя рекомбинантными Ad5-векторами, один из которых экспрессирует белок Nef SIV, а другой экспрессирует белок Gag SIV, как более подробно описано в примере 1. PBMC стимулировали в течение 18 часов 5×10^8

термоинактивированными вирусными частицами Ad5.

На фиг. 10 показаны эффекты, обусловленные отсутствием фукозилирования у антитела к CTLA-4 ипилимумаба, в отношении специфического опосредованного НК-клетками лизиса целевых клеток. На фигуре представлены титры ипилимумаба (точки на графике в виде кружков) и нефукозилированного варианта ипилимумаба (точки на графике в виде квадратов, самая верхняя кривая) по сравнению с изотипическим контролем (точки на графике в виде треугольников, нижняя кривая), в анализе способности клеточной линии NK92 индуцировать специфический лизис активированных T_{reg} от донора-человека. См. пример 2. Нефукозилированная Fc обеспечивает повышение литической активности ипилимумаба, обуславливая при этом снижение EC_{50} с 1,5 мкг/мл до 0,0065 мкг/мл.

На фиг. 11 показана частота встречаемости T_{reg} в крови у *Mafa-A1*063+* мавританских макаков-крабоедов, обработанных 10 мг/кг ипилимумаба, 10 мг/кг ипилимумаб-NF или средой-носителем. Данные были получены для обезьян из повтора В. См. пример 1. Данные по ипилимумабу представлены в виде ромбов на пунктирной линии, которая в целом представляет собой самую верхнюю кривую. Данные по ипилимумабу-NF представлены в виде треугольников на жирной линии, которая в целом представляет собой среднюю кривую. Данные по среде-носителю представлены в виде кружков на точечной линии, которая в целом представляет собой самую нижнюю кривую. Точки на графике соответствуют средним значениям для 6 животных с планками погрешностей, соответствующими одному стандартному отклонению.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Определения

Для того, чтобы настоящее раскрытие могло быть более понятным, сначала приводятся определенные термины. В контексте настоящей заявки, если настоящим документом явно не предусмотрено иное, каждый из следующих терминов имеет значение, изложенное ниже. Дополнительные определения изложены по всему тексту заявки.

«Адьювант» в контексте настоящего документа относится к средству, которое вводят субъекту в сочетании с вакциной для усиления иммунного ответа на вакцину по сравнению с иммунным ответом, который будет обеспечиваться в результате введения вакцины без адьюванта. Адьюванты по настоящему изобретению представляют собой антитела к CTLA-4 с повышенной ADCC-активностью.

«Осуществлять введение», «вводить» или «введение» относится к физическому введению субъекту содержащей терапевтическое средство композиции с применением любого из ряда способов и систем доставки, известных специалистам в данной области.

Предпочтительные пути введения для антител по настоящему изобретению включают внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный, спинномозговой или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Фраза «парентеральное введение» в контексте настоящего документа означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включает без ограничения внутривенную, внутрибрюшинную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрелимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, интраорбитальную, интракардиальную, внутрикожную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию, а также *in vivo* электропорацию. В качестве альтернативы, антитело по настоящему изобретению можно вводить путем, отличным от парентерального, как, например, посредством местного, эпидермального или мукозального пути введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также можно осуществлять, например, однократно, множество раз и/или в течение одного или нескольких длительных периодов.

Введение антитела к CTLA-4 с повышенной ADCC «в сочетании с» вакциной охватывает любой порядок введения или одновременное введение, включая любую схему применения или число введений, при условии, что подразумевается, что введение антитела к CTLA-4 с повышенной ADCC усиливает иммунный ответ на вакцину.

«Антитело» (Ab) включает без ограничения являющийся гликопротеином иммуноглобулин, который специфически связывается с антигеном и содержит по меньшей мере две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC), соединенные друг с другом дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (в настоящем документе сокращено как V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (в настоящем документе сокращено как V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, C_L . V_H - и V_L -области дополнительно могут быть разделены на гиперпеременные области, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных, от amino-конца к карбокси-концу, в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном.

В контексте настоящего документа и в соответствии с общепринятым толкованием антитело, описанное как содержащее тяжелую цепь и/или легкую цепь, относится к антителам, которые содержат «по меньшей мере одну» из указанных тяжелых и/или легких цепей, и, таким образом, будет охватывать антитела с двумя или более тяжелыми и/или легкими цепями. В частности, описанные таким образом антитела будут охватывать обычные антитела с двумя практически идентичными тяжелыми цепями и двумя практически идентичными легкими цепями. Цепи антитела могут быть в основном идентичными, но не полностью идентичными, если они отличаются вследствие посттрансляционных модификаций, таких как С-концевое отщепление лизиновых остатков, альтернативных паттернов гликозилирования и т. д. Однако антитела, отличающиеся по фукозилированию в пределах гликана, не являются в основном идентичными.

Если не указано иное или не очевидно из контекста, антитело, определяемое по его целевой специфичности (например, «антитело к CTLA-4»), относится к антителам, которые могут связываться с их мишенями у человека (например, CTLA-4 человека). Такие антитела могут связываться или могут не связываться с CTLA-4 других видов.

Иммуноглобулин может относиться к любому из общеизвестных изотипов, включая без ограничения IgA, секреторные IgA, IgG и IgM. Изотип IgG у некоторых видов может быть разделен на подклассы: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у людей и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей. «Изотип» относится к классу антител (например, IgM или IgG1), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. «Антитело» включает, в качестве примера, как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе антитела, включая аллотипические варианты; моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; человеческие или отличные от человеческих антитела; полностью синтетические антитела; и одноцепочечные антитела. Если не указано иное или не очевидно из контекста, раскрытые в настоящем документе антитела являются IgG1-антителами человека. Последовательности константного домена IgG1 включают без ограничения аллотипические варианты IgG1, в настоящем документе представленные как константный домен ипилимумаба (IgG1fa, остатки 119–448 SEQ ID NO: 11 и 119–447 SEQ ID NO: 12) и IgG1za (SEQ ID NO: 28 и 29).

«Выделенное антитело» относится к антителу, которое практически не содержит других антител с другими типами антигенной специфичности (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4, практически не содержит антител, которые специфически связываются с отличными от CTLA-4 антигенами). Выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4, может, однако, характеризоваться

перекрестной реактивностью с другими антигенами, такими как молекулы CTLA-4 других видов. Более того, выделенное антитело может практически не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ. Для сравнения, «выделенная» нуклеиновая кислота относится к группе нуклеиновых кислот, которые заметно отличаются, т. е. характеризуются отличающимися химическим названием, природой и функциональными свойствами, от нуклеиновых кислот, существующих в природе. Например, выделенная ДНК, в отличие от нативной ДНК, представляет собой обособленную часть нативной ДНК и не является неотъемлемой частью более крупного структурного комплекса, хромосомы, обнаруживаемого в природе. Кроме того, выделенную ДНК, в отличие от нативной ДНК, можно применять в качестве ПЦР-праймера или зонда для гибридизации, среди прочего, для измерения уровня экспрессии генов и выявления генов или мутаций в качестве биомаркеров для диагностирования заболевания или предсказания эффективности терапевтического препарата. Выделенная нуклеиновая кислота также может быть очищена таким образом, чтобы она практически не содержала других клеточных компонентов или других контаминирующих веществ, например, других нуклеиновых кислот или белков клетки, с применением стандартных методик, хорошо известных в данной области.

Термин «моноклональное антитело» (mAb) относится к препарату молекул антител одного молекулярного состава, т. е. молекул антител, первичные последовательности которых являются практически идентичными, и которые характеризуются одной специфичностью связывания и аффинностью в отношении конкретного эпитопа. Моноклональные антитела можно получать с помощью гибридомной, рекомбинантной, трансгенной или других технологий, известных специалистам в данной области.

Антитело «человека» (HuMAb) относится к антителу, содержащему вариабельные области, в которых как каркасные, так и CDR-области происходят из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, то константная область также происходит из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека по настоящему изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, в случае мутаций, введенных с применением случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*). Однако подразумевается, что в контексте настоящего документа термин «антитело человека» не включает антитела, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих, например, мыши, были привиты на каркасные последовательности

человека. Термины антитела «человека» и «полностью человеческие» антитела применяют как синонимы.

«Гуманизированное» антитело относится к антителу с CDR-областями, происходящими из организма животного, не являющегося человеком, например, грызуна, с последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии, в которых некоторые, большинство или все из аминокислот вне CDR-доменов замещены соответствующими аминокислотами, происходящими из иммуноглобулинов человека. Согласно одному варианту осуществления гуманизированной формы антитела некоторые, большая часть или все из аминокислот вне CDR-доменов были замещены аминокислотами из иммуноглобулинов человека, тогда как некоторые, большая часть или все из аминокислот в пределах одной или нескольких CDR-областей остались неизменными. Допускаются небольшие добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот, при условии, что они не устраняют способность антитела связываться с конкретным антигеном. «Гуманизированное» антитело сохраняет антигенную специфичность, аналогичную таковой исходного антитела.

«Химерное антитело» относится к антителу, в котором переменные области происходят из одного вида, а константные области происходят из другого вида, как, например, антитело, в котором переменные области происходят из антитела мыши, а константные области происходят из антитела человека.

«Фрагмент антитела» относится к участку целого антитела, обычно включающему «антигенсвязывающий участок» («антигенсвязывающий фрагмент») интактного антитела, который сохраняет способность связываться, в частности, с антигеном, связываемым интактным антителом, и в нем также сохраняется Fc-область антитела, опосредующая FcR-связывающую способность.

«Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность» («ADCC») относится к *in vitro* или *in vivo* клеточноопосредованному взаимодействию, при котором неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют FcR (например, естественные клетки-киллеры (NK), макрофаги, нейтрофилы и эозинофилы), распознают антитело, связанное с поверхностным антигеном на поверхности целевой клетки и, впоследствии, обуславливают лизис целевой клетки. В целом, любая эффекторная клетка с активирующим FcR может быть запущена для опосредования ADCC.

«Повышенная ADCC» или «повышенная ADCC-активность» в контексте настоящего документа в отношении антител к CTLA-4 по настоящему изобретению относится к уровням ADCC-активности, превышающим уровни ADCC, индуцируемой немодифицированным ипилимумабом. Ипилимумаб с повышенной ADCC по настоящему

изобретению, например, представляет собой модифицированную форму ипилимумаба, которая индуцирует более высокую ADCC, чем ипилимумаб с его нативным константным доменом IgG1. В случае тремелиумаба повышенную ADCC также измеряют относительно ипилимумаба. «Ипилимумаб», «ipi» и YERVOY® в контексте настоящего документа в описании и фигурах, если явно не указано иное, относятся к антителу, содержащему легкую цепь SEQ ID NO: 13 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 12 (без C-концевого лизинового остатка). В контексте экспериментов только с повтором A, «ипилимумаб» охватывает аллотипический вариант, предусматривающий мутации D357E и L359M (IgG1f). Согласно некоторым вариантам осуществления уровень повышения ADCC-активности измеряют как по меньшей мере двукратное, и необязательно по меньшей мере десятикратное уменьшение EC₅₀ для опосредованного клетками NK92 лизиса клеток в анализе, описанном в примере 2.

«Рак» относится к широкой группе различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Неконтролируемое деление и рост клеток приводит к образованию злокачественных опухолей или клеток, которые проникают в соседние ткани и могут также давать метастазы в удаленные части организма через лимфатическую систему или кровяное русло.

«Рецептор клеточной поверхности» относится к молекулам и комплексам молекул, способным получать сигнал и передавать такой сигнал через плазматическую мембрану клетки.

«Эффекторная функция» относится к взаимодействию Fc-области антитела с Fc-рецептором или лигандом, или биохимическому событию, которое является результатом этого. Иллюстративные «эффекторные функции» включают связывание C1q, комплементзависимую цитотоксичность (CDC), связывание Fc-рецептора, FcγR-опосредованные эффекторные функции, такие как ADCC и антителозависимый клеточноопосредованный фагоцитоз (ADCP), и отрицательную регуляцию рецептора клеточной поверхности (например, рецептора В-клетки; BCR). Для обеспечения таких эффекторных функций обычно требуется объединение Fc-области со связывающим доменом (например, варибельным доменом антитела).

«Fc-рецептор» или «FcR» представляет собой рецептор, который связывается с Fc-областью иммуноглобулина. FcR, которые связываются с IgG-антителом, предусматривают рецепторы семейства FcγR, включая аллельные варианты и образованные в результате альтернативного сплайсинга формы таких рецепторов. Семейство FcγR состоит из трех активирующих (FcγRI, FcγRII и FcγRIII у мышей; FcγRIA, FcγRIIA и FcγRIIA у людей) рецепторов и одного ингибирующего (FcγRIIB) рецептора. Различные свойства FcγR

человека представлены в таблице 1. Большинство типов эффекторных клеток врожденного иммунитета коэкспрессируют один или несколько активирующих FcγR и ингибирующий FcγRIIB, тогда как естественные клетки-киллеры (NK) избирательно экспрессируют один активирующий Fc-рецептор (FcγRIII у мышей и FcγRIIIA у людей), но не ингибирующий FcγRIIB у мышей и людей.

«Fc-область» (кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина), или «Fc-домен», или «Fc» относится к C-концевой области тяжелой цепи антитела, которая опосредует связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая связывание с Fc-рецепторами, расположенными на поверхности ряда клеток иммунной системы (например, эффекторных клеток) или с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Таким образом, Fc-область представляет собой полипептид, предусматривающий константную область антитела, за исключением первого иммуноглобулинового домена константной области. У антител изотипов IgG, IgA и IgD Fc-область состоит из двух идентичных белковых фрагментов, происходящих из второго (C_{H2}) и третьего (C_{H3}) константных доменов двух тяжелых цепей антитела; Fc-области IgM и IgE содержат три константных домена тяжелой цепи (C_H-домены 2-4) в каждой полипептидной цепи. В случае IgG, Fc-область содержит иммуноглобулиновые домены Cγ2 и Cγ3 и шарнир между Cγ1 и Cγ2. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут различаться, Fc-область тяжелой цепи IgG человека обычно определена отрезком от аминокислотного остатка в положении C226 или P230 до карбокси-конца тяжелой цепи, где нумерация указана в соответствии с EU-индексом по Kabat. C_{H2}-домен Fc-области IgG человека простирается от приблизительно аминокислоты 231 до приблизительно аминокислоты 340, тогда как C_{H3}-домен расположен с C-концевой стороны C_{H2}-домена в Fc-области, т. е. он простирается от приблизительно аминокислоты 341 до приблизительно аминокислоты 447 IgG. В контексте настоящего документа Fc-область может представлять собой Fc с нативной последовательностью или вариантную Fc. Fc также может относиться к такой области отдельно или в контексте полипептида в составе Fc-содержащего белка, такого как «связывающий белок, содержащий Fc-область», также называемого «слитым белком на основе Fc» (например, антитело или иммуноадгезин).

Таблица 1.

Свойства FcγR человека.

Fcγ	Аллельные варианты	Аффинность к IgG человека	Предпочтение в отношении изотипа	Распространенность по типам клеток
FcγRI	Не описано	Высокая ($K_D \sim 10$ нМ)	IgG1=3>4>>2	Моноциты, макрофаги, активированные нейтрофилы, дендритные клетки?
FcγRIIA	H131	От низкой до средней	IgG1>3>2>4	Нейтрофилы, моноциты, макрофаги, эозинофилы, дендритные клетки, тромбоциты
	R131	Низкая	IgG1>3>4>2	
FcγRIIA	V158	Средняя	IgG1=3>>4>2	NK-клетки, моноциты, макрофаги, тучные клетки, эозинофилы, дендритные клетки?
	F158	Низкая	IgG1=3>>4>2	
FcγRIIB	I232	Низкая	IgG1=3=4>2	В-клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки
	T232	Низкая	IgG1=3=4>2	

Термины «фукозилированный» и «нефукозилированный» в контексте настоящего документа относятся к присутствию или отсутствию корового остатка фукозы на N-сцепленном гликане в положении N297 антитела (нумерация EU).

«Иммунный ответ» относится к биологическому ответу у позвоночного на чужеродные агенты, причем указанный ответ защищает организм от таких агентов и от возникновения вызываемых ими заболеваний. Иммунный ответ опосредуется действием клетки иммунной системы (например, Т-лимфоцита, В-лимфоцита, естественной клетки-киллера (NK), макрофага, эозинофила, тучной клетки, дендритной клетки или нейтрофила) и растворимыми макромолекулами, продуцируемыми любыми из этих клеток или печенью (включая антитела, цитокины и белки системы комплемента), что приводит к избирательному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или устранению из организма позвоночного инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых или других аномальных клеток, или, в случаях аутоиммунной реакции или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека.

«Иммуномодулятор» или «иммунорегулятор» относится к компоненту сигнального

пути, который может быть вовлечен в модулирование, регулирование или модифицирование иммунного ответа. «Модулирование», «регулирование» или «модифицирование» иммунного ответа относится к любому изменению по отношению к клетке иммунной системы или активности такой клетки. Такая модуляция включает стимуляцию или подавление иммунной системы, которые могут проявляться в увеличении или уменьшении числа различных типов клеток, повышении или снижении активности таких клеток или любых других изменениях, которые могут иметь место в рамках иммунной системы. Были идентифицированы как ингибирующие, так и стимулирующие иммуномодуляторы, некоторые из которых могут характеризоваться усиленной функцией в микроокружении опухоли. Согласно предпочтительным вариантам осуществления раскрытого изобретения иммуномодулятор находится на поверхности Т-клетки. «Иммуномодулятор-мишень» или «иммунорегулятор-мишень» представляет собой иммуномодулятор, который является мишенью для связывания, и активность которого изменяется при связывании веществом, средством, группой, соединением или молекулой. Иммуномодуляторы-мишени включают, например, рецепторы на поверхности клетки («иммуномодулирующие рецепторы») и лиганды рецепторов («иммуномодулирующие лиганды»).

«Иммунотерапия» относится к лечению субъекта, страдающего от заболевания, или подверженного риску развития или перенесения рецидива заболевания, с помощью способа, предусматривающего индуцирование, усиление, подавление или какое-либо другое модифицирование иммунного ответа.

«Потенцирование эндогенного иммунного ответа» означает повышение эффективности или активности имеющегося иммунного ответа у субъекта. Повышение эффективности и активности может быть достигнуто, например, путем преодоления механизмов, которые опосредуют подавление иммунного ответа хозяина, или путем стимулирования механизмов, которые усиливают эндогенный иммунный ответ хозяина.

«Белок» относится к цепи, содержащей по меньшей мере два последовательно соединенных аминокислотных остатка, без максимального ограничения по длине цепи. Один или несколько аминокислотных остатков в белке могут предусматривать модификацию, такую как без ограничения гликозилирование, фосфорилирование или образование дисульфидной связи. Термин «белок» в настоящем документе применяют взаимозаменяемо с термином «полипептид».

«Субъект» включает любое животное, являющееся человеком, или не являющееся человеком. Термин «животное, не являющееся человеком», включает без ограничения позвоночных, таких как отличные от человека приматы, овца, собаки, кролики, грызуны,

такие как мыши, крысы и морские свинки, виды птиц, такие как куры, амфибии и рептилии. Согласно предпочтительным вариантам осуществления субъектом является млекопитающее, такое как отличный от человека примат, овца, собака, кошка, кролик, хорек или грызун. Согласно более предпочтительным вариантам осуществления любого аспекта раскрытого изобретения субъектом является человек. Термины «субъект» и «пациент» в настоящем документе применяют взаимозаменяемо.

«Терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная дозировка» лекарственного средства или терапевтического средства, такого как Fc-слитый белок по настоящему изобретению, представляет собой любое количество лекарственного средства, которое, при применении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством, способствует регрессии заболевания, о чем свидетельствует снижение тяжести симптомов заболевания, повышение частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания, или предупреждению ухудшения или утраты дееспособности вследствие поражения заболеванием. Терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства включает «профилактически эффективное количество» или «профилактически эффективную дозировку», которые представляют собой любое количество лекарственного средства, которое, при введении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством субъекту, подверженному риску развития заболевания или перенесения рецидива заболевания, обеспечивает ингибирование развития или рецидива заболевания. Способность терапевтического средства способствовать регрессии заболевания или ингибированию развития или рецидива заболевания можно оценивать с применением ряда способов, известных практикующему специалисту, например, у субъектов-людей в ходе клинических испытаний, в рамках систем с использованием модельных животных, с возможностью прогнозирования эффективности у людей, или с помощью анализа активности средства в *in vitro* анализах.

В качестве примера, «противораковое средство» способствует регрессии рака у субъекта. Согласно предпочтительным вариантам осуществления терапевтически эффективное количество лекарственного средства способствует регрессии злокачественной опухоли до момента устранения злокачественной опухоли. «Способствование регрессии злокачественной опухоли» означает, что введение эффективного количества лекарственного средства, отдельно или в комбинации с антинеопластическим средством, приводит к уменьшению темпа роста опухоли или размера, степени некроза опухоли, снижению тяжести по меньшей мере одного симптома заболевания, повышению частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания, предупреждению ухудшения или утраты дееспособности вследствие поражения заболеванием или другому облегчению

симптомов заболевания у пациента. Кроме того, термины «эффективный» и «эффективность» в отношении лечения включают как фармакологическую эффективность, так и физиологическую безопасность. Фармакологическая эффективность относится к способности лекарственного средства способствовать регрессии злокачественной опухоли у пациента. Физиологическая безопасность относится к уровню токсичности или других нежелательных физиологических эффектов на уровне клетки, органа и/или организма (нежелательные эффекты), обусловленных введением лекарственного средства.

В качестве примера лечения опухолей, терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства предпочтительно ингибирует клеточный рост или рост опухоли по меньшей мере на приблизительно 20%, более предпочтительно по меньшей мере на приблизительно 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на приблизительно 60% и еще более предпочтительно по меньшей мере на приблизительно 80% по сравнению с субъектами, не подлежащими лечению. Согласно наиболее предпочтительным вариантам осуществления терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства полностью ингибирует клеточный рост или рост опухоли, т. е. предпочтительно ингибирует клеточный рост или рост опухоли на 100%. Способность соединения ингибировать рост опухоли можно оценивать с использованием модельных систем на животных, таких как модели аденокарциномы толстой кишки CT26, аденокарциномы толстой кишки MC38 и фибросаркомы Sa1N у мышей, которые применяют для прогностической оценки эффективности в отношении опухолей у людей. В качестве альтернативы, такое свойство композиции можно оценивать путем изучения способности соединения ингибировать клеточный рост, и такое ингибирование можно измерять *in vitro* с помощью известных практикующему специалисту анализов. Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления настоящего изобретения регрессия опухоли может наблюдаться и продолжаться в течение периода, составляющего по меньшей мере приблизительно 20 дней, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 40 дней или еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 60 дней.

«Лечение» или «терапия» субъекта относится к любому типу воздействия или процесса, осуществляемых по отношению к субъекту, или введению ему активного средства, с целью реверсии, ослабления, облегчения, ингибирования, замедления или предупреждения появления, прогрессирования, развития, тяжести или повторного проявления симптома, осложнения, состояния или биохимических показателей, ассоциированных с заболеванием.

Антитела к CTLA-4 с повышенной ADCC являются более эффективными в качестве адъювантов

На сегодняшний день известно, что CTLA-4 выполняет его физиологическую функцию главным образом благодаря двум различным эффектам в отношении двух основных субпопуляций CD4⁺ Т-клеток: (1) отрицательное модулирование активности хелперных Т-клеток и (2) повышение иммуносупрессорной активности регуляторных Т-клеток (T_{reg}). Lenschow *et al.* (1996) *Ann. Rev. Immunol.* 14:233; Wing *et al.* (2008) *Science* 322:271; Peggs *et al.* (2009) *J. Exp. Med.* 206:1717. Известно, что T_{reg} конститутивно экспрессируют поверхностный CTLA-4 на высоких уровнях, и было высказано предположение, что эта молекула является неотъемлемой частью их регуляторной функции. Takahashi *et al.* (2000) *J. Exp. Med.* 192:303; Virebent *et al.* (2004) *Eur. J. Immunol.* 34:3485. Соответственно, популяция T_{reg} может быть наиболее восприимчивой к эффектам блокирования CTLA-4. В исследованиях с участием пациентов, принимающих ипилимумаб, также было показано, что у пациентов с ответом на терапию, в отличие от пациентов без ответа на терапию, наблюдали сниженную степень инфильтрации T_{reg} после лечения, причем истощение происходит посредством ADCC-механизма и опосредуется экспрессирующими FcγRIIIA неклассическими (CD14⁺CD16⁺⁺) моноцитами. Romano *et al.* (2014) *J. Immunotherapy of Cancer* 2(Suppl. 3):O14.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к улучшенным способам усиления иммунного ответа на вакцины путем введения антител к CTLA-4, таких как ипилимумаб, модифицированных для проявления повышенной ADCC. Такие антитела в свете представленных в настоящем документе результатов экспериментов характеризуются улучшенной активностью в качестве адъюванта вакцины.

Не ожидалось, что антитела к CTLA-4 с повышенной ADCC-активностью будут усиливать иммунный ответ на вакцину. В ранее проведенных экспериментах по эффектам таких антител в лечении рака было показано, по сути, что лечение с помощью антитела к CTLA4, с повышенной ADCC или без нее, фактически приводило к увеличению популяции регуляторных Т-клеток (T_{reg}) на периферии (т. е. вне микроокружения опухоли), что, как ожидается, будет приводить к ослаблению ответа на вакцину, а не его усилению. См. Selby *et al.* (2013) *Cancer Immunol. Res.* 1:32, реферат и фиг. 2А.

Применение таких антител к CTLA-4 с повышенной ADCC может обеспечить усиление эффективности вакцины при данной дозе вакцины, или может обеспечить достижение любого данного уровня эффективности с использованием более низких доз, и/или может обеспечить увеличение продолжительности иммунного ответа. Ожидается, что способы по настоящему изобретению, предусматривающие применение антител к

CTLA-4 с повышенной ADCC-активностью, будут обеспечивать усиление как В-клеточного, так и Т-клеточного иммунных ответов, и в отношении как собственных, так и чужеродных антигенов, и в отношении как доминантных, так и субдоминантных эпитопов. Таким образом, способы по настоящему изобретению могут обеспечить повышение эффективности профилактических вакцин у субъектов, ранее не подвергавшихся воздействию антигенов вакцины, а также могут обеспечить повышение эффективности терапевтических вакцин у субъектов, у которых имеющийся ранее (до вакцинации) иммунный ответ на антиген подвергся истощению.

Эксперименты с применением мышинной модели

Для тестирования эффектов повышенной ADCC-активности в отношении адъювантной активности антител к CTLA-4 применяли модель с использованием прайм-буст вакцины на основе OVA. Мышей обрабатывали антителом к CTLA-4 мыши 9D9 либо в виде IgG1, IgG2b или IgG1-D265A мыши (что обуславливает очень слабые Fc-ассоциированные эффекторные функции - Baudino *et al.* (2008) *J. Immunol.* 181:6664), либо в виде IgG2a мыши (который характеризуется повышенной ADCC). См. WO 2014/089113. Эксперименты также включали изотипический контроль mIgG2a, только OVA и необработанных мышей. IgG2a-антитела мыши характеризуются повышенной ADCC по сравнению с IgG1-антителом человека или мумабом.

Мышей подкожно (sc) иммунизировали пептидом OVA в день 0 и вводили пептид OVA sc в день 14. Антитела вводили в дозе 0,1 мг/доза внутривенно (ip) в дни -1, 1, 13 и 15, с 10 мышами на группу. К дню 21 у мышей брали крови для определения титров антител к OVA в сыворотке крови и крови, а также для анализов.

Селезенки у мышей, обработанных mIgG2a-mAb к CTLA-4 (которое характеризовалось повышенной ADCC) были, как правило, на ~20% тяжелее, чем в других группах, во всех из которых результаты были подобными. У этих же мышей наблюдали повышенные титры IgG к OVA в сыворотке крови к дню 21, а также повышенную OVA-специфическую продукцию IFN- γ в селезенке, измеряемую в ELISPOT.

В других экспериментах было продемонстрировано, что усиление истощения Foxp3⁺ T_{reg} (измеряемое в виде процентной доли от CD45⁺ клеток) в крови, селезенке или паховых лимфатических узлах мышей, обработанных IgG2a 9D9 с повышенной ADCC-активностью, в сравнении с другими изотипами отсутствовало.

Эти же антитела также тестировали в модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (EAE), индуцированного миелин-олигодендроцитарным гликопротеином (MOG). MOG₃₅₋₅₅/CFA вводили 63 самкам мышей C57BL/6

(5 мышей/группа + 3 необработанных мыши) sc в день 0. Коклюшный токсин вводили iv в дни 0 и 2. Антитела (9D9 IgG1-D265A, 9D9 IgG2a, изотипический контроль mIgG1 и неблокирующее mAb к mCTLA-4 5G6-mIgG2a) вводили в дни 0, 3 и 6, при этом дозу антитела в день 0 вводили между MOG и коклюшным токсином. Мышей умерщвляли в день 15. Оба mIgG2a-антитела обеспечивали значительное улучшение показателей заболевания EAE по сравнению с изотипическим контролем, при этом mIgG1-D265A обеспечивало более умеренное улучшение. Улучшенный показатель заболевания в этой модели коррелирует с усиленным иммунным ответом на MOG, и, таким образом, повышенной адъювантной активностью. Как и в вышеописанной модели с использованием OVA, mAb с повышенной ADCC (mIgG2a) не приводили к истощению Foxp3⁺ T_{reg} (измеряемому в виде процентной доли от CD45⁺ клеток) в селезенке или лимфатических узлах, а также в центральной нервной системе (ЦНС).

В моделях иммунного ответа, индуцированного как OVA-, так и MOG, mAb к CTLA-4 с повышенной ADCC-активностью (mIgG2a), как блокирующие антитела, так и неблокирующие антитела, вызывают более сильные иммунные ответы, но при этом не вызывают истощение T_{reg}.

Эксперименты на макаках-крабоедах

В дополнительных экспериментах, раскрытых в настоящем документе, изучали роль повышенной ADCC-активности в проявлении адъювантной активности антител к CTLA-4 у приматов (макаков-крабоедов) с применением антитела к CTLA-4 человека ипилимумаба (YERVOY®) и нефукозилированного ипилимумаба (ipi-NF), который характеризуется повышенной ADCC (фиг. 10).

Как раскрыто на различных фигурах и в примерах, и в соответствии с результатами у мышей, антитела к CTLA-4 с повышенной ADCC вызывали более сильные и более устойчивые иммунные ответы, чем другие эквивалентные антитела к CTLA-4 без повышенной ADCC, т. е. ипилимумаб-NF по сравнению с ипилимумабом. Такой усиленный иммунный ответ выражался в специфических в отношении антигенов вакцины ответах CD8⁺ Т-клеток (фигуры 1A-1C, 2A-2C и 3A-3C), индуцируемой антигенами вакцины продукции IFN-γ (фигуры 4A-4C, 5A-5C и 6A-6B) и Ad5-индуцируемой продукции IFN-γ (фигуры 9A-9C). Ипилимумаб-NF также обеспечивал повышение пролиферации CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, измеряемое по уровню экспрессии Ki-67 (фигуры 7A-7C и 8A-8C). Форма ипилимумаба с повышенной ADCC (ипилимумаб-NF) не вызывает истощение T_{reg} в крови обезьян, подлежащих исследованию (фиг. 11).

Улучшенные антитела к CTLA-4 с усиленными эффекторными функциями

Было показано, что различные модификации Fc-области антител усиливают эффекторную функцию. У мышей, повышенная способность к связыванию с активирующими Fc-гамма рецепторами и пониженная способность к связыванию с ингибирующим Fc-гамма рецептором следуют такой иерархии: mIgG2a >> mIgG2b >> mIgG1D265A. Такая иерархия соответствует соотношению активностей для связывания Fc-областей иммуноглобулина с активирующими Fc-рецепторами и ингибирующими Fc-рецепторами (известному как соотношение A/I), определенному Nimmerjahn & Ravetch (2005) *Science* 310:1510 и установленному для антител, опосредующих ADCC-функцию.

Согласно определенным аспектам улучшенное антитело к CTLA-4 по настоящему изобретению представляет собой IgG1-антитело человека. ADCC-активность в случае антител к CTLA-4 по настоящему изобретению может быть повышена, например, посредством введения одной или нескольких аминокислотных замен в Fc-область, изменения паттерна гликозилирования N-сцепленного гликана, или как одного, так и другого.

Мутации Fc, которые усиливают эффекторную функцию

Согласно некоторым вариантам осуществления ADCC-активность повышают путем модификации аминокислотной последовательности Fc-области, например, путем введения мутаций во встречающуюся в природе последовательность IgG1 человека для повышения ADCC. Что касается ADCC-активности, $\text{IgG1} \geq \text{IgG3} \gg \text{IgG4} \geq \text{IgG2}$ человека, так что в качестве исходной точки повышения ADCC может быть выбран константный домен IgG1, а не IgG2 или IgG4. Как определено в настоящем документе, немодифицированный IgG1 человека, как в случае ипилимумаба, не характеризуется повышенной ADCC. Fc-область можно модифицировать с целью повышения антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или повышения аффинности к Fc γ -рецептору (Fc γ R) путем модифицирования одной или нескольких аминокислот в следующих положениях: 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 313, 315, 320, 322, 324, 325, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 433, 434, 435, 436, 437, 438 или 439. См. WO 2012/142515; см. также WO 00/42072. Иллюстративные отдельные замены включают 236A, 239D, 239E, 268D, 267E, 268E, 268F, 324T, 332D и 332E. Иллюстративные кластеры вариантов включают 239D/332E, 236A/332E, 236A/239D/332E, 268F/324T, 267E/268F, 267E/324T и 267E/268F/324T. Например, было

показано, что IgG1Fc человека, предусматривающие вариант G236A, который необязательно можно комбинировать с I332E, обеспечивают примерно 15-кратное увеличение соотношения аффинности связывания FcγIIA/FcγIIB. Richards *et al.* (2008) *Mol. Cancer Therap.* 7:2517; Moore *et al.* (2010) *mAbs* 2:181. Другие модификации для усиления взаимодействий с FcγR и комплементом включают без ограничения замены 298A, 333A, 334A, 326A, 247I, 339D, 339Q, 280H, 290S, 298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 305I и 396L. Эти и другие модификации рассмотрены в Strohl (2009) *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691. В частности, как ADCC, так и CDC могут быть повышены путем изменений в положении E333 IgG1, например, E333A. Shields *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591. Применение мутаций P247I и A339D/Q для усиления эффекторной функции IgG1 раскрыто в WO 2006/020114 и D280H, K290S ± S298D/V раскрыты в WO 2004/074455. Было показано, что варианты K326A/W и E333A/S повышают эффекторную функцию IgG1 человека, а E333S повышает эффекторную функцию IgG2 человека. Idusogie *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166:2571. В других экспериментах было показано, что G236A/S239D/A330L/I332E обуславливает повышенную способность к связыванию FcRIIa и FcRIIIa. Smith *et al.* (2012) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 109:6181; Bournazos *et al.* (2014) *Cell* 158:1243.

Если не указано иное или не очевидно из контекста, нумерация аминокислотных остатков в Fc-области антитела приведена в соответствии с системой нумерации EU (EU-индекс, как в Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, MD; см. также фигуры 3c-3f в публикации заявки на патент США № 2008/0248028), за исключением случаев упоминания остатков в последовательности в перечне последовательностей, и в этом случае нумерация обязательно является последовательной. Например, в литературных источниках, в которых упоминаются эффекты аминокислотных замен в Fc-области, как правило, будет применяться нумерация EU, которая позволяет ссылаться на любой данный остаток в Fc-области антитела под тем же номером, независимо от длины варибельного домена, к которому он относится. В редких случаях может быть необходимо обратиться к документу, на который делается ссылка, для подтверждения точного остатка Fc, на который делается ссылка.

В частности, было проведено картирование центров связывания IgG1 человека для FcγR1, FcγR2, FcγR3 и FcRn и описаны варианты с улучшенными свойствами связывания. Shields *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604. Было показано, что мутации в положениях 256, 290, 298, 333, 334 и 339 обеспечивают улучшение способности к связыванию с FcγR3, включая комбинационные мутанты T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A и S298A/E333A/K334A (обладающие повышенной способностью к связыванию FcγR3 и

ADCC-активностью). Были идентифицированы другие варианты IgG1 со значительно повышенной способностью к связыванию с FcγRIIIa, включая варианты с мутациями S239D/I332E и S239D/I332E/A330L, для которых было показано наибольшее повышение аффинности к FcγRIIIa, снижение способности к связыванию FcγRIIb и сильная цитотоксическая активность у макаков-крабоедов. Lazar *et al.* (2006) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 103:4005; Awan *et al.* (2010) *Blood* 115:1204; Desjarlais & Lazar (2011) *Exp. Cell Res.* 317:1278. Введение тройных мутаций в антитела, такие как алемтузумаб (CD52-специфическое), трастузумаб (HER2/neu-специфическое), ритуксимаб (CD20-специфическое) и цетуксимаб (EGFR-специфическое) обуславливало значительно повышенную ADCC-активность *in vitro*, и для варианта S239D/I332E наблюдали повышенную способность к сокращению числа В-клеток у макаков. Lazar *et al.* (2006) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 103:4005. Кроме того, были идентифицированы мутанты IgG1, предусматривающие мутации L235V, F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L, которые характеризовались повышенной способностью к связыванию с FcγRIIIa и одновременно повышенной ADCC-активностью у трансгенных мышей, у которых экспрессируется FcγRIIIa человека, в моделях злокачественных новообразований из В-клеток и рака молочной железы. Stavenhagen *et al.* (2007) *Cancer Res.* 67:8882; патент США № 8652466; Nordstrom *et al.* (2011) *Breast Cancer Res.* 13:R123.

Различные изотипы IgG также характеризуются неодинаковой CDC-активностью (IgG3>IgG1>>IgG2≈IgG4). Dengl *et al.* (1988) *EMBO J.* 7:1989. Для применений, в которых требуется повышенная CDC, также можно вводить мутации, которые обеспечивают повышение способности к связыванию с C1q. Способность рекрутировать комплемент (CDC) может быть повышена за счет мутаций по K326 и/или E333 в IgG2, таких как K326W (которая обеспечивает снижение ADCC-активности) и E333S, для повышения способности к связыванию с C1q, первым компонентом каскада реакций системы комплемента. Idusogie *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166:2571. Введение S267E/H268F/S324T (по отдельности или в любой комбинации) в IgG1 человека обеспечивает повышение способности к связыванию C1q. Moore *et al.* (2010) *mAbs* 2:181. Fc-область антитела гибридного изотипа IgG1/IgG3 «113F» из Natsume *et al.* (2008) *Cancer Res.* 68:3863 (фиг. 1 в ней) также обеспечивает повышенную CDC. См. также Michaelsen *et al.* (2009) *Scand. J. Immunol.* 70:553 и Redpath *et al.* (1998) *Immunology* 93:595.

Дополнительные мутации, которые могут обеспечить повышение или снижение эффекторной функции, раскрыты в Dall'Acqua *et al.* (2006) *J. Immunol.* 177:1129. См. также Carter (2006) *Nat. Rev. Immunol.* 6:343; Presta (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:460.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотные замены в Fc-области для повышения ADCC могут быть выполнены в различных аллотипах IgG1, включая без ограничения аллотип IgG1fa ипилимумаба (остатки 119–448 SEQ ID NO: 11 и 119–447 SEQ ID NO: 12) и IgG1za (SEQ ID NO: 28 и 29).

Нефукозилированные антитела к CTLA-4 с повышенной ADCC

В экспериментах, в которых сравнивали нефукозилированные, или иным образом немодифицированные IgG1f-антитела, была показана повышенная способность к связыванию с активирующими Fcγ-рецепторами, как показано в таблице 2, что демонстрирует их пригодность для применения в получении улучшенных антител к CTLA-4 по настоящему изобретению. Аллотип IgG1f предусматривает мутации D357E и L359M по сравнению с аллотипом IgG1fa ипилимумаба (SEQ ID NO: 11 и 12). IgG1f предусматривает мутации K97R, D239E и L241M по сравнению с аллотипом IgG1za (SEQ ID NO: 28 и 29), которые являются эквивалентными мутациям K215R, D357E и L359M по сравнению с нумерацией последовательностей ипилимумаба SEQ ID NO: 11 и 12.

Таблица 2.

Связывание Fc-рецептора нефукозилированными Fc-областями IgG1f.

Значения K_D (нМ).

Fcγ-рецептор	IgG1f	IgG1f-NF
CD16-V158 (FcγRIIIa)	97	11
CD32-H131 (FcγRIIa)	530	560
CD32-R131 (FcγRIIa)	960	710
CD32B (FcγRIIb)	—	—
CD64 (FcγRIa)	0,2	0,1

Пониженная степень фукозилирования, отсутствие фукозилирования и гипофукозилирование

Взаимодействие антител с FcγR также может быть усилено путем модифицирования гликанового фрагмента, присоединенного к каждому Fc-фрагменту по остатку N297. В частности, отсутствие коровых остатков фукозы обуславливает резкое повышение ADCC за счет улучшенного связывания IgG с активирующим FcγRIIIA без изменения свойств связывания антигена или CDC. Natsume *et al.* (2009) *Drug Des. Devel. Ther.* 3:7. Имеются убедительные данные, что афукозилированные опухолеспецифические антитела

обеспечивают повышенную терапевтическую активность в мышинных моделях *in vivo*. Nimmerjahn & Ravetch (2005) *Science* 310:1510; Mossner *et al.* (2010) *Blood* 115:4393.

Модификацию гликозилирования антител можно осуществлять, например, путем обеспечения экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. Антитела с пониженной степенью фукозилирования, или без него, которые характеризуются повышенной ADCC, в особенности являются пригодными в способах по настоящему изобретению. Клетки с измененным механизмом гликозилирования были описаны в данной области, и их можно применять в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируются рекомбинантные антитела по настоящему раскрытию, с получением тем самым антитела с измененным паттерном гликозилирования. Например, у клеточных линий Ms704, Ms705 и Ms709 отсутствует ген фукозилтрансферазы, FUT8 (α -(1,6)-фукозилтрансфераза (см. публикацию заявки на патент США № 20040110704; Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87: 614), так что такие антитела, экспрессируемые в таких клеточных линиях, не содержат фукозы в их углеводных компонентах. В качестве другого примера, в EP 1176195 также описана клеточная линия с функционально нарушенным геном FUT8, а также клеточные линии, которые обладают незначительной активностью в отношении присоединения фукозы к N-ацетилглюкозамину, который связывается с Fc-областью антитела, или вовсе не обладают такой активностью, например, клеточная линия миеломы крысы YB2/0 (ATCC CRL 1662). В публикации согласно PCT WO 03/035835 описана вариантная клеточная линия CHO, Lec13, со сниженной способностью к присоединению фукозы к Asn(297)-связанным углеводам, что также приводит к гипогликозилированию антител, экспрессируемых в такой клетке-хозяине. См. также Shields *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733. Антитела с модифицированным профилем гликозилирования также могут быть получены в куриных яйцах, как описано в публикации согласно PCT № WO 2006/089231. В качестве альтернативы, антитела с модифицированным профилем гликозилирования могут быть получены в растительных клетках, таких как клетки *Lemna*. См., например, публикацию США № 2012/0276086. В публикации согласно PCT № WO 99/54342 описаны клеточные линии, сконструированные с возможностью экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, бета-(1,4)-N-ацетилглюкозаминтрансферазы III (GnTIII)), вследствие чего антитела, экспрессируемые в сконструированных клеточных линиях, характеризуются повышенным содержанием структур с дополнительным остатком GlcNAc в точке ветвления, что обуславливает повышенную ADCC-активность антител. См. также Umaña *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176. В качестве альтернативы, остатки фукозы антитела могут быть отщеплены с применением фермента фукозидазы. Например, фермент альфа-L-

фукозидаза удаляет фукозильные остатки из антител. Tarentino *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516. Антитела с пониженной степенью фукозилирования также могут быть получены в клетках, имеющих рекомбинантный ген, кодирующий фермент, который в качестве субстрата использует ГДФ-6-дезоксид-ликсо-4-гексулозу, такой как ГДФ-6-дезоксид-ликсо-4-гексулозоредуктаза (RMD), как описано в патенте США № 8642292. В качестве альтернативы, клетки можно выращивать в среде, содержащей аналоги фукозы, которые блокируют добавление остатков фукозы к N-сцепленному гликану или гликопротеину, такому как антитело, вырабатываемому выращиваемыми в среде клетками. Патент США № 8163551; WO 09/135181.

Поскольку нефукозилированные антитела характеризуются значительно повышенной ADCC по сравнению с фукозилированными антителами, препараты антител не обязательно должны быть полностью лишены фукозилированных тяжелых цепей, чтобы быть пригодными в способах по настоящему изобретению. Остаточные уровни фукозилированных тяжелых цепей не будут значимо влиять на ADCC-активность препарата в основном нефукозилированных тяжелых цепей. Антитела, полученные в традиционных клетках CHO, которые являются полностью компетентными в отношении добавления корового остатка фукозы к N-гликанам, могут, тем не менее, включать от нескольких процентов до 15% нефукозилированных антител. Нефукозилированные антитела могут характеризоваться в десять раз более высокой аффинностью к CD16, и 30-100-кратным повышением ADCC-активности, так что даже небольшое увеличение доли нефукозилированных антител может значительно повысить ADCC-активность препарата. Любой препарат, содержащий большее количество нефукозилированных антител, чем вырабатывалось бы в обычных клетках CHO в культуре, может характеризоваться некоторым уровнем повышенной ADCC. Такие препараты антител в настоящем документе называют препаратами с пониженной степенью фукозилирования. В зависимости от исходного уровня нефукозилированных антител, полученного в обычных клетках CHO, препараты с пониженной степенью фукозилирования могут содержать не более 50%, 30%, 20%, 10% и даже 5% нефукозилированных антител. Пониженная степень фукозилирования функционально определяется как препараты, характеризующиеся двукратным или более повышением ADCC по сравнению с антителами, полученными в обычных клетках CHO, и без указания какой-либо фиксированной процентной доли нефукозилированных молекул.

Согласно другим вариантам осуществления уровень нефукозилированных антител определяется структурно. В контексте настоящего документа препараты нефукозилированных или афукозилированных (термины применяют как синонимы) антител представляют собой препараты антител, содержащие более 95%

нефукозилированных тяжелых цепей антител, включая 100%. Препараты гипофукозилированных антител представляют собой препараты антител, содержащие 95% или менее тяжелых цепей, не содержащих фукозы, например, препараты антител, в которых 80-95% тяжелых цепей не содержат фукозы, как, например, 85-95% и 90-95%. Если не указано иное, «гипофукозилированный» относится к препаратам антител, в которых 80-95% тяжелых цепей не содержат фукозы, «нефукозилированный» относится к препаратам антител, в которых более 95% тяжелых цепей не содержат фукозы, и «гипофукозилированный или нефукозилированный» относится к препаратам антител, в которых 80% или более тяжелых цепей не содержат фукозы.

Согласно некоторым вариантам осуществления гипофукозилированные или нефукозилированные антитела получают в клетках, у которых отсутствует фермент, необходимый для фукозилирования, такой как FUT8 (например, патент США № 7214775), или в клетках, в которых экзогенный фермент частично истощает пул веществ-предшественников для фукозилирования (например, патент США № 8642292), или в клетках, культивируемых в присутствии низкомолекулярного ингибитора фермента, вовлеченного в процесс фукозилирования (например, WO 09/135181).

Уровень фукозилирования в препарате антител можно определять с помощью любого известного в данной области способа, включая без ограничения гель-электрофорез, жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию. Если не указано иное, для целей настоящего изобретения уровень фукозилирования в препарате антител определяют с помощью хроматографии с гидрофильным взаимодействием (или жидкостной хроматографии с гидрофильным взаимодействием, HILIC), в основном, как описано в примере 3. Для определения уровня фукозилирования в препарате антител образцы подвергают денатурации путем обработки PNGазой F для отщепления N-сцепленных гликанов, которые затем анализируют на предмет содержания фукозы. LC/MS цепей полноразмерного антитела является альтернативным способом определения уровня фукозилирования в препарате антител, однако масс-спектропия по своей природе является менее количественной.

Нефукозилированный ипилимумаб характеризуется повышенной ADCC

Было показано, что нефукозилированная форма ипилимумаба является более эффективной в отношении стимуляции опосредованного клетками NK92 лизиса активированных T_{reg} от донора-человека, обеспечивая при этом снижение EC₅₀ с 1,5 мкг/мл до 6,5 нг/мл. См. фиг. 10.

Дополнительные потенциальные модификации Fc

Fc-области можно подвергать мутации с целью повышения аффинности IgG к неонатальному Fc-рецептору, FcRn, который обуславливает увеличение времени полужизни антител *in vivo* и обеспечивает в результате повышение противоопухолевой активности. Например, введение мутаций M428L/N434S в Fc-области бевацизумаба (VEGF-специфического) и цетуксимаба (EGFR-специфического) обеспечивает увеличение времени полужизни антител у обезьян и улучшенные противоопухолевые ответы у мышей. Zalevsky *et al.* (2010) *Nat. Biotechnol.* 28:157.

Антитела к CTLA-4

Согласно определенным вариантам осуществления исходное антитело к CTLA-4 для модификации с целью повышения ADCC представляет собой ипилимумаб или тремелидумаб, или антитела, имеющие с ними общие последовательности вариабельных доменов. Моноклональные антитела, которые распознают и связываются с внеклеточным доменом CTLA-4, описаны в патенте США № 5977318. Моноклональные антитела человека по настоящему раскрытию можно получать с применением различных способов, например, с применением трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих части иммунной системы человека, вместо системы мыши, или с применением *in vitro* методик дисплея, таких как фаговый или дрожжевой дисплей. См., например, Bradbury *et al.* (2011) *Nat. Biotechnol.* 29(3):245. Трансгенные и трансхромосомные мыши включают мышей, называемых в настоящем документе HUMAB MOUSE® (Lonberg *et al.* (1994) *Nature* 368:856) и KM MOUSE® (WO 02/43478) соответственно. Получение иллюстративных антител человека к CTLA-4 человека по настоящему раскрытию подробно описано в патентах США №№ 6984720 и 7605238. IgG1-антитело человека к CTLA-4, идентифицированное в этих патентах как 10D1, также известно как ипилимумаб (ранее также известное как MDX-010 и BMS-734016), которое продается как YERVOY®. Другие иллюстративные антитела человека к CTLA-4 по настоящему раскрытию описаны в патентах США №№ 6682736 и 7109003, включая тремелидумаб (ранее тицилимумаб; CP-675206), IgG2-антитело человека к CTLA-4 человека.

Ипилимумаб, моноклональное антитело человека к CTLA-4 человека, было одобрено для лечения неоперабельной или метастатической меланомы и для адъювантной терапии меланомы III стадии, и оно находится на стадии клинических испытаний при других формах рака, часто в сочетании с другими средствами. Hoos *et al.* (2010) *Semin. Oncol.* 37:533; Hodi *et al.* (2010) *N. Engl. J. Med.* 363:711; Pardoll (2012) *Nat. Immunol.* 13(12):

1129. Ипилимумаб относится к изотипу IgG1 человека, который лучше всего связывается с большинством типов Fc-рецепторов человека (Bruhns *et al.* (2009) *Blood* 113: 3716).

В отличие от него, тремелидумаб относится к изотипу IgG2, который не связывается эффективно с Fc-рецепторами, за исключением варианта FcγRIIa H131. Bruhns *et al.* (2009) *Blood* 113:3716. Тремелидумаб относится к изотипу IgG2 и, таким образом, характеризуется более низкой ADCC, чем ипилимумаб, который относится к IgG1. Ожидается, что преобразование тремелидумаба в IgG1 путем замещения константного домена тяжелой цепи для создания «трем-IgG1» обеспечит повышение ADCC до уровня, аналогичного такому в случае ипилимумаба. Согласно некоторым вариантам осуществления способы по настоящему изобретению предусматривают применение вариантов тремелидумаба или трем-IgG1, обладающих ADCC, превышающей таковую ипилимумаба в качестве адъювантов вакцины.

Дополнительные антитела к CTLA-4

Дополнительные изобретения, связанные с антителом к CTLA-4, раскрыты в нижеследующих принадлежащих одному и тому же правообладателю публикациях заявок на патенты, раскрытия которых включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. WO 1993/000431; WO 97/020574; WO 00/032231; WO 2001/014424; WO 2003/086459; WO 2005/003298; WO 2006/121168; WO 2007/056540; WO 2007/067959; WO 2008/109075; WO 2009/148915; WO 2010/014784; WO 2011/011027; WO 2010/042433; WO 2011/146382; WO 2012/027536; WO 2013/138702; WO 2009/089260; WO 2013/142796; и WO 2013/169971. Варианты таких антител, обладающих повышенной ADCC (т. е. ADCC, превышающей ADCC ипилимумаба), могут найти применение в способах по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не должны толковаться как ограничивающие. Содержания всех фигур и всех ссылок, патентов и опубликованных патентных заявок, цитируемых в настоящей заявке, явным образом включены в настоящий документ посредством ссылки.

Пример 1

Эксперименты с адъювантом вакцины, связывающим CTLA-4, на макаках-крабоедах

Эксперименты осуществляли на *Mafa-A1*063+* мавританских макаках-крабоедах (*Macaca fascicularis*; MCM) для отслеживания эффектов вариантов антител к CTLA-4, отличающихся ADCC-активностью, в отношении иммуномодуляции индуцируемых

вакциной антигенспецифических Т-клеточных ответов с течением времени. Изучали три разных моноклональных антитела к CTLA-4: ипилимумаб (ipi), нефукозилированный ипилимумаб (ipi-NF) и ипилимумаб с мутацией N297A (ipi-N297A), которая полностью блокирует N-сцепленное гликозилирование. Нефукозилированный ипилимумаб характеризуется повышенной ADCC, тогда как ипилимумаб с N297A характеризуется сниженной/устраненной ADCC по сравнению с ипилимумабом.

Иммуногены вирусной вакцины конструировали путем введения генов белков Gag и Nef вируса иммунодефицита обезьян (SIV) в векторы на основе аденовируса серотипа 5 (Ad5). Последовательность гена Nef была модифицирована с удалением второго и третьего аминокислотных остатков (Gly–Gly) для удаления сайта миристоилирования. Вирусы Gag-Ad5 и Nef-Ad5 вводили внутримышечно (3×10^9 вирусных частиц/MCM) в противопоставленные задние конечности во избежание иммунодоминирования. 3×10^9 вирусных частиц/MCM соответствуют субоптимальной дозировке, которая была выбрана для максимального увеличения вероятности наблюдения повышенной адъювантной активности. Затем животных незамедлительно обрабатывали (внутривенно) i) солевым раствором, ii) ipi (1 мг/кг или 10 мг/кг), iii) ipi-NF (1 мг/кг и 10 мг/кг) или iv) ipi-N297A (10 мг/кг). Забор образцов крови проводили в дни 4, 8, 15, 22, 36 и 43. Эксперименты повторяли еще два раза, с тем исключением, что в дальнейших экспериментах на группу было 6 животных, а не 4, и дозу 1 мг/кг не применяли. Дальнейшие эксперименты включали образец крови, взятый в день 3, и день 36 вместо дня 35. Кроме того, в первом эксперименте, но не во втором и третьем, применяли аллотипический вариант ипилимумаба для антитела ipi-NF, предусматривающий изменения D357E и L359M по сравнению с тяжелой цепью ипилимумаба (SEQ ID NO: 11).

FACS цельной крови для выявления антигенспецифических Т-клеток

Т-клеточные ответы, специфические в отношении нескольких SIV-специфических эпитопов (Nef RM9, Nef LT9, Gag GW9) Ad5-вакцины, определяли с применением тетрамеров нагруженных пептидами молекул МНС класса I в дни 8 (только день 8 в случае повтора А), 15, 22, 36 и 43 с применением анализа с использованием сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) для цельной крови. Nef RM9 = RPKVPLRTM = SEQ ID NO: 25; Nef LT9 = LNMADKKET = SEQ ID NO: 26; Gag GW9 = GPRKPIKCW = SEQ ID NO: 27. Тетрамеры нагруженных пептидами (RM9/GW9/LT9) молекул МНС I применяли для выявления антигенспецифических Т-клеток с помощью FACS цельной крови. Результаты представлены на фигурах 1А-1С, 2А-2С и 3А-3С, на которых приведены результаты для эпитопов SIV Nef RM9, Gag GW9 и Nef LT9 соответственно. В каждом

повторе, и для каждого эпитопа, ірі-NF при 10 мг/кг обуславливает наибольшие процентные доли антигенспецифических CD8⁺ Т-клеток. Количество CD8⁺ Т-клеток, специфических в отношении Nef LT9, достигает максимума и начинает спадать быстрее, чем в случае клеток, специфических в отношении эпитопов Nef RM9 и Gag GW9, количество которых достигает максимума примерно к дням 22-36.

ELISPOT-анализ для выявления индуцируемой антигенами продукции IFN-γ в PBMC

Анализы иммуноферментных пятен (ELISPOT) осуществляли с использованием выделенных на градиенте Ficoll мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), выделенных из образцов крови, взятых в день 22 и день 43, для определения уровня IFN-γ, экспрессируемого в ответ на стимуляцию антигеном. PBMC стимулировали в течение 18 часов 10 мкМ пептидов SIV в качестве эпитопов для достижения минимального оптимального эффекта. Определяли число клеток, образующих пятна IFNγ (SPC), и вычитали фоновое значение.

Результаты представлены на фигурах 4А-4С, 5А-5С и 6А-6В, на которых приведены результаты по стимуляции эпитопами SIV Nef RM9, Gag GW9 и Nef LT9 соответственно. В ELISPOT-анализах было подтверждено, что обработка 10 мг/кг ірі-NF вызывала наиболее высокую продукцию IFN-γ во всех повторах и для всех эпитопов SIV.

Пролиферация общей популяции Т-клеток

Количество CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток также измеряли в проточной цитометрии по экспрессии Ki-67 с целью измерения клеточной пролиферации. Результаты представлены на фигурах 7А-7С и 8А-8С. Обработка 10 мг/кг ірі-NF обеспечивала усиление пролиферации во всех повторах.

ELISPOT-анализ для выявления Ad5-индуцируемой продукции IFN-γ в PBMC

ELISPOT-анализы, аналогичные таковым, описанным выше, применяли для измерения Ad5-индуцируемой продукции IFN-γ. Термоинактивированные вирионы Ad5 (5×10^8 вирусных частиц) инкубировали в течение 18 часов с взятыми в день 22 PBMC или взятыми в день 43 PBMC. Определяли число клеток, образующих пятна IFNγ (SPC), и вычитали фоновое значение. Результаты представлены на фигурах 9А-9С. Подобно результатам, полученным с использованием антигенов SIV, показанным на фигурах 4А-4С, 5А-5С и 6А-6В, обработка 10 мг/кг NF-антител к CTLA-4 систематически вызывала наиболее высокую продукцию IFN-γ как в дни 22, так и в дни 43, во всех повторах.

В этой модели с использованием вакцины для макака-крабоеда во всех анализах NF-антитело к CTLA-4 усиливало иммунный ответ на три отдельных антигена SIV и на антигены Ad5 в целом. Нефукозилированное антитело систематически обуславливало выработку иммунных ответов, которые были более интенсивными и более устойчивыми, чем таковые в случае ипилимумаба.

Истощение T_{reg}

Частоту встречаемости циркулирующих в крови T_{reg} у макаков-крабоедов определяли с помощью FACS-анализа цельной крови. Образцы от животных из повтора В подвергали сортировке с целью определения частоты встречаемости T_{reg} с течением времени в зависимости от того, какие антитела вводили. Результаты представлены на фиг. 11. mAb к CTLA-4 с повышенной ADCC, ипилимумаб-NF, не характеризуется повышенным истощением T_{reg} по сравнению с ипилимумабом и, фактически, значимо не отличается от контрольной среды-носителя.

Пример 2

Антитело к CTLA-4 с повышенной ADCC оценивали по содействию NK-опосредованному лизису клеток с применением первичных клеток человека

Нефукозилированный ипилимумаб тестировали в отношении его способности к содействию опосредованному NK-клетками лизису T_{reg} от донора-человека следующим образом. Вкратце, T_{reg} для применения в качестве целевых клеток выделяли с помощью отрицательного отбора с применением магнитных гранул и активировали в течение 72 часов. NK-клетки для применения в качестве эффекторов от донора-человека выделяли с помощью отрицательного отбора с применением магнитных гранул и активировали IL-2 в течение 24 часов. Меченные кальцеином активированные T_{reg} (Donor Leukopak AC8196) покрывали различными концентрациями ипилимумаба, ипилимумаб-NF или контрольного IgG1 на 30 минут, а затем инкубировали с эффекторными NK-клетками при соотношении 10: 1 в течение 2 часов. Высвобождение кальцеина измеряли путем считывания интенсивности флуоресценции среды с применением планшет-ридера Envision (Perkin Elmer), и рассчитывали процентную долю антителозависимого лизиса клеток исходя из средней интенсивности флуоресценции (MFI) с использованием следующей формулы: [(экспериментально определенное значение MFI – среднее фоновое значение)/(среднее максимальное значение – среднее фоновое значение)] $\times$ 100. Результаты представлены на фиг. 10. Нефукозилированный ипилимумаб индуцировал лизис активированных T_{reg} при EC_{50} (0,0065 мкг/мл), значимо более низкой, чем в случае ипилимумаба (1,5 мкг/мл).

Пример 3

*Анализ для определения процентной доли нефукозилированных
тяжелых цепей в образце антител к CTLA-4*

Препараты нефукозилированного mAb к CTLA-4 анализировали для определения процентной доли нефукозилированных тяжелых цепей, в основном следующим образом.

Сперва антитела подвергали денатурации с применением мочевины, а затем восстанавливали с применением DTT (дитиотреитол). Затем образцы расщепляли в течение ночи при 37°C с помощью PNGазы F для удаления N-сцепленных гликанов. Высвобожденные гликаны собирали, фильтровали, сушили и подвергали дериватизации с использованием 2-аминобензойной кислоты (2-AA) или 2-аминобензамида (2-AB). Полученные в результате меченные гликаны затем разделяли на колонке для HPLC, и элюированные фракции подвергали количественному определению по уровню флуоресценции и сушили. Затем фракции обрабатывали экзогликозидазами, такими как α -(1-2,3,4,6)-фукозидаза (BKF), в результате чего высвобождались коровые α (1,6)-связанные остатки фукозы. Необработанные образцы и BKF-обработанные образцы затем анализировали с помощью жидкостной хроматографии. Гликаны, содержащие α (1,6)-связанные остатки фукозы, характеризуются измененным профилем элюции после обработки BKF, тогда как нефукозилированные гликаны остаются неизменными. Состав олигосахаридов также подтверждали с помощью масс-спектрометрии. См., например, Zhu *et al.* (2014) MAbs 6:1474.

Процент нефукозилированных тяжелых цепей рассчитывают путем умножения на сто молярного соотношения (гликанов без остатка фукозы, α 1,6-связанного с первым остатком GlcNac N-сцепленного гликана по N297 (нумерация EU) тяжелой цепи антитела) и (общего числа всех гликанов в этом местоположении (гликаны без остатка фукозы и гликаны с α 1,6-связанным остатком фукозы)).

Таблица 3.

Краткое изложение перечня последовательностей.

SEQ ID NO.	Описание
1	CTLA-4 человека (NP_005205.2)
2	CD28 человека (NP_006130.1)
3	CDRH1 ипилимумаба
4	CDRH2 ипилимумаба
5	CDRH3 ипилимумаба
6	CDRL1 ипилимумаба
7	CDRL2 ипилимумаба
8	CDRL3 ипилимумаба
9	Вариабельный домен тяжелой цепи ипилимумаба
10	Вариабельный домен легкой цепи ипилимумаба
11	Тяжелая цепь ипилимумаба
12	Тяжелая цепь ипилимумаба без С-концевого К
13	Легкая цепь ипилимумаба
14	CDRH1 тремелиумаба
15	CDRH2 тремелиумаба
16	CDRH3 тремелиумаба
17	CDRL1 тремелиумаба
18	CDRL2 тремелиумаба
19	CDRL3 тремелиумаба
20	Вариабельный домен тяжелой цепи тремелиумаба
21	Вариабельный домен легкой цепи тремелиумаба
22	Тяжелая цепь тремелиумаба
23	Тяжелая цепь тремелиумаба без С-концевого К
24	Легкая цепь тремелиумаба
25	Nef RM9 = RPKVPLRTM
26	Nef LT9 = LNMADKKET
27	Gag GW9 = GPRKPIKCW
28	Константный домен IgG1za
29	Константный домен IgG1za без С-концевого К

Что касается последовательностей антитела, в перечне последовательностей представлены последовательности зрелых вариабельных областей и тяжелых и легких цепей, т. е. последовательности не включают сигнальные пептиды.

Эквиваленты:

Специалистам в данной области будет понятно, или они смогут установить, с применением не более чем стандартных экспериментов, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе. Подразумевается, что такие эквиваленты охвачены объемом следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ усиления иммунного ответа на вакцину у субъекта-человека, которого лечат с помощью вакцины, предусматривающий введение субъекту антитела к CTLA-4 человека, обладающего ADCC-активностью, по меньшей мере в два раза превышающей таковую ипилимумаба.

2. Антитело по п. 1, где антитело содержит:

- a. CDRH1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 3;
- b. CDRH2, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 4;
- c. CDRH3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 5;
- d. CDRL1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 6;
- e. CDRL2, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 7; и
- f. CDRL3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 8.

3. Антитело по п. 2, где антитело содержит:

- a. переменный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 9; и
- b. переменный домен легкой цепи, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 10.

4. Антитело по п. 3, где антитело содержит:

- a. тяжелую цепь, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 12; и
- b. легкую цепь, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 13.

5. Антитело по п. 4, где антитело содержит:

- a. тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 11; и
- b. легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 13.

6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором антитело к CTLA-4 человека, обладающее ADCC-активностью, по меньшей мере в два раза превышающей таковую ипилимумаба, характеризуется EC50 для лизиса клеток, которая по меньшей мере в два раза ниже, чем EC50 для лизиса клеток в случае ипилимумаба, в анализе опосредованного клетками NK92 лизиса, подробно описанном в примере 2.

7. Способ по п. 6, в котором антитело к CTLA-4 человека, обладающее ADCC-активностью, по меньшей мере в два раза превышающей таковую ипилимумаба, характеризуется EC50 для лизиса клеток, которая по меньшей мере в десять раз ниже, чем EC50 для лизиса клеток в случае ипилимумаба, в анализе опосредованного клетками NK92 лизиса, подробно описанном в примере 2.

8. Антитело по п. 1, где антитело содержит:

- a. CDRH1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 14;
- b. CDRH2, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 15;
- c. CDRH3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 16;
- d. CDRL1, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 17;
- e. CDRL2, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 18; и
- f. CDRL3, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 19.

9. Антитело по п. 8, где антитело содержит:

- a. вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 20; и
- b. вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 21.

10. Антитело по п. 9, где антитело содержит:

- a. тяжелую цепь, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 23; и
- b. легкую цепь, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 24.

11. Антитело по п. 9, где антитело содержит:

- a. тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 22; и
- b. легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 24.

12. Способ по любому из пп. 8-11, в котором антитело к CTLA-4 человека, обладающее ADCC-активностью, по меньшей мере в два раза превышающей таковую ипилимумаба, характеризуется EC50 для лизиса клеток, которая по меньшей мере в два раза ниже, чем EC50 для лизиса клеток в случае ипилимумаба, в анализе опосредованного клетками NK92 лизиса, подробно описанном в примере 2.

13. Способ по п. 12, в котором антитело к CTLA-4 человека, обладающее ADCC-активностью, по меньшей мере в два раза превышающей таковую ипилимумаба, характеризуется EC50 для лизиса клеток, которая по меньшей мере в десять раз ниже, чем EC50 для лизиса клеток в случае ипилимумаба, в анализе опосредованного клетками NK92 лизиса, подробно описанном в примере 2.

14. Способ по любому из пп. 1-13, в котором антитело к CTLA-4 человека, обладающее ADCC-активностью, по меньшей мере в два раза превышающей таковую ипилимумаба, характеризуется пониженной степенью фукозилирования.

15. Способ по п. 14, в котором антитело к CTLA-4 человека, обладающее ADCC-активностью, по меньшей мере в два раза превышающей таковую ипилимумаба, является гипофукозилированным или нефукозилированным.

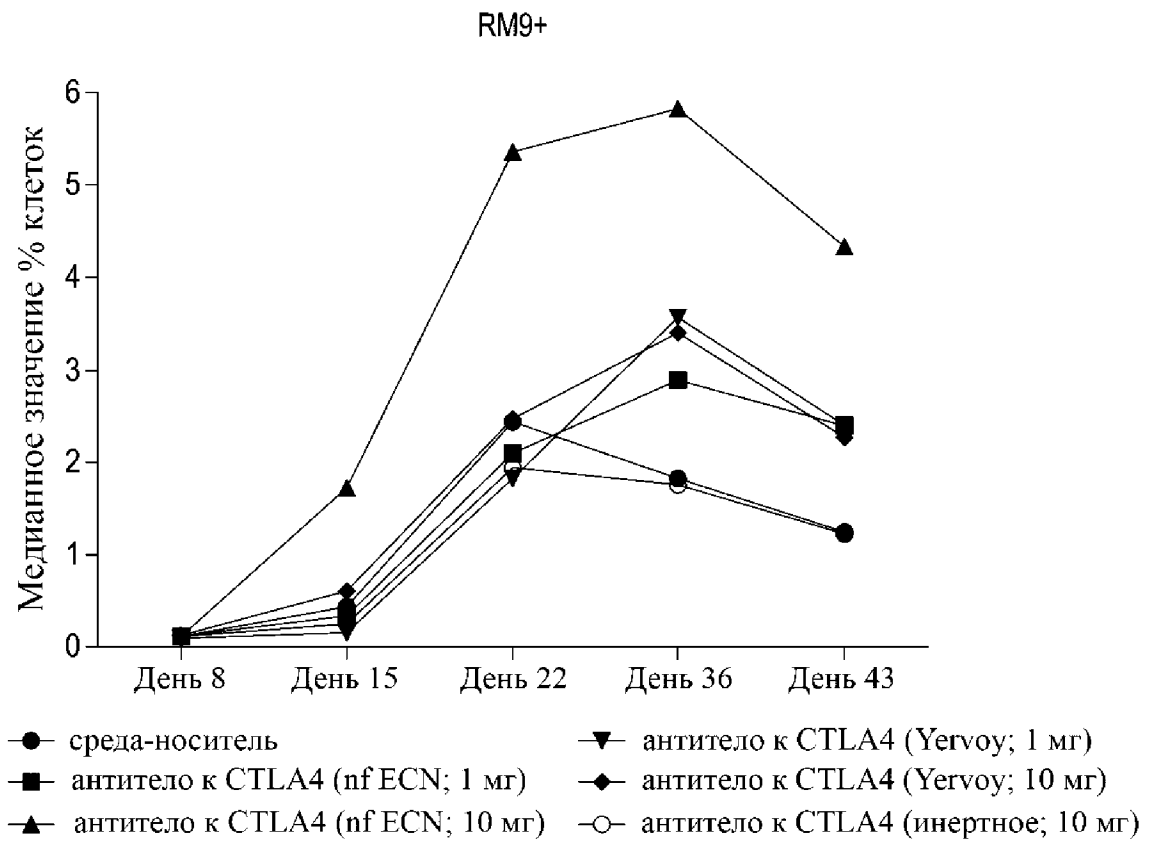
16. Способ по п. 15, в котором антитело к CTLA-4 человека, обладающее ADCC-активностью, по меньшей мере в два раза превышающей таковую ипилимумаба, является нефукозилированным.

17. Способ по любому из пп. 1-13, в котором антитело к CTLA-4 человека, обладающее ADCC-активностью, по меньшей мере в два раза превышающей таковую ипилимумаба, содержит константную область тяжелой цепи IgG1, предусматривающую мутацию или кластер мутаций, выбранные из группы, состоящей из: i) G236A; ii) S239D; iii) F243L; iv) E333A; v) G236A/I332E; vi) S239D/I332E; vii) S267E/H268F; viii) S267E/S324T; ix) H268F/S324T; x) G236A/S239D/I332E; xi) S239D/A330L/I332E; xii) S267E/H268F/S324T и xiii) G236A/S239D/A330L/I332E.

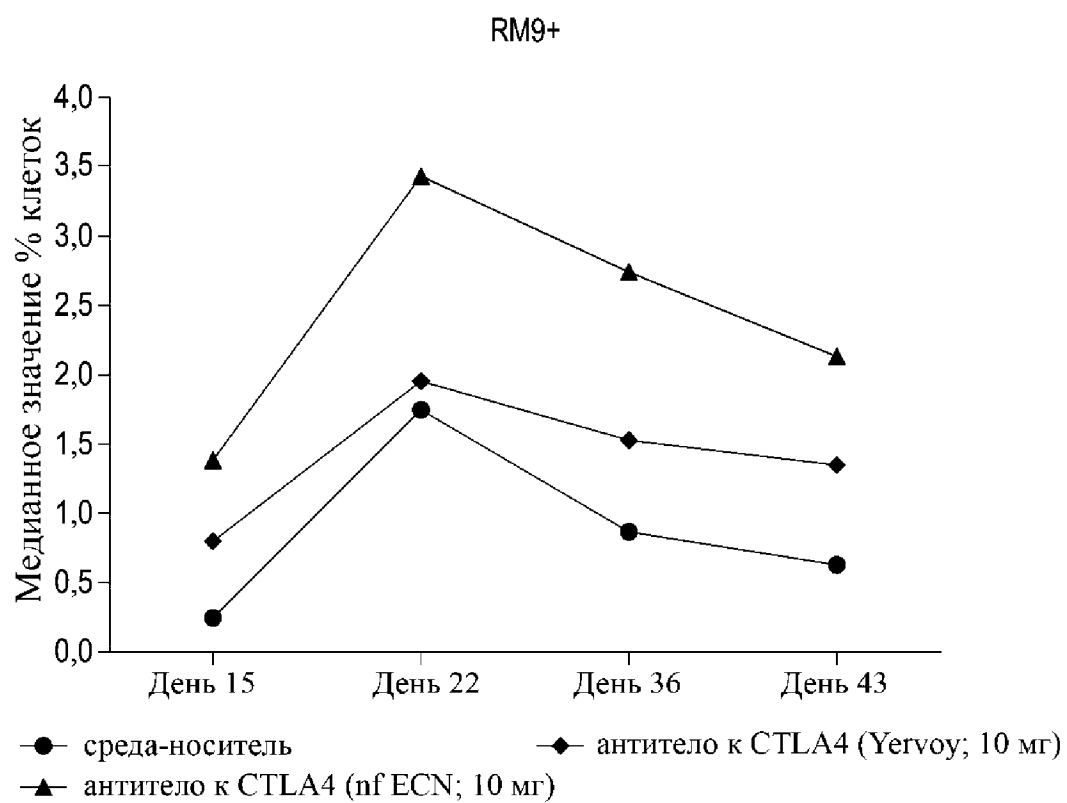
18. Способ по п. 17, в котором антитело к CTLA-4 человека, обладающее ADCC-активностью, по меньшей мере в два раза превышающей таковую ипилимумаба, характеризуется пониженной степенью фукозилирования.

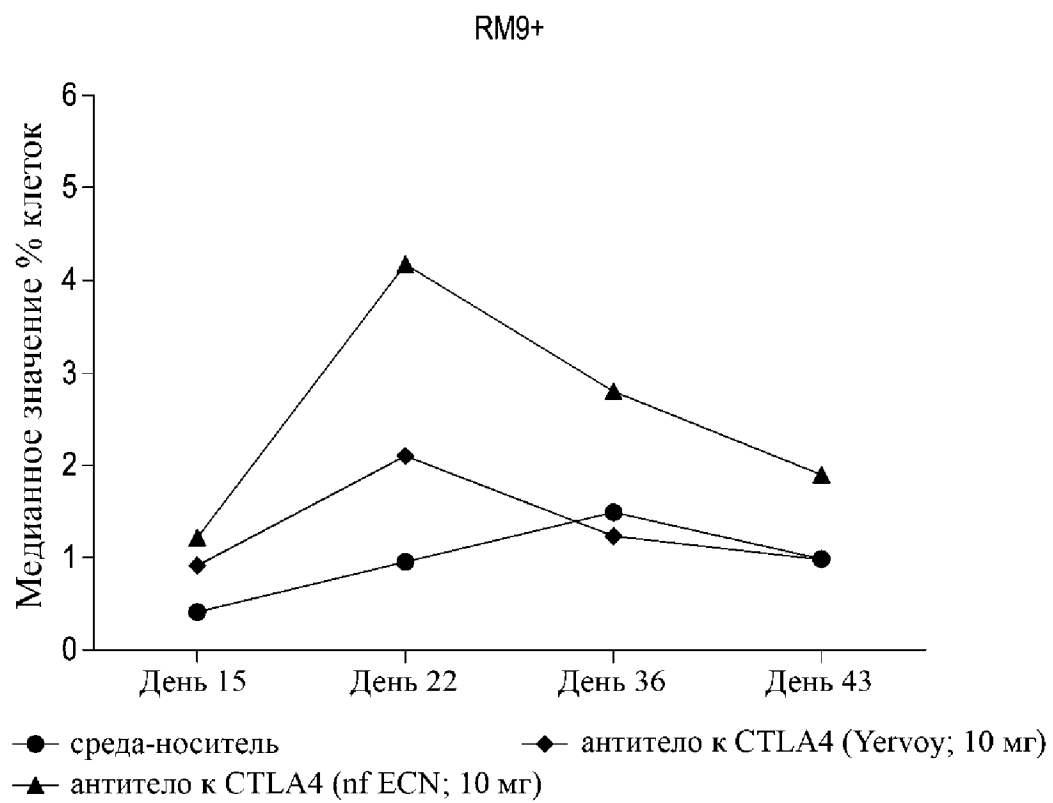
19. Способ по п. 18, в котором антитело к CTLA-4 человека, обладающее ADCC-активностью, по меньшей мере в два раза превышающей таковую ипилимумаба, является гипофукозилированным или нефукозилированным.

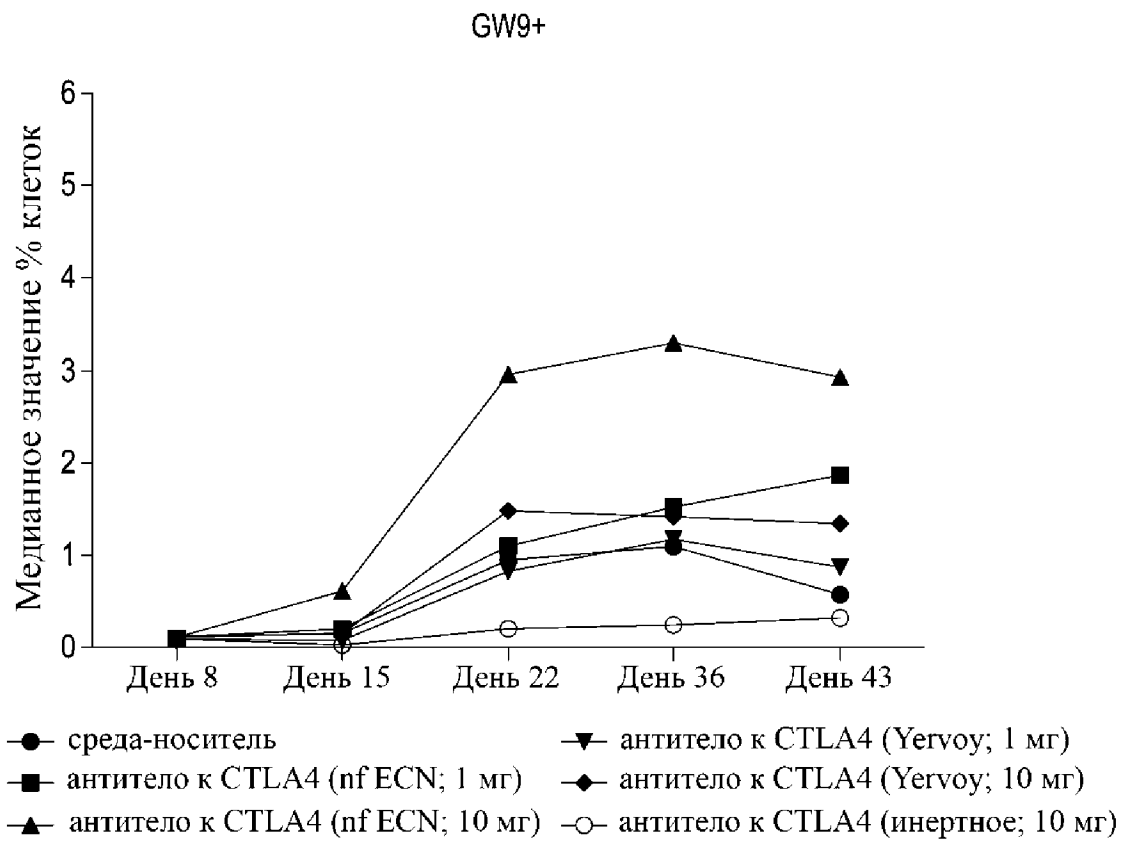
20. Способ по п. 19, в котором антитело к CTLA-4 человека, обладающее ADCC-активностью, по меньшей мере в два раза превышающей таковую ипилимумаба, является нефукозилированным.



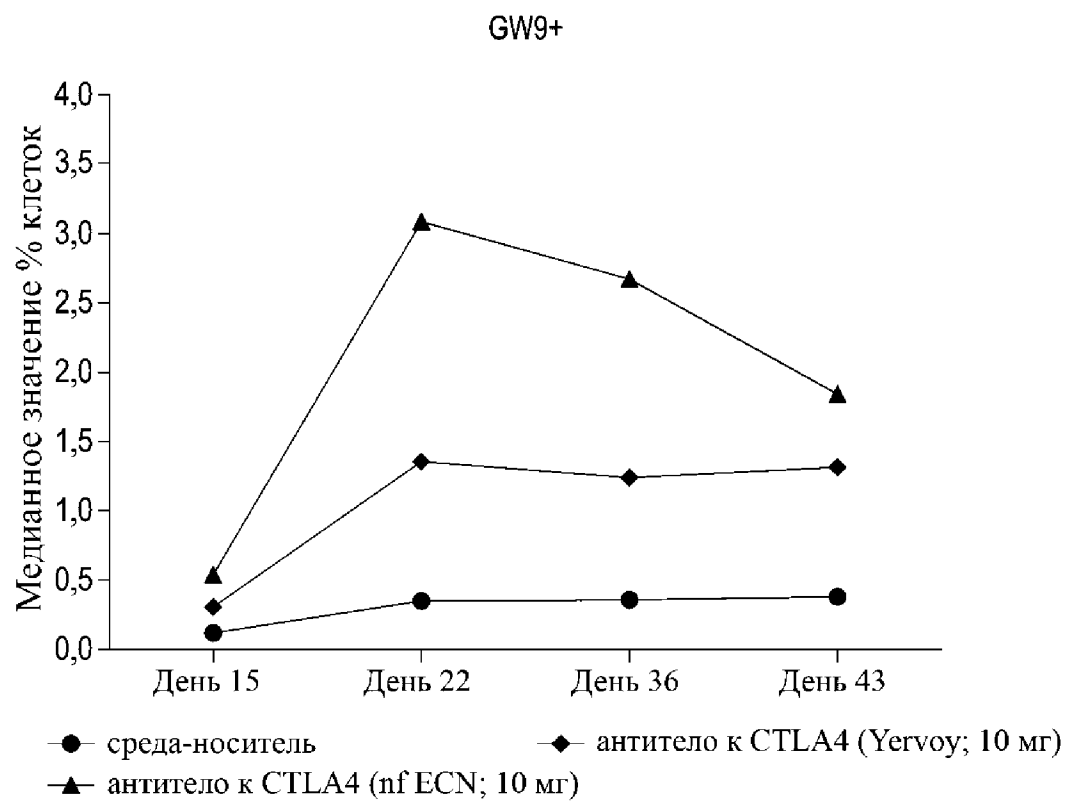
Фиг. 1А

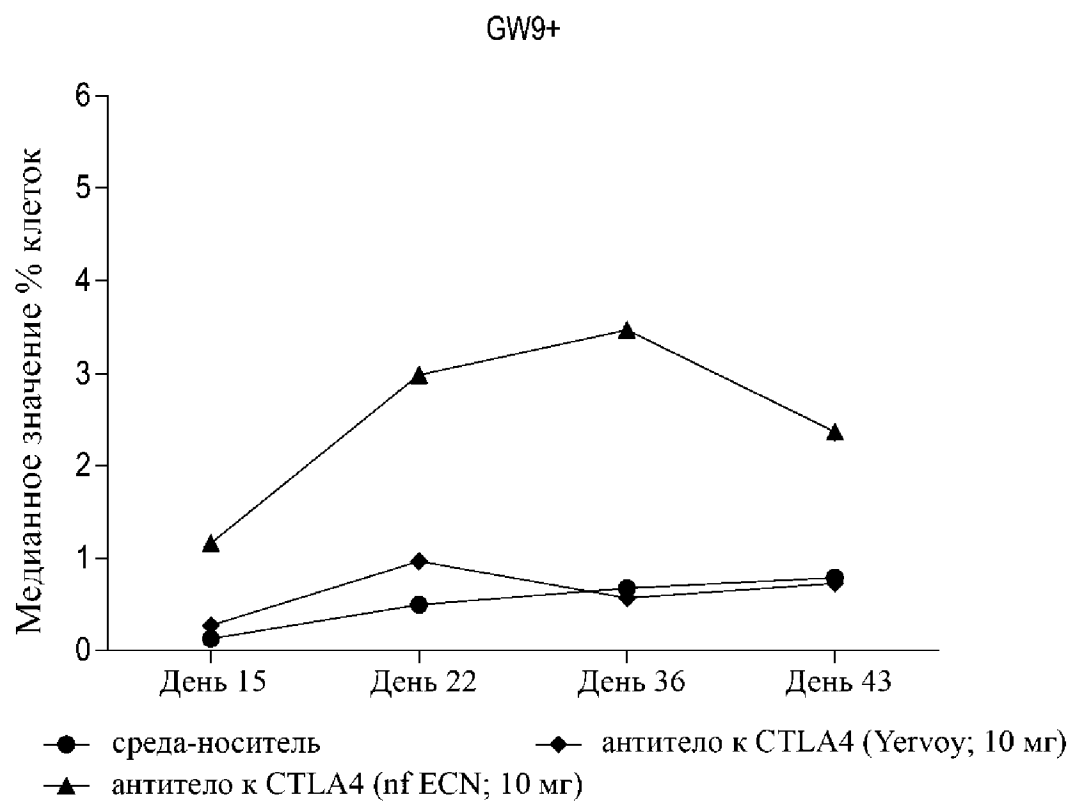
**Фиг. 1В**

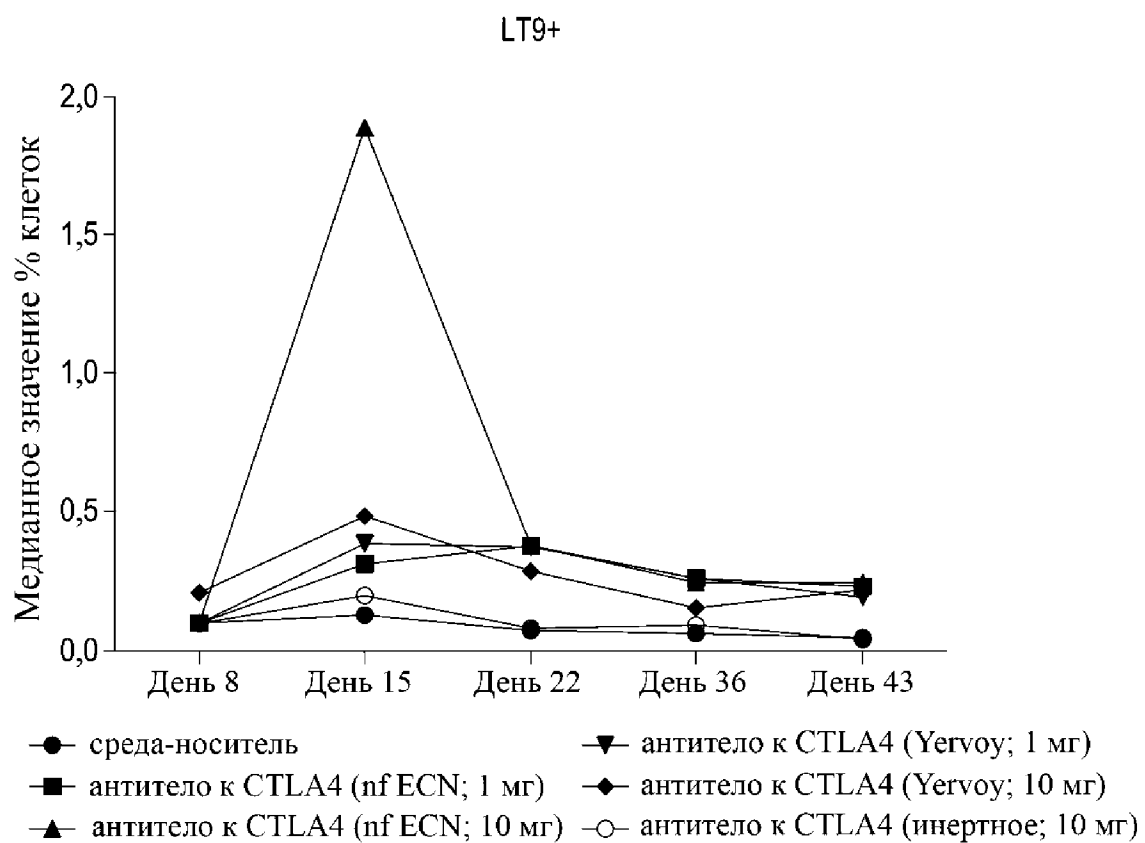
**Фиг. 1С**



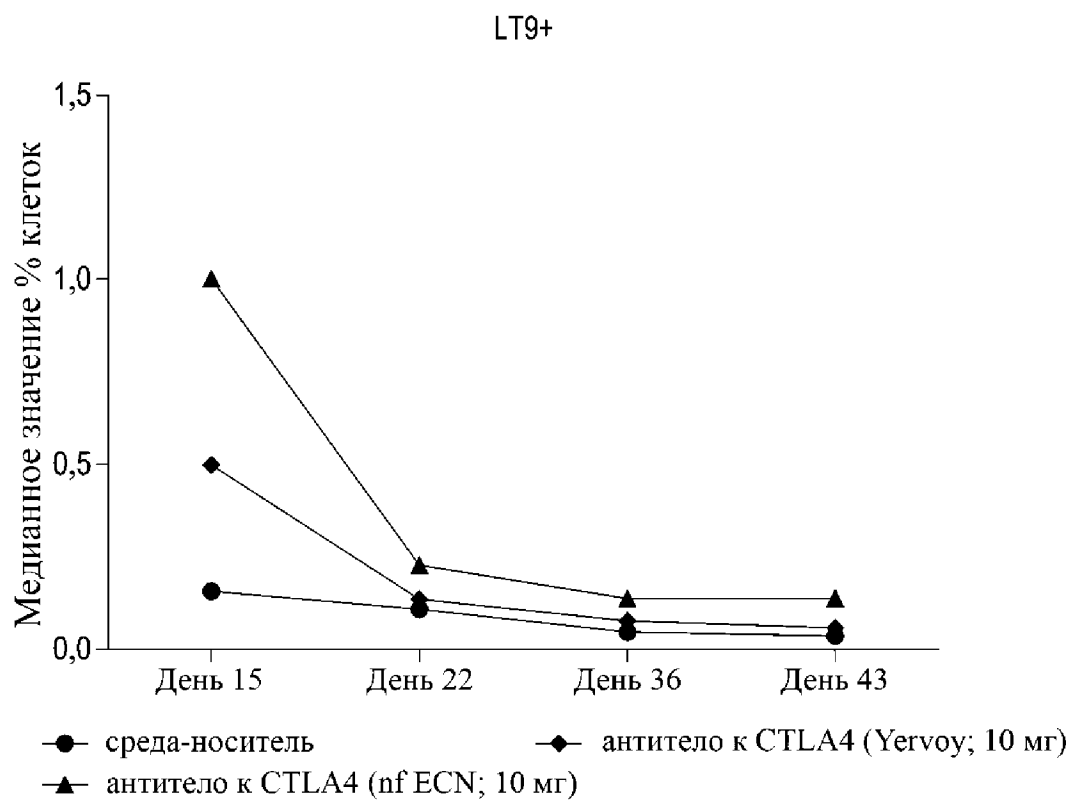
Фиг. 2А

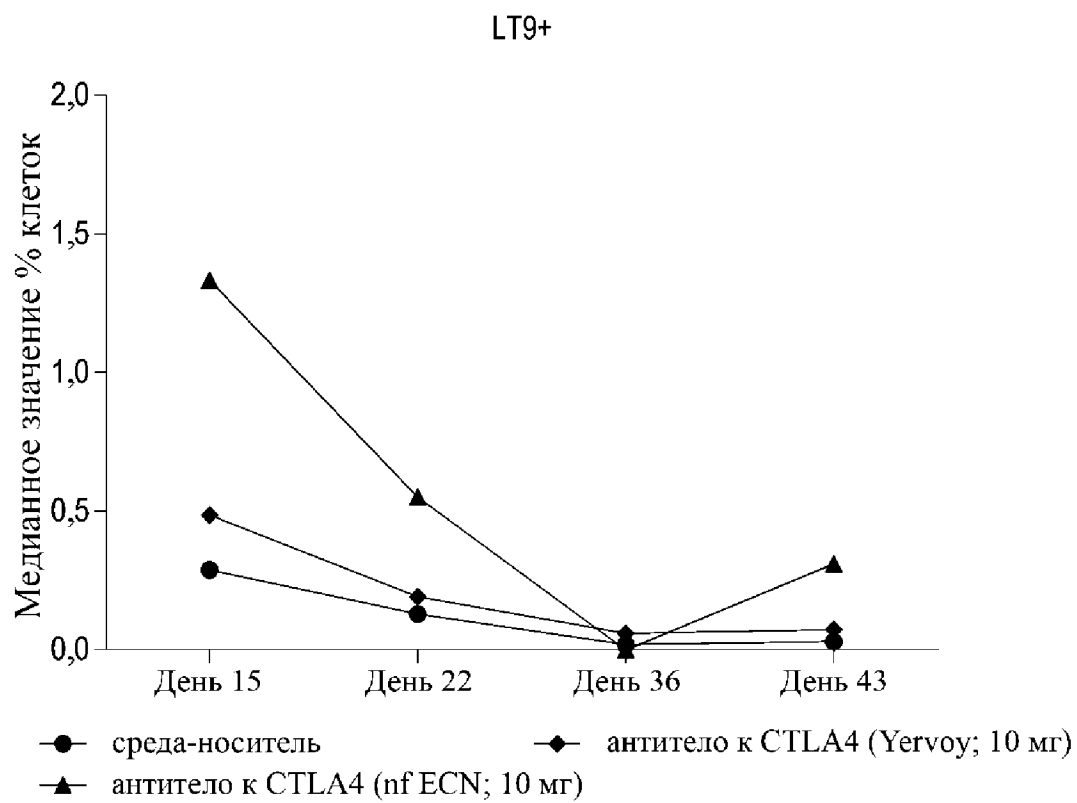
**Фиг. 2В**

**Фиг. 2С**

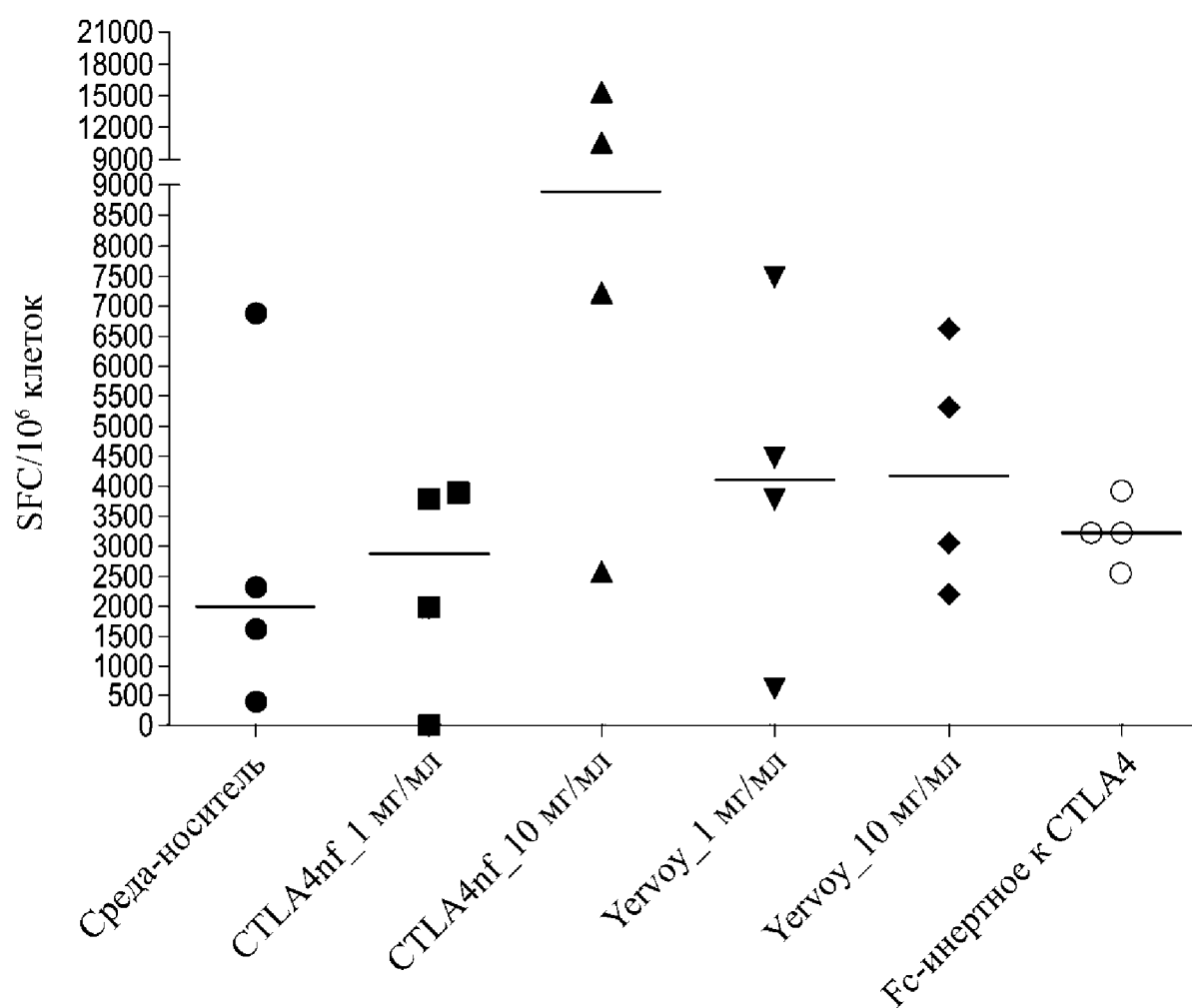


Фиг. 3А

**Фиг. 3В**

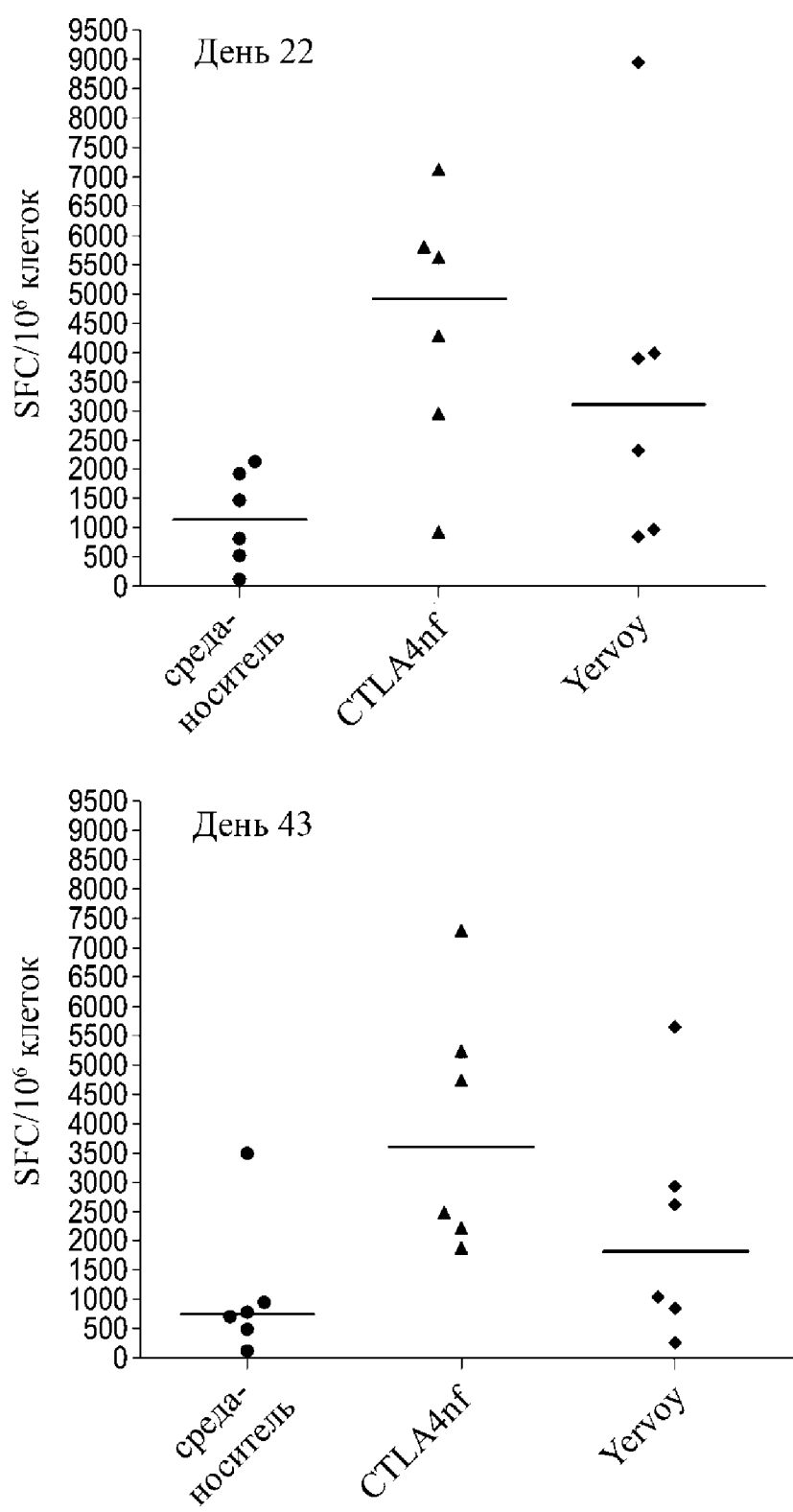
**Фиг. 3С**

Стимулированные с помощью Nef RM9



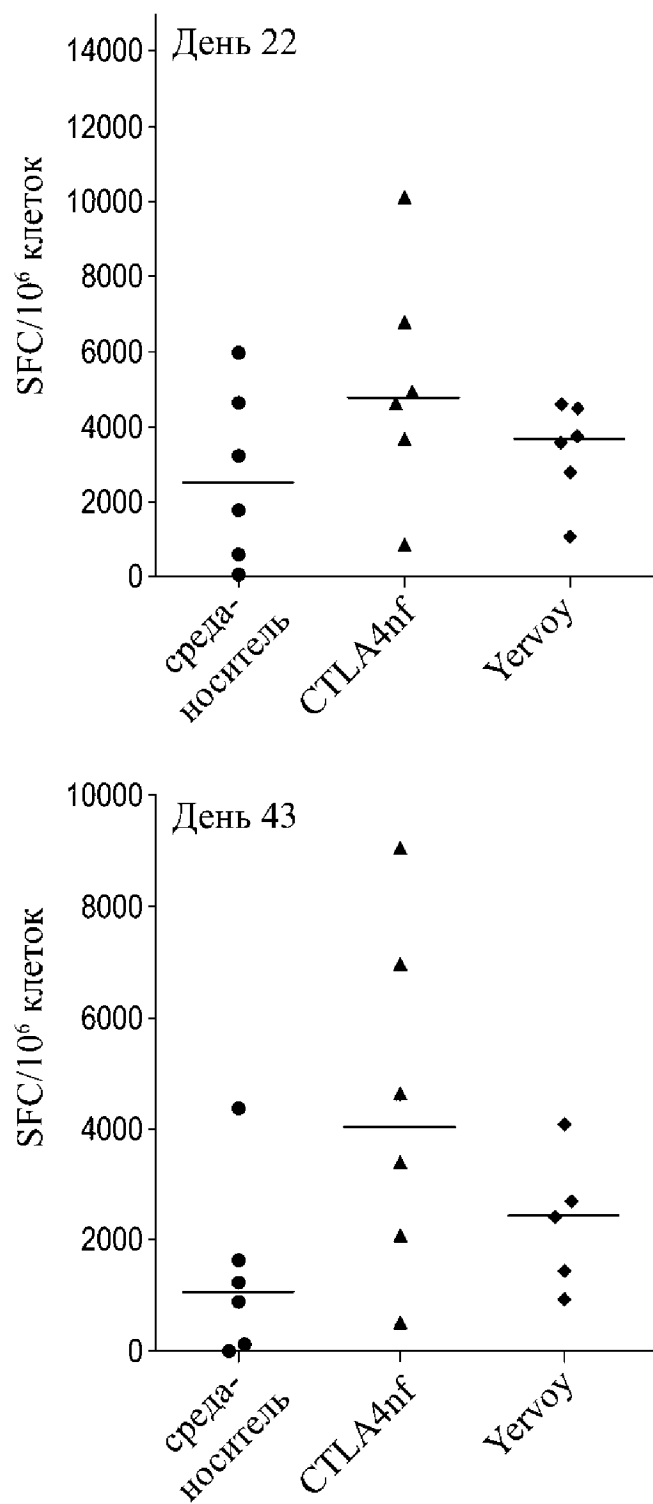
Фиг. 4А

Стимулированные с помощью Nef RM9



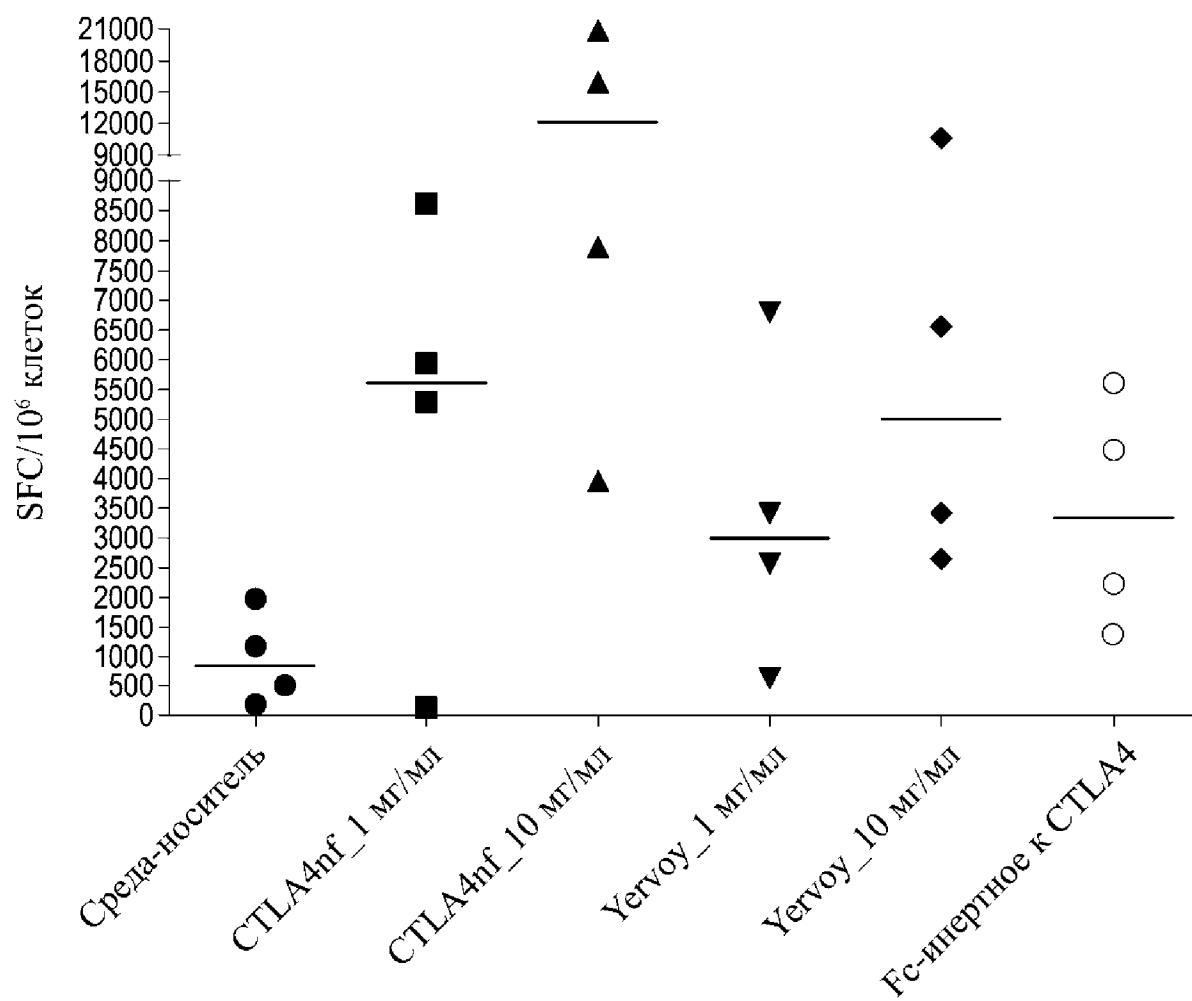
Фиг. 4В

Стимулированные с помощью Nef RM9

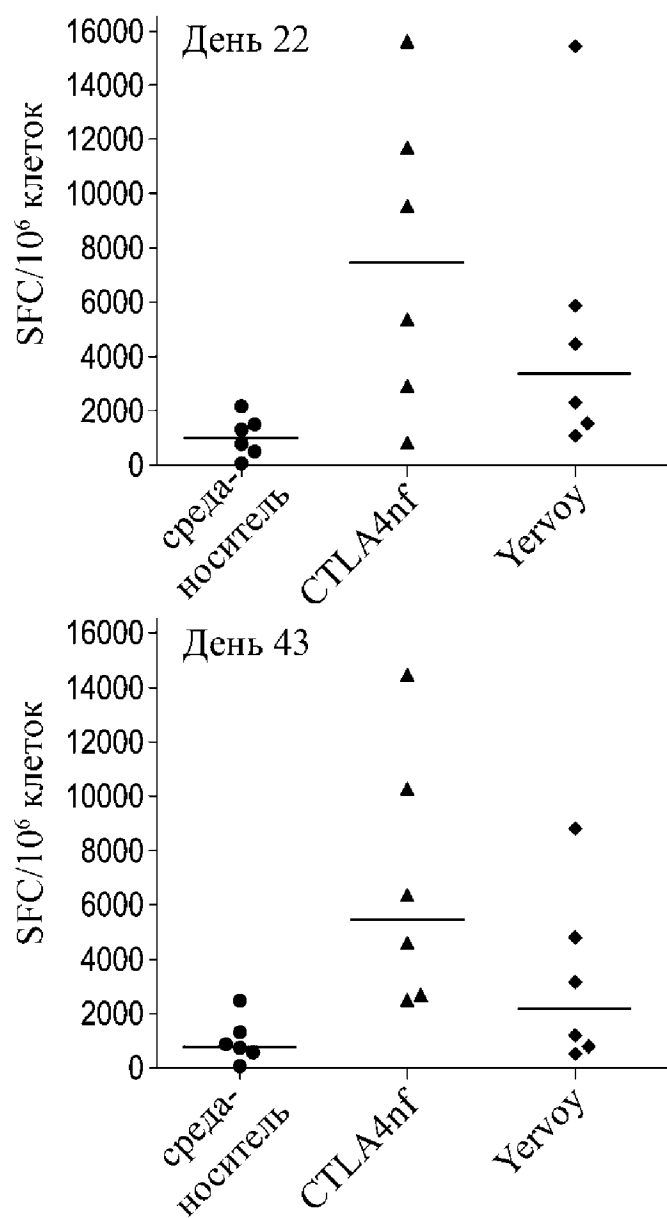


Фиг. 4С

Стимулированные с помощью Gag GW9

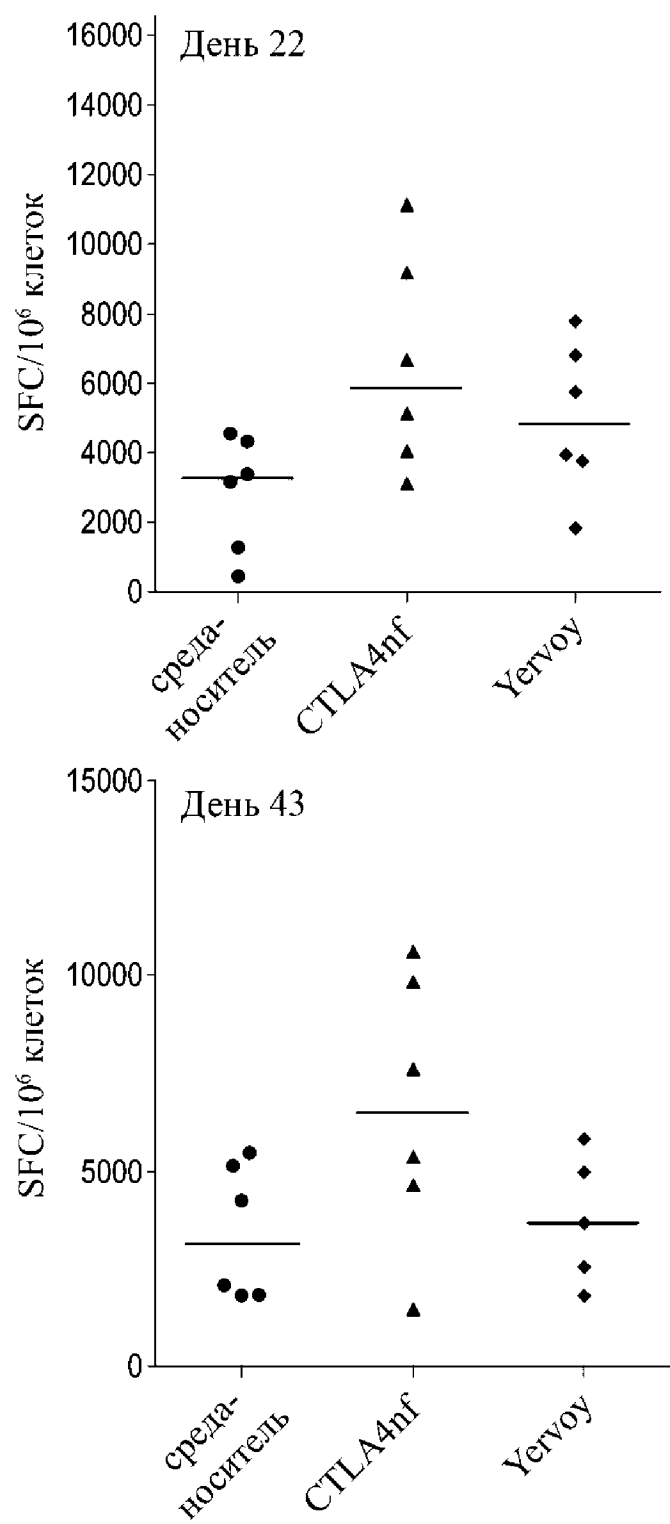


Фиг. 5А



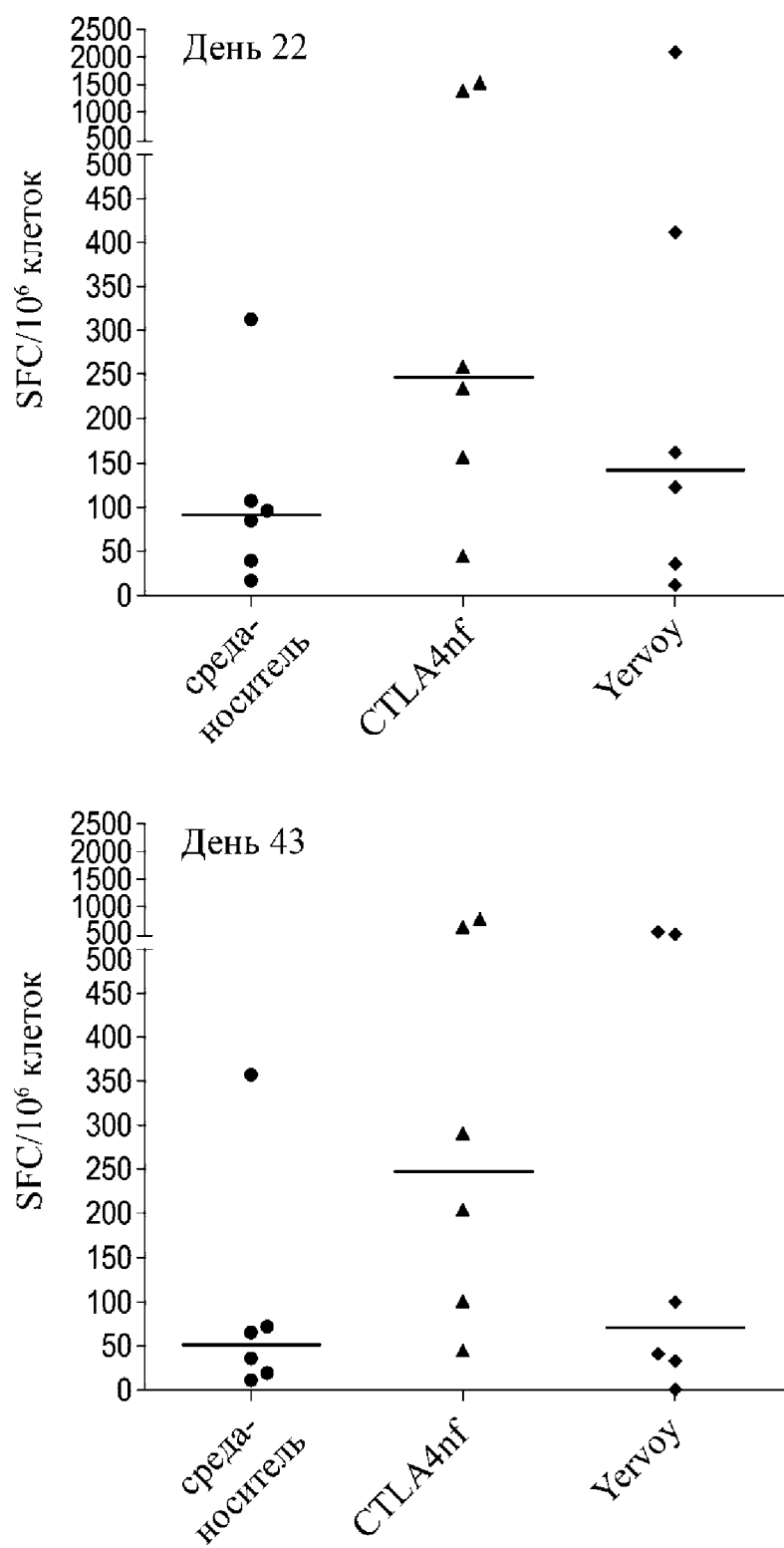
Фиг. 5В

Стимулированные с помощью Gag GW9



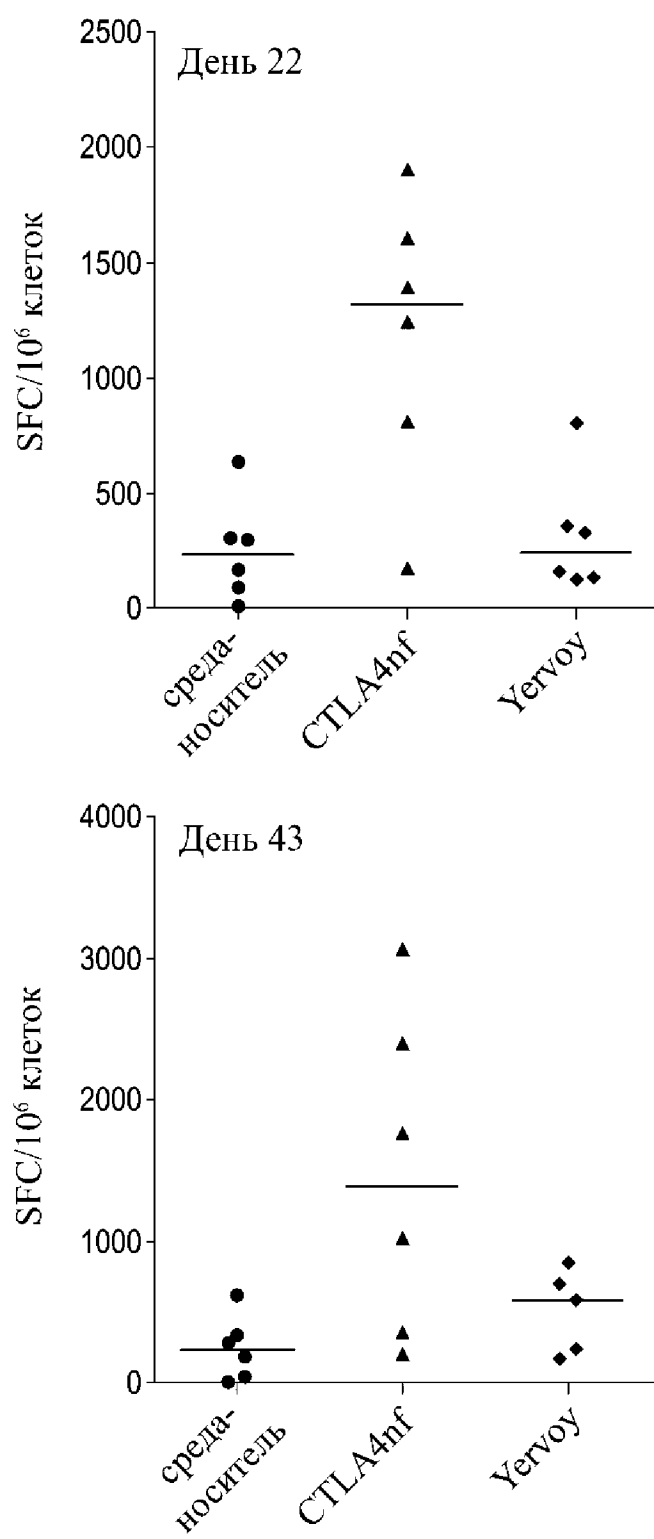
Фиг. 5С

Стимулированные с помощью Nef LT9

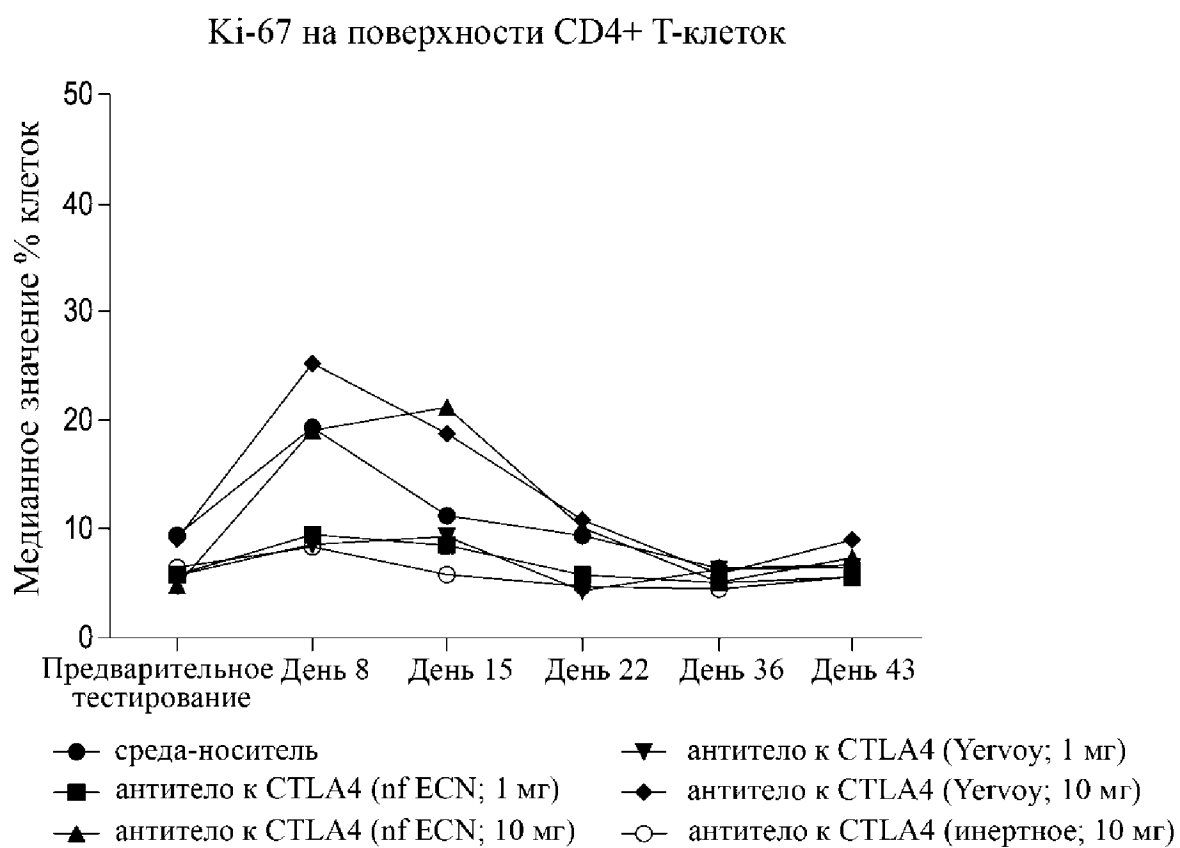


Фиг. 6А

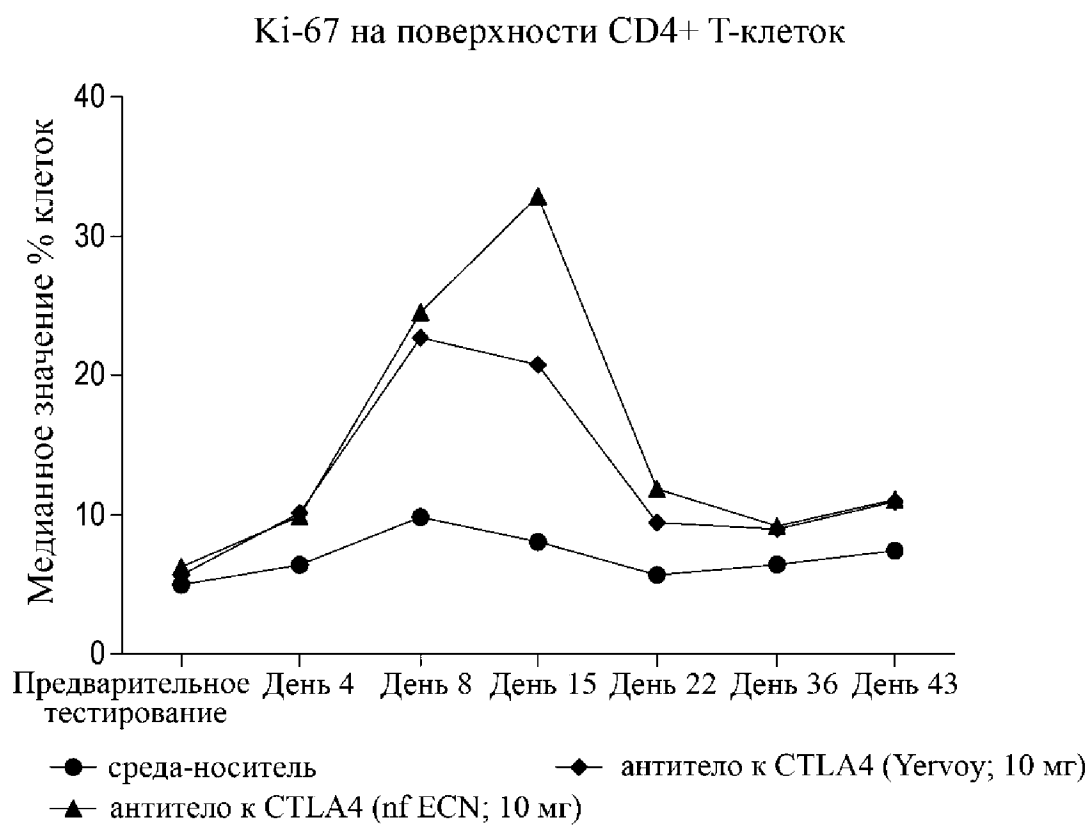
Стимулированные с помощью Nef LT9

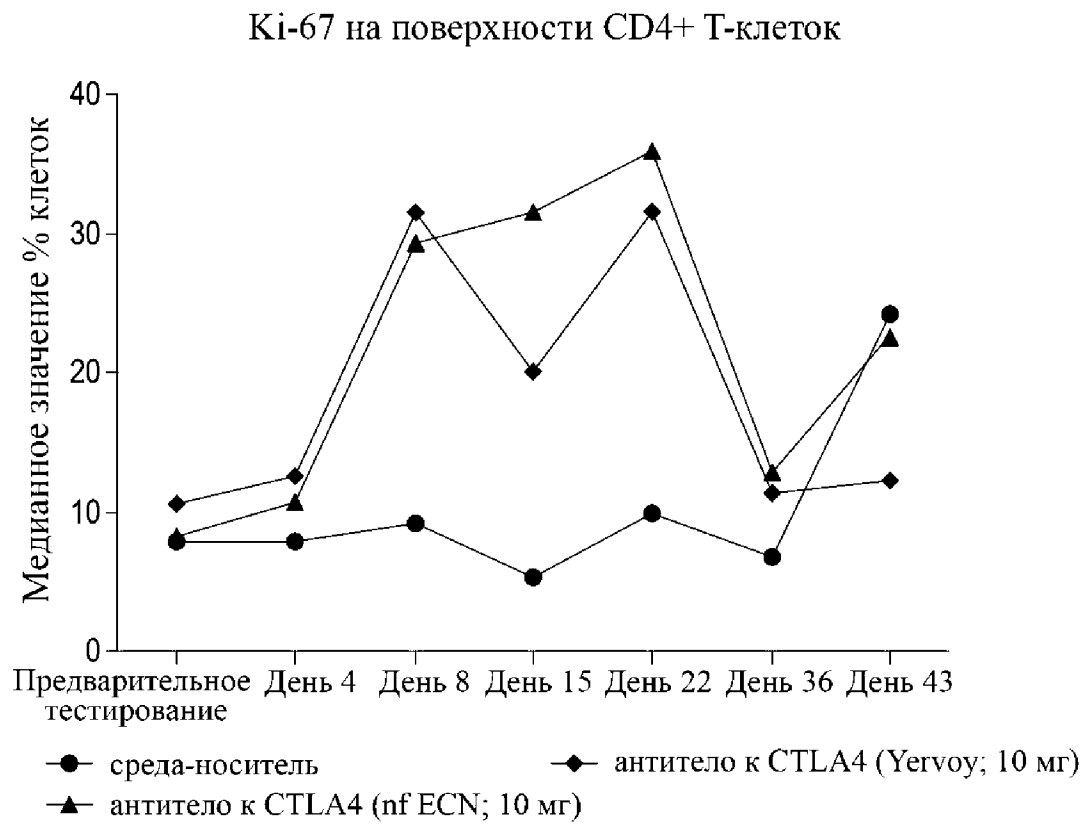


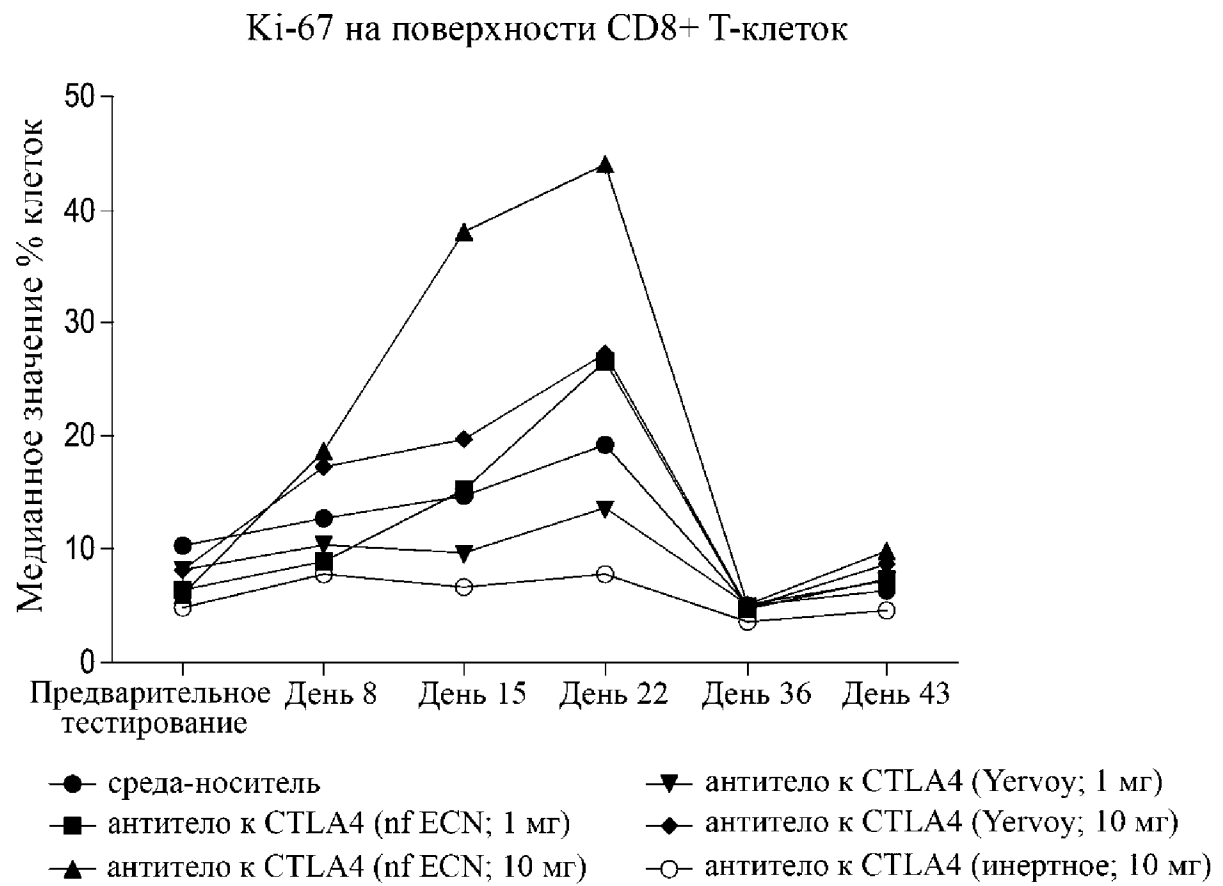
Фиг. 6В

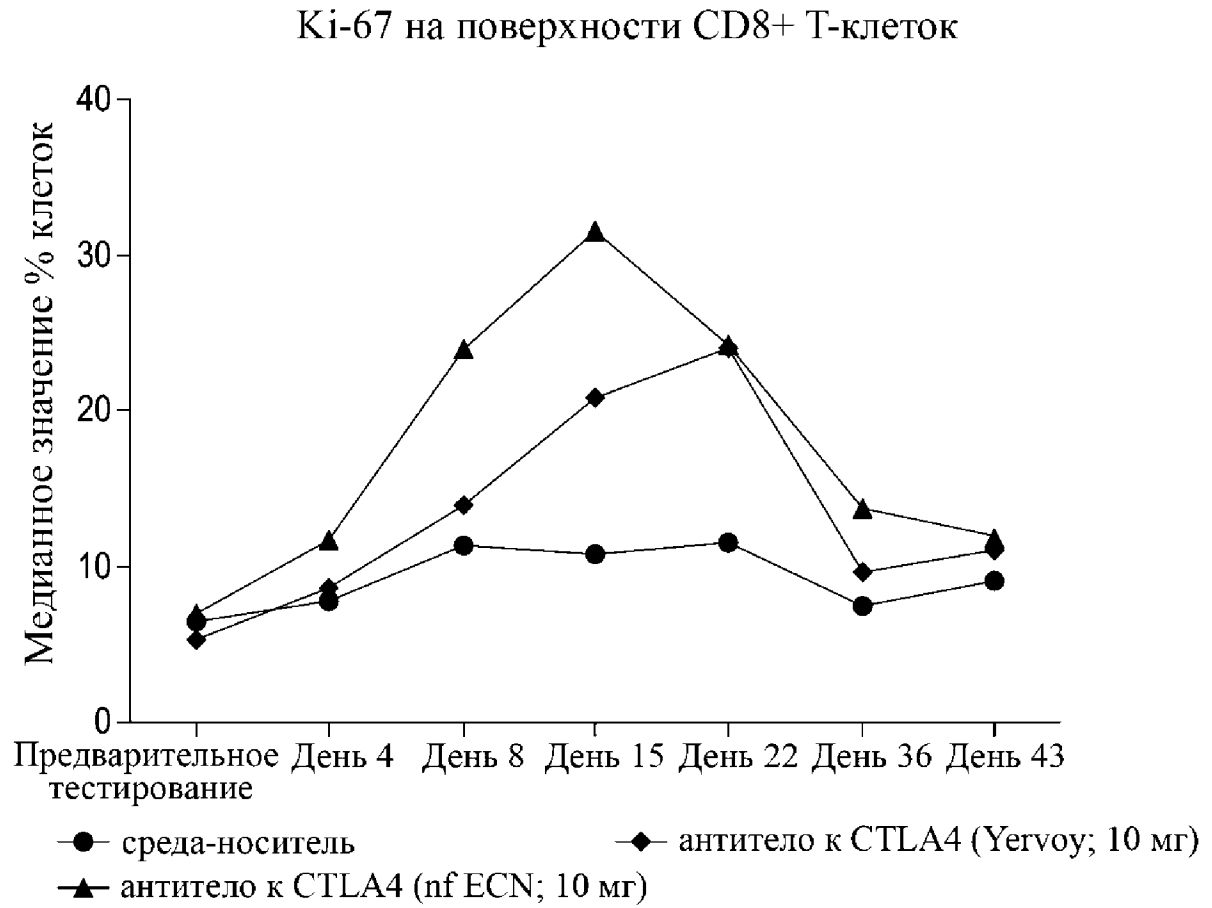


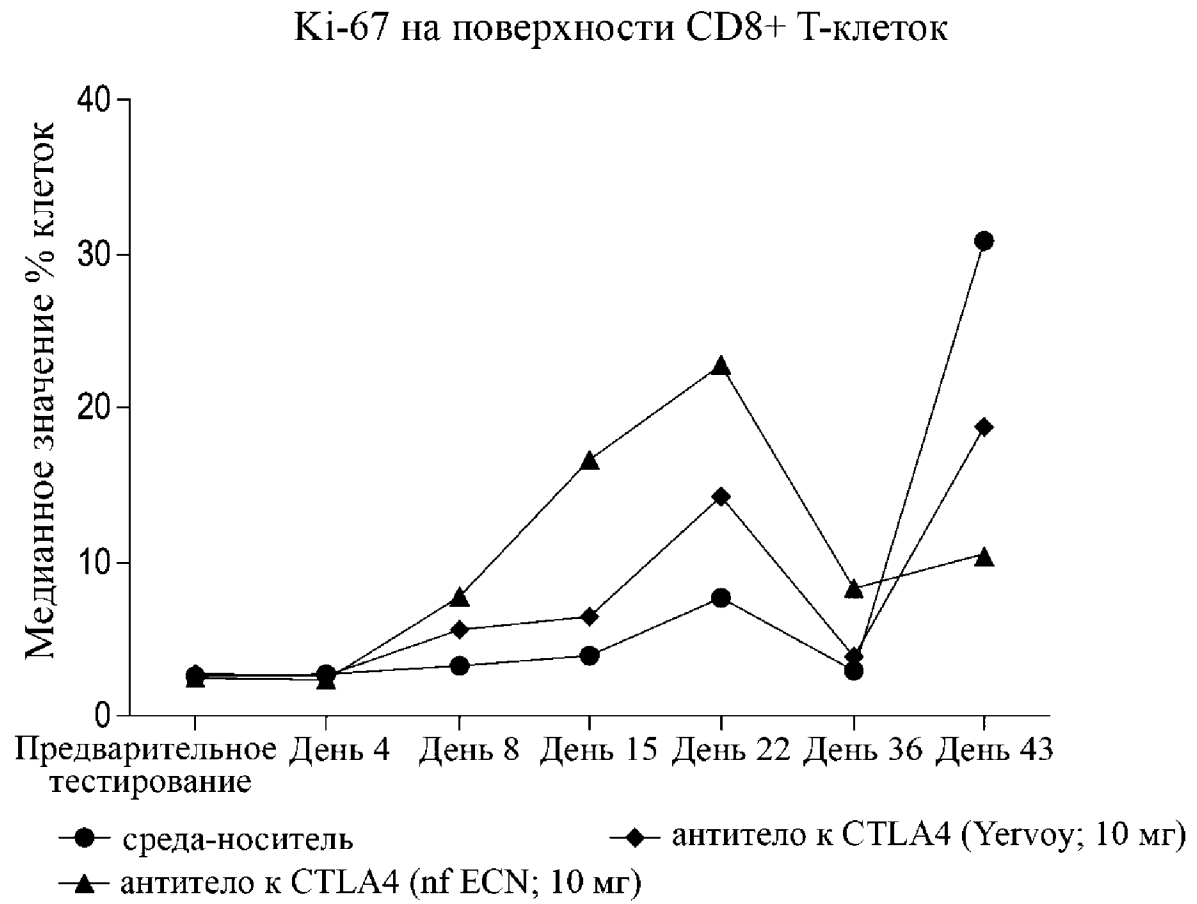
Фиг. 7А

**Фиг. 7В**

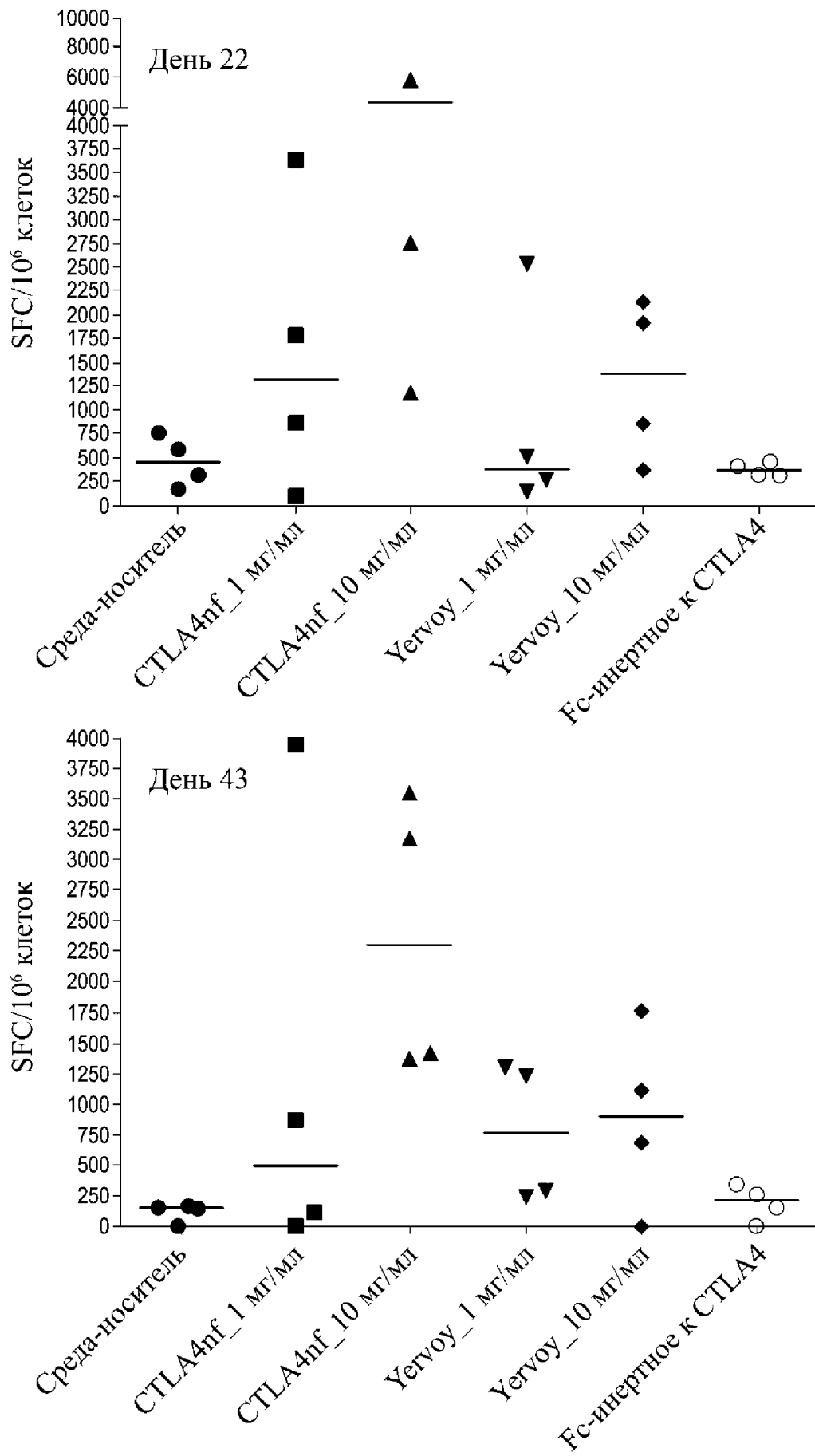
**Фиг. 7С**

**Фиг. 8А**

**Фиг. 8В**

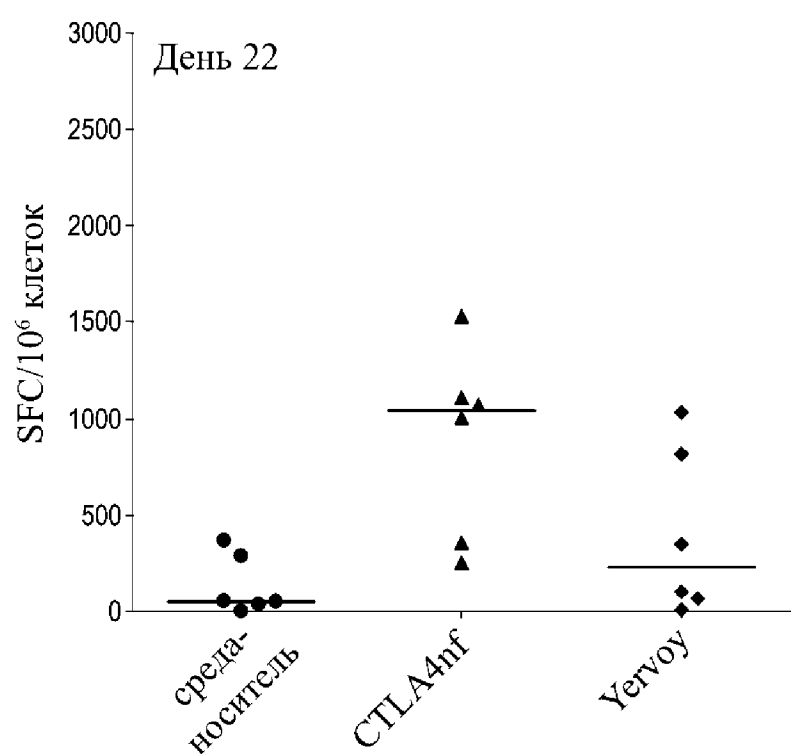
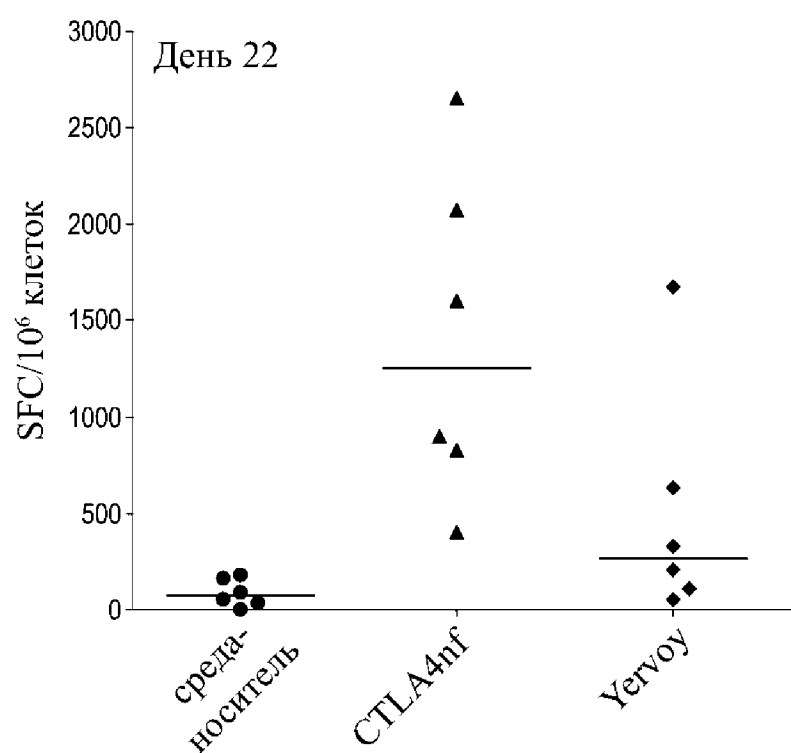
**Фиг. 8С**

Стимулированные белками Ad5



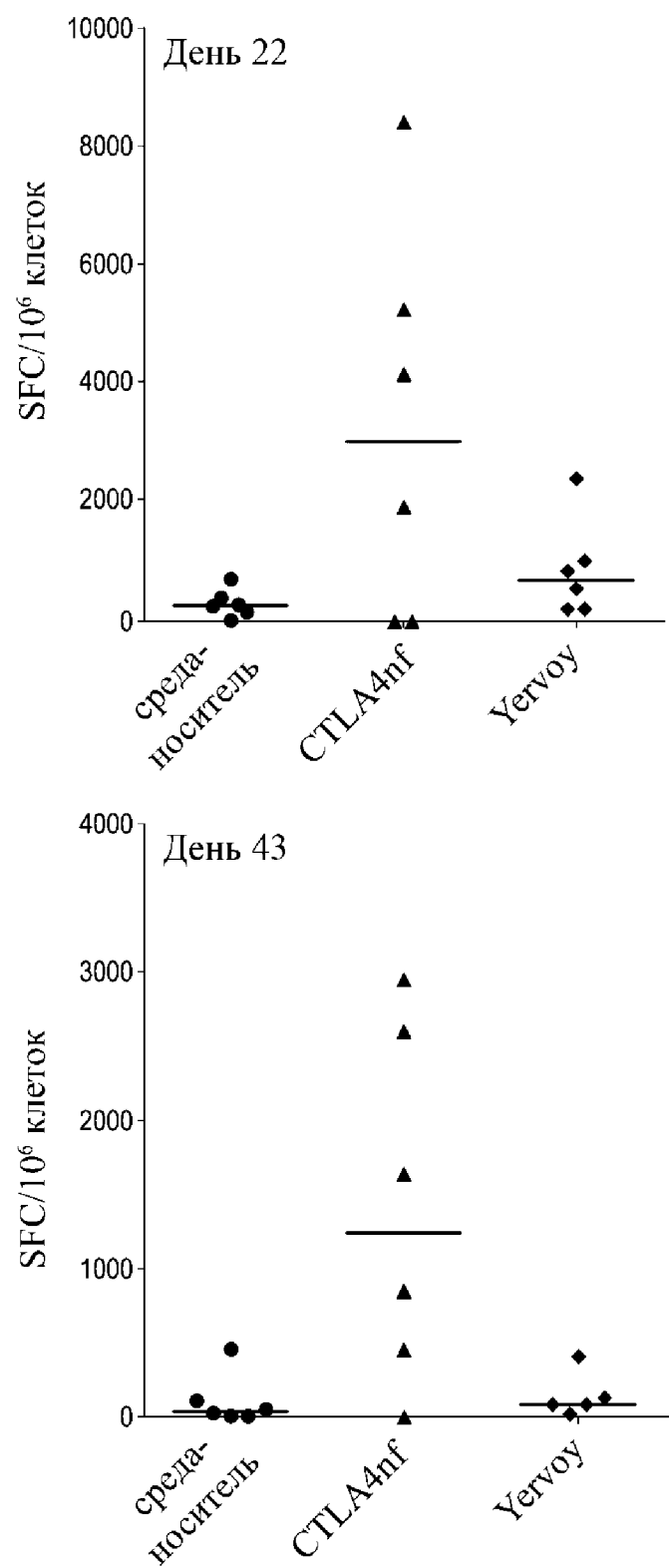
Фиг. 9А

Стимулированные белками Ad5

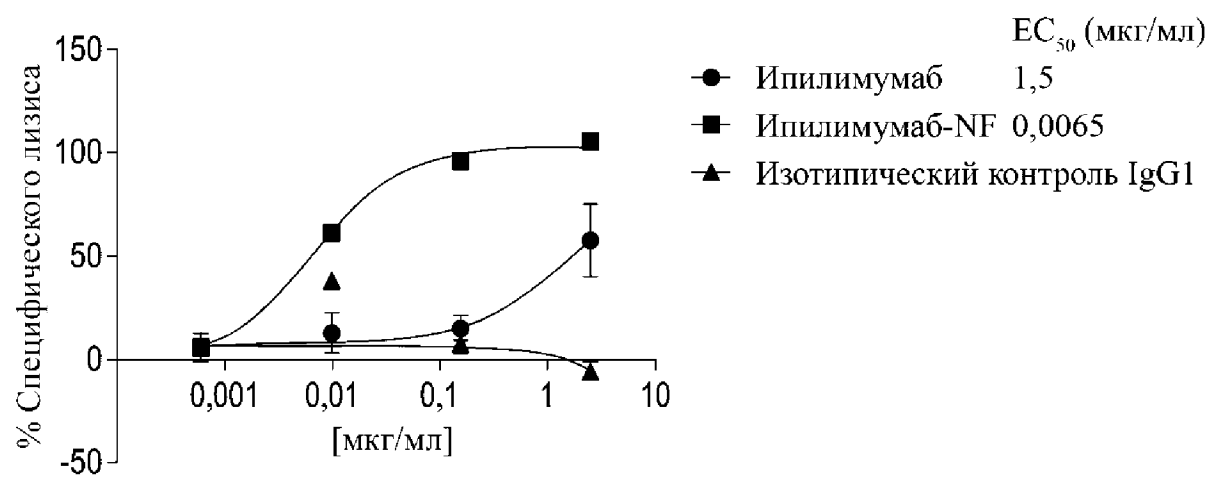


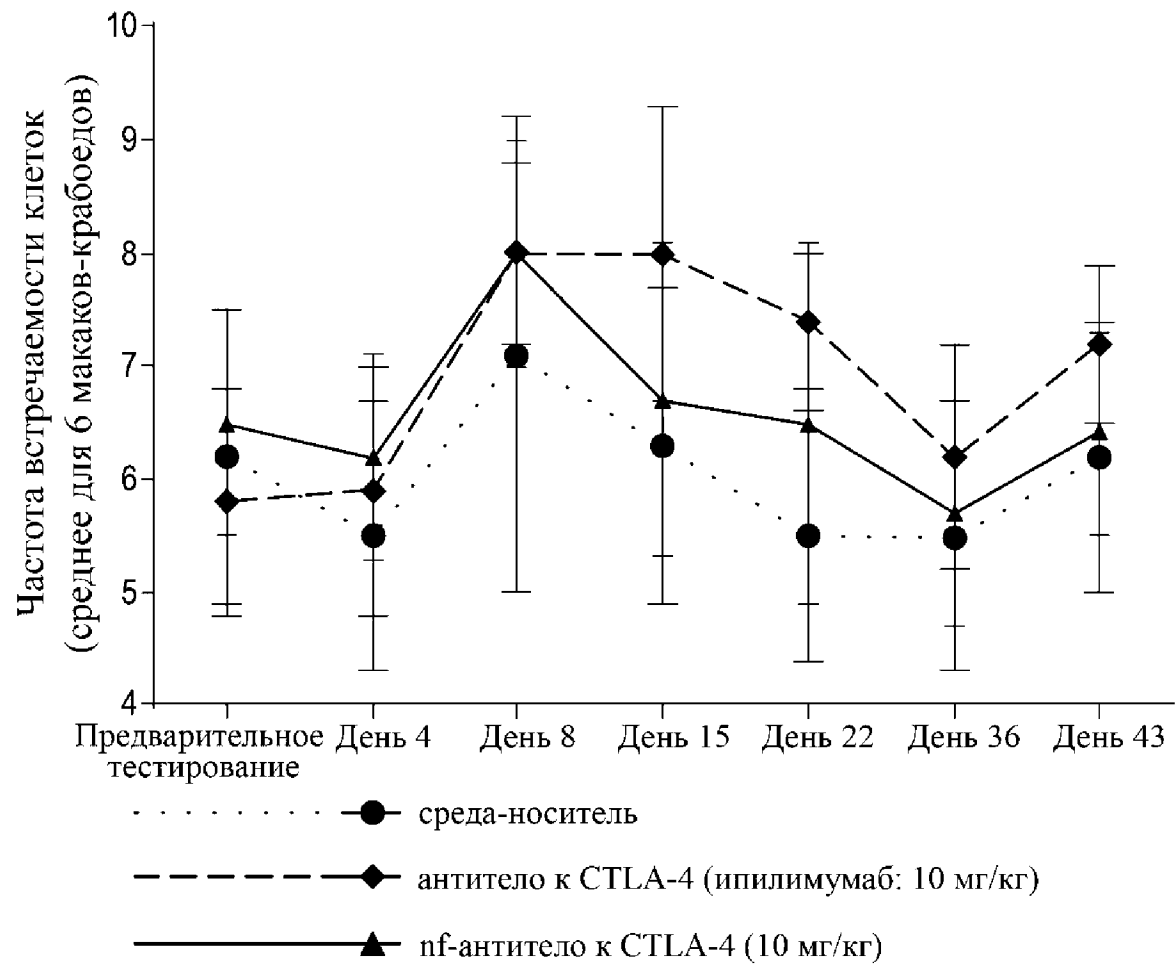
Фиг. 9В

Стимулированные белками Ad5



Фиг. 9С

**Фиг. 10А**



Фиг. 11