(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201992755 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.04.22

(22) Дата подачи заявки
2017.05.19

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(54) НОВЫЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К БЕЛКУ 4, АССОЦИИРОВАННОМУ С ЦИТОТОКСИЧЕСКИМИ Т-ЛИМФОЦИТАМИ, (CTLA-4)

(86) **PCT/CN2017/085134**
(87) **WO 2018/209701 2018.11.22**

(71) Заявитель:
УСИ БАЙОЛОДЖИКС (ШАНХАЙ) КО. ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:
Ван Чжочжи (CN), Ли Цзин, Гололобов Геннадий (US), Сюй Цзяньцин (CN)

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

(57) Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам CTLA-4, в частности к гуманизированным моноклональным антителам, специфически связывающимся с CTLA-4 с высокой аффинностью. Настоящее изобретение также относится к функциональным моноклональным антителам, перекрестно-реактивным с CTLA-4 человека, яванской макаки и мыши. Настоящее изобретение также относится к аминокислотным последовательностям антител по изобретению, клонирующим или экспрессирующим векторам, клеткам-хозяевам и способам экспрессии или выделения антител. Эпитопы антитела идентифицированы. Также предложены терапевтические композиции, содержащие антитела по изобретению. Изобретение также относится к способам лечения злокачественных новообразований и других заболеваний с использованием антител против CTLA-4.

201992755 A1

201992755 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420–559933EA/032

НОВЫЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К БЕЛКУ 4, АССОЦИИРОВАННОМУ С ЦИТОТОКСИЧЕСКИМИ Т–ЛИМФОЦИТАМИ, (CTLA–4)

Область техники

Настоящее изобретение относится в целом к антителам против CTLA–4 и их композициям, а также к иммунотерапии при лечении злокачественного новообразования, инфекций или других заболеваний человека с использованием антител против CTLA–4.

Уровень техники

Противоопухолевая иммунотерапия стала областью активных исследований лечения злокачественных новообразований. Белок 4, ассоциированный с цитотоксическими Т–лимфоцитами, (CTLA–4), является одной из проверенных мишеней иммунных контрольных точек. После активации Т–клеток, CTLA–4 быстро экспрессируется на этих Т–клетках, как правило, в течение одного часа после рекрутирования антигена в TCR. CTLA–4 может ингибировать передачу сигналов Т–клеток посредством конкуренции с CD28. CD28 опосредует один из хорошо охарактеризованных костимулирующих сигналов Т–клеток: связывание CD28 со своими лигандами CD80 (B7–1) и CD86 (B7–2) на антигенпрезентирующих клетках приводит к пролиферации Т–клеток путем индукции продуцирования интерлейкина–2 и антиапоптотических факторов. Из–за гораздо более высокой аффинности связывания CTLA–4 с CD80 и CD86, чем у CD28, CTLA–4 может быть вне конкуренции по отношению к CD28 за связывание на CD80 и CD86, что приводит к подавлению активации Т–клеток. В дополнение к индуцированной экспрессии на активированных Т–клетках CTLA–4 конститутивно экспрессируется на поверхности регуляторных Т–клеток (Treg), что позволяет предположить, что CTLA–4 может быть необходим для контактно–опосредованной супрессии и связан с продуцированием Treg иммуносупрессивных цитокинов, таких как трансформирующий фактор роста бета и интерлейкин–10.

Блокада CTLA–4 может вызвать регрессию опухоли, что продемонстрировано в ряде доклинических и клинических исследований. Два антитела против CTLA–4 находятся в клинической разработке. Ипилимумаб (MDX–010, BMS–734016), полностью человеческое моноклональное антитело против CTLA–4 изотипа IgG1–каппа, является иммуномодулирующим средством, которое было одобрено в качестве монотерапии для лечение прогрессирующей меланомы. Предполагаемый механизм действия для ипилимумаба заключается в интерференции взаимодействия CTLA–4, экспрессируемого на подгруппе активированных Т–клеток, с молекулами CD80/CD86 на профессиональных антигенпрезентирующих клетках. Это приводит к потенцированию Т–клеток благодаря блокаде ингибирующей модуляции активации Т–клеток, стимулируемой CTLA–4, и CD80/CD86 взаимодействию. В результате активация Т–клеток, пролиферация и инфильтрация лимфоцитов в опухоли приводит к гибели опухолевых клеток.

Коммерческая лекарственная форма представляет собой концентрат 5 мг/мл инфузионного раствра. Ипилимумаб также находится в процессе клинических исследований для других типов опухолей, в том числе рака предстательной железы и легких. Другое антитело против CTLA–4, Тремелимумаб, было оценено как монотерапия при меланоме и злокачественной мезотелиоме.

Раскрытие изобретения

Настоящее изобретение относится к выделенным антителам, в частности, моноклональным антителам или гуманизированным моноклональным антителам.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с CTLA–4 человека, обезьяны и мыши.

Указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент ингибирует связывание CTLA–4 с CD80 или CD86.

В указанном антителе или антигенсвязывающем фрагменте связывающий эпитоп антитела или антигенсвязывающего фрагмента содержит N145 или полисахарид на N145 CTLA–4.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с CTLA–4 человека, обезьяны, где связывающий эпитоп антитела или антигенсвязывающего фрагмента содержит P138 CTLA–4.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент

a) связываются с CTLA–4 человека с KD 4,77E–10 M или менее; и

b) связываются с мышиным CTLA–4 с KD 1,39E–09 M или менее.

Указанное антитело, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент проявляют по меньшей мере одно из следующих свойств:

a) связываются с CTLA–4 человека с KD от 4,77E–10 M до 2,08E–10 M и с CTLA–4 мыши с KD от 1,39E–09 M до 9,06E–10 M;

b) усиливают высвобождение интерлейкина–2 из стимулированных PBMC;

c) по существу не связываются с каким–либо белком, выбранным из группы, состоящей из фактора VIII, FGFR, PD–1, CD22, VEGF, CD3, HER3, OX40 и 4–1BB.

Настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 80, 90 или 95% гомологична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4.

Настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4.

Настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим:

a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 80, 90 или 95% гомологична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 6 и 7; и

b) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 80, 90 или 95% гомологична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12 13 и 14,

где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4.

Настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим:

a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7; и

b) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14,

где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4.

В различных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1; и

b) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8,

где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4;

или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2; и

b) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9,

где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4;

или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3; и

b) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10,

где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4;

или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4; и

b) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11,

где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4;

или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5; и

b) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12,

где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4;

или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6; и

b) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13,

где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4;

или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7; и

b) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14,

где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4;

Последовательность указанного антитела представлена в Таблице 1 и в списке последовательностей.

Таблица 1 Выведенные аминокислотные последовательности антител

Клон ID		SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
W3162–1.101.2	Тяжелая цепь	1	EEQLVESGGGLVQPGKSLKLSCSASGFTFRSSAMHWIRQPPGKGLDWVAFISSGGDTAYADAVKGRFIVSRDNAENTLFLQLNSLKSEDTAIYYCVRMERIPTWGQGVMVTVSS

	Легкая цепь	8	DIVLTQSPVLAVSLGQRATISCRASQSVSISSINL IHWYQQRPGQQPKLLIYRTSNLASGIPARFSGS GSGTDFTLSIDPVQADDVADYYCQQSRESPLTF GSGTKLEIK
W3162–1.	Тяжелая цепь	2	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASDLTFSNY DMAWVRQTPTKGLEWVASISPNGGNTYYRDS VKGRFTVSRDNAKNSLYLQMDSLRSEDTATYY CARHLWFAYWGQGTLVTVSS
145.10	Легкая цепь	9	DIQMTQSPSSMSASLGDRVTISCQASQDIGSNLI WFQQKPGKSPRPMIYYATHLADGVPSRFSGSR SGSDYSLTISSLESEDVADYHCLQYKQYPRTFG GGTKLELK
W3162–1.1 46.19	Тяжелая цепь	3	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTYHTITSGY DWTWIRKFPGNQMEWMGYISYSGNTNYNPSL KSRISITRDTSKNQFFLHLNSVTSEDTATYYCAS MMVPHYYVMDAWGQGASVTVSS
	Легкая цепь	10	DVVLTQTPPTSSATIGQSVSISCRSSQSLLNSDG NTYLYWYLQRPSQSPQLLIYLVSKLGSGVPNRF SGSGSGTDFTLKISGVEAEDLGLYYCVQGTHDP WTFGGGTKLELK
W3162–1.1 54.8	Тяжелая цепь	4	EVQLQQSGPEAGRPGSSVKISCKASGYTFTNYF MNWVKQSPGQGLEWIGRVDPENGRADYAEKF KKKATLTADTTSNTAYIHLSSLTSEDTATYFCA RRAMDNYGFAYWGQGTLVTVSS
	Легкая цепь	11	EIMLTQSPTIMAASLGEKITITCSANSSLSYMYW FQQKSGASPKLWVHGTSNLASGVPDRFSGSGS GTSYYLTINTMEAEDAATYFCHHWSNTQWTF GGGTKLELK
W3162–1.1 45.10–z7	Тяжелая цепь	5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASDLTFSNY DMAWVRQAPGKGLEWVASISPSGGNTYYRDS VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CARHLWFAYWGQGTLVTVSS

	Легкая цепь	12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIGSNLI WFQQKPGKAPKPMIYYATHLADGVPSRFSGSR SGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYKQYPRTFG GGTKVEIK
W3162.1.14 6.–z12	Тяжелая цепь	6	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVTYHTITSGY DWTWIRKPPGKGMEWIGYISYSGNTNYNPSLK SRVTISRDTSKNQFFLKLSSVTAADTAVYYCAS MMVPHYYVMDAWGQGTLVTVSS
	Легкая цепь	13	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLLNSDG NTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSKLGSGVPNR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTH DPWTFGGGTKVEIK
W3162.1.15 4.8–z35	Тяжелая цепь	7	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNY FMNWVRQAPGQGLEWMGRVDPEQGRADYAE KFKKRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARRAMDNYGFAYWGQGTLVTVSS
	Легкая цепь	14	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSANSALSYMY WYQQKPDQSPKLWVHGTSNLASGVPSRFSGSG SGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHHWSNTQWTF GGGTKVEIK

В другом аспекте изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим область, определяющую комплементарность, (CDR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15–41, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4.

В другом аспекте изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим: вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3; и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где последовательность CDR3 вариабельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 16, 17 и 18 и их консервативных модификаций, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4.

Предпочтительно, когда последовательность CDR3 вариабельной области легкой цепи вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:

19, 20, 21 и 22 и их консервативных модификаций.

Предпочтительно, когда последовательность CDR2 вариабельной области тяжелой цепи вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 и 28 и их консервативных модификаций.

Предпочтительно, когда последовательность CDR2 вариабельной области легкой цепи вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 29, 30, 31 и 32 и их консервативных модификаций.

Предпочтительно, когда последовательность CDR1 вариабельной области тяжелой цепи вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 33, 34, 35 и 36 и их консервативных модификаций.

Предпочтительно антитело по настоящему изобретению, где последовательность CDR1 вариабельной области легкой цепи вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40 и 41 и их консервативных модификаций.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4 и содержат: вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3; и вариабельную область легкой цепи, которая содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где:

a) последовательность CDR1 вариабельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 33, 34, 35 и 36, и последовательность CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 и 28, последовательность CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 15, 16, 17 и 18;

b) и последовательность CDR1 вариабельной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40 и 41, и последовательность CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группа, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 29, 30, 31 и 32, последовательность CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из

группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 19, 20, 21 и 22,

где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4.

Предпочтительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

a) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15;

b) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 23;

c) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 33;

d) CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 19;

e) CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 29;

f) CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 37; где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4.

Другое предпочтительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

a) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 16;

b) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 24;

c) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 34;

d) CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20;

e) CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 30;

f) CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38; где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4.

Другое предпочтительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

a) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 17;

b) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 25;

c) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 35;

d) CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 19;

e) CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 31;

f) CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержаще. SEQ ID NO: 39; где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4.

Другое предпочтительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

a) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 18;

b) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 26;

c) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 36;

d) CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 22;

e) CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 32;

f) CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 40; где антитело специфически связывается с CTLA–4.

Другое предпочтительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

a) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 16;

b) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 27;

c) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 34;

d) CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20;

e) CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 30;

f) CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38; где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4.

Другое предпочтительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

a) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 17;

b) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 25;

c) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 35;

d) CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 21;

e) CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 31;

f) CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39; где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4.

Другое предпочтительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

a) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 18;

b) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 28;

c) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 36;

d) CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 22;

e) CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 32;

f) CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 41; где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4.

Последовательности CDR указанных антител представлены в Таблице 2 и в списке последовательностей.

Таблица 2 Последовательности CDR антител

Клон ID.		SEQ ID NO	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3
W3162–1.101.2	Тяжелая цепь	33	SSAMH	23	FISSGGDTAYADAVKG	15	MERIPT
	Легкая Цепь	37	RASQSVSISSINLIH	29	RTSNLAS	19	QQSRESPLT
W3162–1.145.10	Тяжелая Цепь	34	NYDMA	24	SISPNGGNTYYRDSVKG	16	HLWFAY
	Легкая Цепь	38	QASQDIGSNLI	30	YATHLAD	20	LQYKQYPRT
W3162–1.1	Тяжелая	35	SGYDWT	25	YISYSGNTNYNPSLKS	17	MMVPHYYVMDA

46.19	Цепь						
	Легкая Цепь	39	RSSQSLLNSDGNTYLY	31	LVSKLGS	21	VQGTHDPWT
W3162–1.1 54.8	Тяжелая Цепь	36	NYFMN	26	RVDPENGRADYAEKFKK	18	RAMDNYGFAY
	Легкая Цепь	40	SANSSLSYMY	32	GTSNLAS	22	HHWSNTQWT
W3162–1.1 45.10–z7	Тяжелая Цепь	34	NYDMA	27	SISPSGGNTYYRDSVKG	16	HLWFAY
	Легкая Цепь	38	QASQDIGSNLI	30	YATHLAD	20	LQYKQYPRT
W3162.1.146.–z12	Тяжелая Цепь	35	SGYDWT	25	YISYSGNTNYNPSLKS	17	MMVPHYYVMDA
W3162–1.1 46.19	Тяжелая Цепь	35	SGYDWT	25	YISYSGNTNYNPSLKS	17	MMVPHYYVMDA
W3162.1.154.8–z35	Тяжелая Цепь	36	NYFMN	28	RVDPEQGRADYAEKFKK	18	RAMDNYGFAY
	Тяжелая Цепь	41	SANSALSYMY	32	GTSNLAS	22	HHWSNTQWT

Антитела по изобретению могут быть химерными антителами.

Антитела по изобретению могут быть гуманизированными антителами.

Антитела по изобретению могут быть полностью человеческими антителами.

Антитела по изобретению могут быть антителами крысы.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут проявлять по меньшей мере одно из следующих свойств:

a) связываются с CTLA–4 человека с KD 2,08E–09 M или менее и/или с CTLA–4 мыши с KD 1,39E–09 M или менее;

b) усиливают высвобождение интерлейкина–2 из стимулированных PBMC;

В дополнительном аспекте изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Изобретение относится к клонирующему или экспрессирующему вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент.

Изобретение также относится к клетке–хозяину, содержащей один или более клонирующих или экспрессирующих векторов.

Еще в одном аспекте изобретение относится к способу, включающему культивирование клетки–хозяина по изобретению и выделение антитела,

где антитело получают путем иммунизации крысы SD с помощью внеклеточного домена человеческого CTLA–4 и внеклеточного домена мышиного CTLA–4.

Изобретение относится к трансгенному животному, такому как крыса,

содержащему трансгены тяжелой и легкой цепи человеческого иммуноглобулина, где крыса экспрессирует антитело по настоящему изобретению.

Изобретение относится к гибридоме, полученной с использованием крысы по настоящему изобретению, где гибридома продуцирует указанное антитело.

В дополнительном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела по изобретению и один или более из фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, разбавителя или носителя.

Изобретение относится к иммуноконъюгату, содержащему указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, связанным с терапевтическим агентом.

При этом изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей указанный иммуноконъюгат и один или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, разбавителя или носителя.

Изобретение также относится к способу получения антитела против CTLA–4 или его антигенсвязывающего фрагмента, включающему:

(a) обеспечение:

(i) последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела, содержащей последовательность CDR1, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 33–36, последовательность CDR2, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23–28; и последовательность CDR3, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15–18; и/или

(ii) последовательности вариабельной области легкой цепи антитела, содержащей последовательность CDR1, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37–41, последовательность CDR2, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29–32, и последовательность CDR3, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19–22; и

(b) экспрессию измененной последовательности антитела в виде белка.

Изобретение также относится к способу модулирования иммунного ответа у пациента, включающему введение пациенту антитела или антигенсвязывающего фрагмента любого из указанных антител по настоящему изобретению.

Изобретение также относится к применению указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики иммунного расстройства или злокачественного новообразования.

Изобретение также относится к способу ингибирования роста опухолевых клеток у пациента, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества указанного антитела или указанного антигенсвязывающего фрагмента для ингибирования роста опухолевых клеток.

При этом изобретение относится к способу, отличающемуся тем, что опухолевые клетки представляют собой клетки злокачественного новообразования, выбранного из

группы, состоящей из меланомы, рака почки, рака простаты, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака легкого, рака кости, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы или шеи, кожной или внутриглазной злокачественной меланомы, рака матки, рака яичников и рака прямой кишки.

При этом изобретение относится к способу, отличающемуся тем, что антитело представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело, антитело человека или антитело крысы.

Особенности и преимущества настоящего изобретения

Авторы изобретения создали гуманизированные антитела против CTLA–4 с использованием запатентованной технологии гибридомы, в которой антитела ингибировали связывание CTLA–4 с его лигандами CD80 и CD86. Антитела, описанные в настоящем изобретении, имеют высокую аффинность связывания, специфически связываясь с белком CTLA–4 человека и обезьяны; и сильные модулирующие иммунные ответы и увеличение продукции интерлейкина–2.

Одно из антител не только связывается с CTLA–4 человека и обезьяны, но также связывается с CTLA–4 мыши, что может значительно облегчить доклиническую проверку его эффективности на моделях опухолей у мышей.

Краткое описание чертежей

На Фигуре 1 показаны графики связывания химерных антител с CTLA–4 человека в ИФА.

На Фигуре 2 показаны графики связывания химерных антител с CTLA–4 яванской макаки в ИФА.

На Фигуре 3 показаны графики связывания химерных антител с CTLA–4 мыши в ИФА.

На Фигуре 4 показаны графики связывания химерных антител с CTLA–4 человека на клетках с помощью FACS.

На Фигуре 5 показан результат связывания химерных антител на CTLA–4 человека с помощью SPR.

На Фигуре 6 показан результат блокирования связывания лиганда химерными антителами.

На Фигуре 7 показаны графики химерных Ab, ингибированных связыванием с CTLA–4, на клетках, экспрессирующих CD80 или CD86.

На Фигуре 8 показаны результаты усиленного высвобождения цитокинов химерными антителами из стимулированных SEB PBMC.

На Фигуре 9 показаны графики связывания гуманизированных антител с CTLA–4 человека, яванской макаки и мыши в ИФА.

На Фигуре 10a показаны графики связывания гуманизированных антител с CTLA–4 на клетках (FACS).

На Фигуре 10b показаны графики аффинности гуманизированных антител с использованием FACS.

На Фигуре 11 показано с помощью ИФА, что гуманизированные антитела блокируют связывание лиганда.

На Фигуре 12 показано с помощью FACS, что гуманизированные антитела блокируют связывание CTLA–4 с его лигандами.

На Фигуре 13 показано в анализе SEB, что гуманизированные антитела усиливают высвобождение цитокинов.

На Фигуре 14 показан профиль SEC W3162–1.146.19–Z12 или W3162–1.154.8–Z35 при различных условиях.

На Фигуре 15 показан результат эффективности in vivo антитела W3162–146.19–z12.

На Фигуре 16 показано, что антитела W3162 специфически связываются с CTLA–4.

Фигура 17. Связывающая активность антител против CTLA4 с мутантами CTLA–4/CTLA–4 человека. Антитела (A) Ипилимумаб, (B) W3162–1.146.19–z12 и (C) W3162–1.154.8–z35 были захвачены предварительно покрытым 2 мкг/мл козьим антителом против IgG Fc человека, а затем их инкубировали с разбавленным hCTLA4–His (WT) или его мутеинами (N113Q и N145Q), затем добавляли антитело HRP–анти–His с целью детектирования.

На Фигуре 18 показаны остатки связывания или эпитопы, картированные на CTLA–4 человека: (A) сайты связывания CD80 (PDB: 1I8L), (B) CD86 (PDB: 1I85), (C) тремелимумаб (PDB: 5GGV), (D) Ипилимумаб, (E) W3162–1.146.19–z12 и (F) W3162–1.154.8–z35, соответственно. CTLA–4–структура IAH1 была использована для DF, чтобы показать структуру гликозилирования.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Для того чтобы настоящее изобретение было более понятным, сначала дается определение некоторым терминам. Дополнительные определения приведены в подробном описании.

Термины «антиген–4, ассоциированный с цитотоксическими Т–лимфоцитами», «Белок CTLA–4», «CTLA–4», «CTLA4», «CD152» используются взаимозаменяемо и включают варианты, изоформы, видовые гомологи человеческого CTLA–4 или CTLA–4 других видов, и аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с CTLA–4.

Термин «антитело» в контексте настоящего описания включает цельные антитела и любой антигенсвязывающий фрагмент (то есть «антигенсвязывающую часть») или их отдельные цепи. «Антитело» относится к белку, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, или их антигенсвязывающую часть. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем описании как VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно обозначенной здесь как VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области VH и VL могут

быть далее подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность, (CDR), с вкраплениями областей, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от N–конца к C–концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном.

Термин «антитело», используемый в настоящем описании, относится к иммуноглобулину или его фрагменту или его производному и охватывает любой полипептид, содержащий антигенсвязывающий сайт, независимо от того, получен ли он in vitro или in vivo. Этот термин включает, но не ограничивается ими, поликлональные, моноклональные, моноспецифичные, полиспецифичные, неспецифичные, гуманизированные, одноцепочечные, химерные, синтетические, рекомбинантные, гибридные, мутированные и трансплантированные антитела. Термин «антитело» также включает фрагменты антител, такие как Fab, F(ab')2, Fv, scFv, Fd, dAb и другие фрагменты антител, которые сохраняют антигенсвязывающую функцию, то есть способность специфически связываться с CTLA–4. Обычно такие фрагменты содержат антигенсвязывающий фрагмент.

Термины «антигенсвязывающий фрагмент», «антигенсвязывающий домен» и «связывающий фрагмент» относятся к части молекулы антитела, которая содержит аминокислоты, ответственные за специфическое связывание между антителом и антигеном. В тех случаях, когда антиген является крупным, антигенсвязывающий фрагмент может связываться только с частью антигена. Часть молекулы антигена, которая отвечает за специфические взаимодействия с антигенсвязывающим фрагментом, называется «эпитоп» или «антигенная детерминанта».

Антигенсвязывающий фрагмент обычно содержит вариабельную область легкой цепи антитела (VL) и вариабельную область тяжелой цепи антитела (VH), однако он необязательно должен включать их обе. Например, так называемый фрагмент Fd антитела состоит только из домена VH, но все еще сохраняет некоторую антигенсвязывающую функцию интактного антитела.

В соответствии с вышеизложенным термин «эпитоп» определяет антигенную детерминанту, которая специфически связывается/идентифицируется связывающим фрагментом, как определено выше. Связывающий фрагмент может специфически связываться/взаимодействовать с конформационными или непрерывными эпитопами, которые являются уникальными для структуры мишени, например CTLA–4 человека и CTLA–4 мыши. Конформационный или прерывистый эпитоп характеризуется для полипептидных антигенов наличием двух или более отдельных аминокислотных остатков, которые разделены в первичной последовательности, но собираются вместе на поверхности молекулы, когда полипептид складывается в нативный белок/антиген. Два или более отдельных аминокислотных остатка, вносящих вклад в эпитоп, присутствуют на отдельных участках одной или более полипептидных цепей. Эти остатки объединяются

на поверхности молекулы, когда полипептидная цепь(цепи) складывается(складываются) в трехмерную структуру, образуя эпитоп. Напротив, непрерывный или линейный эпитоп состоит из двух или более отдельных аминокислотных остатков, которые присутствуют в одном линейном сегменте полипептидной цепи.

Термин «связывается с эпитопом CTLA–4» относится к антителам, имеющим специфическое связывание с конкретным эпитопом CTLA–4, которое может быть определено линейной аминокислотной последовательностью или третичной, то есть трехмерной конформацией на части полипептида CTLA–4. Связывание означает, что аффинность антител к части CTLA–4 существенно больше, чем их аффинность к другим родственным полипептидам. Термин «существенно большая аффинность» означает, что наблюдается измеримое увеличение аффинности для части CTLA–4 по сравнению с аффинностью для других связанных полипептидов. Предпочтительно, аффинность по меньшей мере в 1,5 раза выше, в 2 раза, в 5 раз в 10 раз, 100 раз, в 10^3 раз, в 10^4 раз, в 10^5 раз, в 10^6 раз выше или более для конкретной части CTLA–4, чем для других белков. Предпочтительно аффинность связывания определяют с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), или с помощью флуоресцентно–активированной сортировки клеток (FACS) или поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Более предпочтительно, специфичность связывания получают с помощью анализа флуоресцентно–активированной сортировки клеток (FACS).

Термин «перекрестная реактивность» относится к связыванию фрагмента антигена, описанного в настоящем документе, с одной и той же молекулой–мишенью у человека, обезьяны и/или мыши (мыши или крысы). Таким образом, «перекрестную реактивность» следует понимать как межвидовую реактивность к одной и той же молекуле X, экспрессируемой у разных видов, но не к молекуле, отличной от X. Межвидовая специфичность моноклонального антитела, распознающего, например, человеческий CTLA–4, к обезьяньему и/или мышиному (мышиному или крысиному) CTLA–4 могут быть определены, например, с помощью анализа FACS.

Используемый в настоящем описании термин «субъект» включает любое животное, включая человека или отличное от него. Термин «животное, отличное от человека» включает в себя всех позвоночных животных, например млекопитающих и не млекопитающих, таких как приматы, отличные от человека, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, цыплята, земноводные, рептилии и т. д. За исключением оговоренных случаев, термин «пациент» или «субъект» используются взаимозаменяемо.

Термины «лечение» и «терапевтический метод» относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим/превентивным мерам. Те, кто нуждается в лечении, могут включать людей, уже имеющих определенное медицинское расстройство, а также тех, кто может в конечном итоге приобрести расстройство.

Термины «консервативные модификации», то есть модификации нуклеотидной и аминокислотной последовательности, которые не оказывают существенного влияния или не изменяют характеристики связывания антитела, кодируемого нуклеотидной

последовательностью или содержащего аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации последовательности включают замены, добавления и делеции нуклеотидов и аминокислот. Модификации могут быть введены в последовательность стандартными методами, известными в данной области, такими как сайт–направленный мутагенез и ПЦР–опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замены включают замены, в которых аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, были определены в данной области. Эти семейства включают аминокислоты с боковыми цепями со свойствами оснований (например, лизин, аргинин, гистидин), боковыми цепями со свойствами кислот (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), с незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), с неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета–разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Экспериментальные методы в следующих примерах являются обычными методами, если не указано иное.

Примеры

Пример 1: Приготовления материалов исследования

1. Экспрессия и очистка растворимого CTLA–4

Гены внеклеточного домена (ECD) человека и мыши CTLA–4 с гексагистидином (6xHis) – или Fc–меткой клонировали в экспрессирующий вектор, а затем использовали для трансфекции клеток Expi293 с использованием набора Expi293 Expression System Kit. Клетки культивировали в среде Expi293 Expression Medium, на платформе орбитального шейкера, вращающейся со скоростью 135 об/мин, в инкубаторе при 37 °C, содержащем увлажненную атмосферу с 8% CO_2. Собранный супернатант использовали для очистки белка. Белки, меченные гексагистидином, очищали с использованием колонки Ni–NTA, а белки, меченные Fc, очищали с использованием колонки с протеином A.

2. Разработка клеточных линий

Ген полноразмерного человеческого CTLA–4 был клонирован в экспрессирующий вектор для получения стабильной клеточной линии. Вкратце, клетки 293F объемом 30 мл при плотности 1×10^6/мл трансфецировали 30 мкг ДНК с использованием реагента Plasfect. Трансфецированные клетки помещали в инкубатор при 37 °C, 8% CO_2 и скорости встряхивания 100 об/мин. Через 24–48 часов после трансфекции использовали бластицидин в конечной концентрации 4–6 мкг/мл для отбора стабильных клонов. Отобранные клоны тестировали с помощью FACS с использованием антитела против CTLA–4.

Чтобы получить клетки, экспрессирующие CTLA–4 яванской макаки, ген полноразмерного CTLA–4 яванской макаки клонировали в экспрессирующий вектор для

получения пула клеток. Вкратце, объем 30 мл клеток 293F при плотности 1×10^6/мл трансфецировали 30 мкг ДНК с использованием реагента Plasfect Reagent (Life Technology). Трансфецированные клетки помещали в инкубатор при 37 °C, 8% CO_2 и скорости встряхивания 100 об/мин. Через 24 часа после трансфекции использовали бластидин в конечной концентрации 4 мкг/мл для отбора пула клеток. Отобранные клеточные пулы тестировали с помощью FACS с использованием антитела против CTLA–4.

Пример 2: Генерация гибридомных антител

1. Иммунизация

Человеческий CTLA–4 и мышиный CTLA–4 использовали для иммунизации крыс SD.

Конкретно, трех SD–крыс иммунизировали 30 мкг/животного ECD–белка CTLA–4 человека и мыши в адъюванте. Адъювант включал Titer–Max, Adju–Phos и CpG–ODN. Крысам вводили инъекцию один раз в неделю как в лапку, так и подкожно. Титр антител в сыворотке измеряли с помощью ИФА каждый месяц. Когда уровень антител был достаточно высоким, крыса с наивысшим титром получала конечное бустерное введение с помощью белка ECD CTLA–4 человека и мыши в фосфатно–солевом буфере Дульбекко (DPBS) без адъюванта.Через несколько дней проводили забор селезенки и лимфатических узлов у крысы, и лимфоциты отделяли для слияния.

2. Слияние клеток

Слияние клеток проводили следующим образом. Клетки миеломы SP2/0 оттаивали за неделю до слияния и разделяли по 1:2 каждый день до дня, предшествующего слиянию, чтобы сохранить их в логарифмическом росте. В–лимфоциты, выделенные из лимфатического узла иммунизированных клеток крысы и миеломы, соответственно, обрабатывали трипсином и реакцию останавливали добавлением FBS. В–лимфоциты объединяли с клетками миеломы в соотношении 1:1. Затем смесь клеток промывали и ресуспендировали при 2×10^6 клеток/мл в растворе для электрического слияния, содержащем 0,3 М сахарозы, 0,1 мМ ацетата магния и 0,1 мМ ацетата кальция. Электрическое слияние клеток проводили с использованием Btx Electro Cell Manipulator (Ecm 2001) в соответствии со стандартным протоколом производителя. Затем суспензию клеток из камеры слияния немедленно переносили в стерильную колбу, содержащую свежую среду, и инкубировали в течение 2 часов в инкубаторе при 37 °C. Суспензию клеток затем смешивали и переносили в 60 96–луночных планшетов (1×10^4 клеток/лунку). 96–луночные планшеты культивировали при 37 °C и 5% CO_2 с периодическим мониторингом. Когда клоны были достаточно большими (через 7–10 дней), удаляли 180 мкл/лунку супернатанта и затем добавляли 200 мкл свежей среды на лунку. Через 72 часа 100 мкл супернатанта переносили из культуральных планшетов в 96–луночные аналитические планшеты для скрининга.

3. Скрининг гибридом

Большое количество гибридомных клонов подвергали скринингу на связывание с

белками CTLA–4 человека, мыши и обезьяны, а также сконструированными клетками, экспрессирующими CTLA–4 человека. После того, как специфическая связывающая и блокирующая активность CTLA–4 были проверены посредством первого и второго скрининга, положительные линии гибридомы субклонировали в 96–луночные планшеты с использованием лимитированного разведения. Планшеты культивировали при 37 °C, 5% CO_2 до тех пор, пока положительные клоны не были подвергнуты дополнительному скринингу на предмет конкуренции с лигандами CD80 и CD86, связывающимися с CTLA–4. Культуральные супернатанты отобранных положительных клонов собирали для очистки антител и дальнейшей характеристики. Ведущие кандидаты были отобраны для секвенирования VH и VL.

4. Определение VH и VL последовательностей из гибридомы

Гены VH и VL антител отобранных гибридомных клонов выделяли с помощью ОТ–ПЦР или 5'–RACE. Конкретно, общую РНК выделяли из клеток гибридомы с использованием RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). кДНК первой цепи была подвергнута обратной транскрипции с использованием oligo dT. Гены VH и VL антител амплифицировали из кДНК с использованием вырожденного 3'–праймера константной области и наборов вырожденных 5'–праймеров. Вырожденные 5'–праймеры были сконструированы на основе области, кодирующей сигнальную последовательность в 5'–области вариабельных последовательностей Ig. Затем продукт ПЦР лигировали в вектор pMD18–T и 10 мкл продукта лигирования трансформировали в компетентные клетки Top10. Трансформированные клетки высевали на чашки 2xYT с карбенициллином и инкубировали в течение ночи при 37 °C. Случайно отбирали 15 положительных колоний для секвенирования ДНК с помощью Biosune. Альтернативно, 5'–RACE использовали для идентификации последовательностей VH и VL отобранных гибридомных клонов. Сначала РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с использованием набора 5'–RACE (Takara–28001488), а затем проводили ПЦР с использованием 3'–вырожденных праймеров и 3'–адаптерных праймеров (ExTaq: Takara–RR001B). Фрагменты ПЦР вводили в вектор pMD18–T (Takara–D101C) и отправляли для секвенирования (Biosune, Shanghai).

Пример 3: Получение и характеристика химерных антител

1. Производство химерных антител

Выведенные аминокислотные последовательности VH и VL перечислены в Таблице 3.

Подчеркнутые последовательности представляют собой CDR, определенные системой картирования по Kabat. Вариабельные области этих крысиных антител были слиты с константной областью человеческого антитела, и химерные антитела были экспрессированы из клеток Expi293 и очищены с использованием хроматографии с протеином A.

Таблица 3. Последовательность вариабельной области антитела против CTLA–4 крысы

Клон ID		SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
W3162–1.	VH	1	EEQLVESGGGLVQPGKSLKLSCSASGFTFR**SSAMH**WIRQPPGKGLDWVA**FISSGGDTAYADAVKG**RFIVSRDNAENTLFLQLNSLKSEDTAIYYCVR**MERIPT**WGQGVMVTVSS
101.2	VL	8	DIVLTQSPVLAVSLGQRATISC**RASQSVSISSINLIH**WYQQRPGQQ PKLLIY**RTSNLAS**GIPARFSGSGSGTDFTLSIDPVQADDVADYYC
W3162–1.145.10	VH	2	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASDLTFS**NYDMA**WVRQTPTKG LEWVA**SISPNGGNTYYRDSVKG**RFTVSRDNAKNSLYLQMDSLRS EDTATYYCAR**HLWFAY**WGQGTLVTVSS
	VL	9	DIQMTQSPSSMSASLGDRVTISC**QASQDIGSNLI**WFQQKPGKSPRP MIY**YATHLAD**GVPSRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDVADYHC**L**
W3162–1.	VH	3	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTYHTIT**SGYDWT**WIRKFPGNQ MEWMG**YISYSGNTNYNPSLKS**RISITRDTSKNQFFLHLNSVTSED TATYYCAS**MMVPHYYVMDA**WGQGASVTVSS
146.19	VL	10	DVVLTQTPPTSSATIGQSVSISC**RSSQSLLNSDGNTYLY**WYLQRPS QSPQLLIY**LVSKLGS**GVPNRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDLGL
W3162–1.	VH	4	EVQLQQSGPEAGRPGSSVKISCKASGYTFT**NYFMN**WVKQSPGQG LEWIG**RVDPENGRADYAEKFKK**KATLTADTTSNTAYIHLSSLTS EDTATYFCAR**RAMDNYGFAY**WGQGTLVTVSS
154.8	VL	11	EIMLTQSPTIMAASLGEKITITC**SANSSLSYMY**WFQQKSGASPKLW VH**GTSNLAS**GVPDRFSGSGSGTSYYLTINTMEAEDAATYFC**H**

2. Характеристика химерных антител

2.1 Антитела, связанные с CTLA–4 человека, обезьяны и мыши (ИФА, FACS и SPR). Химерные антитела с вариабельной областью крысы и константной областью человека экспрессировали из клеток млекопитающих и очищали с использованием аффинной хроматографии с протеином А.

Антитела тестировали на ИФА со связыванием CTLA–4. Как показано на Фигуре 1, 2 и 3, все четыре антитела, связывающиеся с CTLA–4 человека и обезьяны, с EC_{50} сопоставимы с ипилимумабом (WBP316–BMK1), но только одно антитело W3162–1.146.19 также связsdfkbcm с мышиным CTLA–4 с EC_{50} 0,01 нМ. Чтобы подтвердить, что антитела способны связываться с CTLA–4 на клеточной поверхности, в анализах FACS использовали линию клеток, экспрессирующую CTLA–4. Эти антитела также связывались с CTLA–4 на клеточной поверхности (Фигура 4) с EC_{50} в диапазоне от 1,14 нМ до 9,42 нМ. W3162–1.146.19 связывается с CTLA–4 на клеточной поверхности с EC_{50} 3,25 нМ и

W3162–1.154.8 связывается с CTLA–4 на клеточной поверхности с EC_{50} 1,26 нМ.

Кинетику связывания четырех антител измеряли с использованием SPR. Антитела захватывали на иммобилизованном козьем антителе пртив человеческого Fc, а затем в различных концентрациях упорядоченно вводили ECD CTLA–4 человека. Сенсограммы для эталонного канала и буферного канала вычитали из тестовых сенсограмм. Данные были использованы для анализа связывания 1:1. Как показано на Фигуре 5 и в Таблице 4, все четыре антитела связывались с ECD–доменом человеческого CTLA–4 с более высокой аффинностью, чем ипилимумаб (WBP316–BMK1), с диапазоном KD от 2,08 E–09 нМ до 6,80E–11 нМ.

Таблица 4. Кинетика связывания антител с ECD CTLA–4 человека

Антитело	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
W3162–1.101.2 xAb.IgG1	6.95E+05	6.97E–05	1.00E–10
W3162–1.145.10 xAb.IgG1	7.93E+06	1.65E–02	2.08E–09
W3162–1.146.19 xAb.IgG1	7.09E+05	1.48E–04	2.08E–10
W3162–1.154.8 xAb.IgG1	1.85E+06	1.25E–04	6.80E–11
WBP316–BMK1	9.42E+05	3.46E–03	3.68E–09

2.2 Конкуренция с лигандами химерных антител

Было обнаружено, что CTLA–4 связывается как с CD80, так и с CD86 с аффинностю в 20–50 раз более высокой, чем с CD28 [Krummel 1996]. Следовательно, антитела против CTLA–4 были протестированы на предмет их способности конкурировать со связыванием CD80 и CD86 с CTLA–4. В качестве конкурентных анализов использовали как ИФА, так и FACS. В конкурентном анализе на основе ИФА человеческие CTLA–4 наносили на планшеты, и антитела, смешанные с биотинилированными лигандами, добавляли в планшет. Связанные лиганды были обнаружены с помощью HRP конъюгированного стрептавидина. Как показано на Фигуре 6a и 6b, все четыре антитела конкурировали с лигандами CD80 (B7–1, L1) и CD86 (B7–2, L2) в связывании CTLA–4, и три из них, за исключением W3162–1.101.2, имели сравнимую EC_{50} с ипилимумабом (WBP316–BMK1). В анализе FACS смесь антител и биотинилированного человеческого CTLA–4 добавляли к клеткам, экспрессирующим CD80 или CD86, и связанный человеческий CTLA–4 детектировали с помощью PE–конъюгированного стрептавидина. Как показано на Фигуре 7a (верхняя панель) и 7b (нижняя панель), все четыре антитела могут эффективно блокировать связывание CTLA–4 с клетками, экспрессирующими лиганд. Три антитела, за исключением W3162–1.154.8, могли полностью блокировать связывание CTLA–4 на клетках с CD80, тогда как ипилимумаб WBP316–BMK мог только частично блокировать это связывание даже при 200 нМ, самой высокой использованной концентрации (Фигура 7a). В анализе FACS блокирования связывания CTLA–4 на клетках с CD86 (Фигура 7b) все 4 антитела могли

полностью блокировать связывание CTLA–4 на клетках с CD86, тогда как ипилимумаб мог лишь частично блокировать это связывание даже при 200 нМ, самой высокой использованной концентрации. Кинетика W3162–1.101.2 выглядела иначе: блокирование было менее эффективным, чем у ипилимумаба, при низкой концентрации, и более эффективным, чем ипилимумаба, в высокой концентрации. Другие три антитела были более эффективными, чем ипилимумаб, в блокировании CTLA–4 при всех протестированных концентрациях.

2.3 Функция в анализе SEB химерных антител

Функцию антител против CTLA–4 с различной концентрацией 1,34 нМ, 3,35 нМ, 8,71 нМ, 21,4 нМ, 53,6 нМ, 134 нМ тестировали в модифицированном анализе стимулирования Т–клеток (анализ SEB). Стафилококковый энтеротоксин B (SEB) использовали в качестве стимулятора активации Т–клеток человека, причем CTLA–4 был назван важным игроком. Активацию Т–клеток измеряли секрецией IL–2. Как показано на Фигуре 8, все четыре антитела стимулируют секрецию IL–2 в зависимости от дозы, сравнимой или превосходящей дозу Ипилимумаба.

Пример 4: Характеристика гуманизированного антитела

1. Гуманизация

Подход «наилучшего соответствия» использовали для гуманизации легких и тяжелых цепей антител.

Три антитела против CTLA–4 (кроме W3162–1.101.2 из–за его относительно низкой активности связывания в ИФА и FACS) были отобраны для гуманизации с использованием техники трансплантации CDR. CDR (подчеркнуты в Таблице 5) и FR вариабельные области антител определяли с использованием системы Kabat. В соответствии с гомологией последовательности и структурным сходством область гена крысы FR1–3 была заменена гуманизированной областью FR1–3, тогда как область FR4 гена крысы была заменена гуманизированной областью FR4, полученной из генов JH и JK, которые имели наиболее сходные структуры. Горячие точки пост–трансляционных модификаций (PTM) вариабельных областей были модифицированы для снижения риска PTM. После проверки последовательности матрицы и оптимизации кодонов вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи синтезировали и клонировали в экспрессирующий вектор, а затем использовали для экспрессии гуманизированных антител. Гуманизированные антитела очищали с использованием хроматографии на протеине A, а кинетику связывания CTLA–4 человека, обезьяны и мыши измеряли с использованием метода SPR.

Таблица 5. Последовательность вариабельной области гуманизированных антител против CTLA–4

Клон ID		SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
W3162–1.1 45.10–z7	VH	5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASDLTFSNYDMAWVRQAPG KGLEWVASISPSGGNTYYRDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM

			NSLRAEDTAVYYCARHLWFAYWGQGTLVTVSS
	VL	12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIGSNLIWFQQKPGK AP KPMIYYATHLADGVPSRFSGSRSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CLQYKQVPPTFGGGTKVEIK
W3162.1.1 4 6.19–z12	VH	6	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVTYHTITSGYDWTWIRKPP GK GMEWIGYISYSGNTNYNPSLKSRVTISRDTSKNQFFLKLSSVT ADTAVYYCASMMVPHYYVMDAWGQGTLVTVSS
	VL	13	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLLNSDGNTYLYWYL QKPGQSPQLLIYLVSKLGSGVPNRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCVQGTHDPWTFGGGTKVEIK
W3162.1.1 5 4.8–z35	VH	7	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYFMNWVRQA P GQGLEWMGRVDPEQGRADYAEKFKKRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARRAMDNYGFAYWGQGTLVTVSS
	VL	14	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSANSALSYMYWYQQKPDQS P KLWVHGTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATY YCHHWSNTQWTFGGGTKVEIK

Таблица 6. Вариабельная область гуманизированных антител против CTLA–4

Клон ID		SEQ ID NO	Последовательность ДНК
W3162–1.145	VH	42	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGAGGACTGGTGCAA CCTGGCGGAAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCCAGCGACC TGACCTTCAGCAACTACGACATGGCCTGGGTGAGACAGGC CCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCCAGCATCAGCCCC AGCGGCGGCAACACCTACTACAGGGACAGCGTGAAGGGC AGGTTCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGT ACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCG TGTACTACTGCGCCAGGCACCTGTGGTTCGCCTACTGGGG CCAGGGCACACTGGTGACCGTGAGCAGC
.10–z7	VL	45	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCA GCGTGGGCGATAGGGTGACCATCACCTGCCAGGCCAGCCA GGACATCGGCAGCAACCTGATCTGGTTCCAGCAGAAGCCC GGCAAGGCCCCCAAGCCTATGATCTACTACGCCACCCACC TGGCCGATGGCGTGCCTAGCAGATTCAGCGGCAGCAGAAG CGGCACCGACTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCC GAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGTACAAGCAGT ACCCCAGAACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCA AG
W3162–1.146 . 19–z12	VH	43	CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGACCCGGACTGGTGAAG CCCTCCGAGACCCTGAGCCTGACCTGCAGCGTGACCTACC ACACCATCACCAGCGGCTACGACTGGACCTGGATCAGAAA GCCCCCCGGCAAAGGCATGGAGTGGATCGGCTACATCAGC TACAGCGGCAACACCAACTACAACCCCAGCCTGAAGAGC AGGGTGACCATCAGCAGGGACACCAGCAAGAACCAGTTC TTCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCCGCCGATACCGCCG

	VL	46	TGTACTACTGCGCCAGCATGATGGTGCCCCACTACTACGT GATGGACGCCTGGGGACAGGGCACCCTGGTGACAGTGAG CAGCGACATCGTGATGACCCAGACCCCCCTGAGCCTGAGC GTGACACCTGGACAGCCCGCCAGCATCAGCTGCAGGTCCA GCCAGAGCCTGCTGAACAGCGACGGCAACACCTACCTGTA CTGGTACCTGCAGAAGCCTGGCCAGAGCCCCCAGCTGCTG ATCTACCTGGTGTCCAAGCTGGGCAGCGGCGTGCCTAACA GGTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTCACCCTGAA GATCAGCAGGGTGGAGGCCGAGGATGTGGGCGTGTACTA CTGCGTGCAGGGCACCCACGATCCTTGGACCTTCGGCGGC GGAACCAAGGTGGAGATCAAG
W3162–1.154.8–z35	VH	44	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAGAAG CCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGC TACACCTTCACCAACTACTTCATGAACTGGGTGAGGCAGG CCCCTGGACAAGGCCTGGAGTGGATGGGCAGAGTGGATCC CGAGCAGGGCAGGGCCGACTACGCCGAGAAGTTCAAGAA GAGGGTGACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCGC CTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGCGCCAGGAGAGCCATGGACAACTACGGC TTCGCCTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTGACCGTGAGCA GC
	VL	47	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGACTTCCAGAGCGTGA CCCCCAAGGAGAAGGTGACCATCACCTGCAGCGCCAACA GCGCCCTGAGCTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCCGA CCAGAGCCCCAAGCTGTGGGTGCACGGCACCAGCAATCTG GCCAGCGGCGTGCCTAGCAGATTTAGCGGCAGCGGCAGCG GCACCGATTTCACCCTGACCATCAACAGCCTGGAGGCCGA GGACGCCGCTACCTACTACTGCCACCACTGGAGCAACACC CAGTGGACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGGA GATCAAG

2. Характеристика гуманизированных антител

2.1 Антитела, связанные с CTLA–4 человека, обезьяны и мыши

2.1.1 CTLA–4–связывающий ИФА

Гуманизированные антитела были экспрессированы из клеток млекопитающих и очищены с использованием аффинной хроматографии с протеином А. Ипилимумаб был из коммерческого источника. Антитело контроля изотипа, ECD CTLA–4 человека с различными метками (hFc или 6xHis) и мышиный CTLA–4.ECD–hFc были приготовлены WuXi Biologics. Мышиный CTLA–4.ECD–6xHis и CTLA–4.ECD–6xHis яванской макаки были приобретены у Sino Biological. HRP–конъюгированное козье антитело против человеческого Fc IgG было приобретен у Bethyl (Cat: A80–304P).

ИФА использовали для тестирования связывания антител против человеческого CTLA–4 с белком CTLA–4 человека, мыши и яванской макаки. 96–луночный планшет был покрыт человеческим CTLA–4.ECD–6xHis (1,0 мкг/мл), CTLA–4.ECD–6xHis яванской макаки (0,5 мкг/мл) или мышиным CTLA–4.ECD–6xHis (0,5 мкг/мл) при 4 °C в течение 16–20 часов. После 1 часа блокирования 2% BSA в DBPS добавляли в планшеты тестирующие антитела, а также антитела положительного и отрицательного контроля и

инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Связывание антител с планшетами детектировали с помощью HRP–конъюгированного козьего антитела против человеческого IgG (разведение 1:5000) с 1–часовой инкубацией. Цвет проявился путем распределения 100 мкл субстрата TMB в течение 8 минут, а затем реакцию останавливали 100 мкл 2H HCl. Поглощение при 450 нМ измеряли с использованием спектрофотометра на микропланшете.

Как показано на Фигуре 9, два антитела W3162–1.146.19–z12–IgGk и W3162–1.154.8–z35–IgGk связывались с CTLA–4 человека с EC_{50} 0,03 нМ и 0,04 нМ, что, соответственно, немного выше, чем EC_{50} Ипилимумаба (WBP316–BMK1) 0,01 нМ (Фигура 9A). Два антитела также связывались с CTLA–4 обезьяны с EC_{50} 0,05 нМ (Фигура 9B), но только W3162–1.146.19–z12–IgGk связывались с мышиным CTLA–4 с EC_{50} 0,19 нМ. Ни W3162–1.154.8–z35–IgGk, ни ипилимумаб не связывались с мышиным CTLA–4 (Фигура 9C).

2.1.2 CTLA–4–связывающий FACS

Клеточная линия, экспрессирующая человеческий CTLA4, 293F, была разработана WuXi Biologics. PE–конъюгированное козье антитело против Fc–фрагмента IgG человека было приобретено у Jackson (номер по каталогу 109–115–098). В каждую лунку 96–луночного планшета добавляли 1×10^5 клеток на лунку и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 4 минут при 4 °C перед удалением супернатанта. Последовательные разведения тестируемых антител, положительные и отрицательные контроли добавляли к ресуспендированным клеткам и инкубировали в течение 1 часа при 4 °C. Клетки дважды промывали 200 мкл DPBS, содержащим 1% BSA. PE–конъюгированное козье антитело против человеческого IgG (1:100), разведенное в DPBS, содержащем 1% BSA, добавляли к клеткам и инкубировали при 4 °C в течение 1 часа. Дополнительные стадии промывки проводили два раза с 200 мкл DPBS, содержащим 1% BSA, с последующим центрифугированием при 1500 оборотах в минуту в течение 4 минут при 4 °C. Наконец, клетки ресуспендировали в 100 мкл DPBS, содержащим 1% BSA, и значения флуоресценции измеряли с помощью проточной цитометрии и анализировали с помощью FlowJo.

Эти антитела были также способны связываться с человеческим CTLA–4 на клеточной поверхности в анализе FACS. Как показано на Фигуре 11 (Фигура 10a и фигура 10b), W3162–1.146.19–z12–IgGk, W3162–1.154.8–z35–IgGk и ипилимумаб имели слегка различающиеся значения EC_{50}, равные 1,58 нМ, 0,66 нМ и 0,83 нМ, соответственно.

2.2 Кинетика связывания этих антител

2.2.1. Кинетику связывания этих антител измеряли с использованием SPR.

Эксперимент заключался в измерении константны ассоциации (ka) и константны диссоциации (kd) антител к ECD CTLA–4 на основе технологии SPR. Следовательно, определяли константу аффинности (KD).

Biacore T200, сенсорную микросхему серии S CM5, набор для соединения амина и 10 × HBS–EP были приобретены у GE Healthcare. Козье антитело против Fc IgG человека

было приобретено в Jackson ImmunoResearch Lab (номер по каталогу 109–005–098). На стадии иммобилизации активационный буфер готовили путем смешивания 400 мМ EDC и 100 мМ NHS непосредственно перед инъекцией. Сенсорный чип CM5 активировался в течение 420с с помощью буфера активации. Затем 30 мкг/мл козьего антитела против Fcγ IgG человека в 10 мМ NaAc (pH 4,5) инъецировали в каналы Fc1–Fc4 в течение 200 с при скорости потока 5 мкл/мин. Чип дезактивировали 1 М этаноламин–HCl (GE). Затем антитела захватывали на чипе. Вкратце, 4 мкг/мл антител в рабочем буфере (HBS–EP +) инъецировали индивидуально в канал Fc3 в течение 30 с при скорости потока 10 мкл/мин. Восемь различных концентраций (20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ, 0,625 нМ, 0,3125 нМ и 0,15625 нМ) аналита CTLA–4 (WBP316.hCTLA–4.ECD–6xHis) и пустой рабочий буфер вводили последовательно в каналы Fc1–Fc4 при скорости потока 30 мкл/мин для фазы ассоциации 120 с, за которой следует фаза диссоциации 2400 с. Регенерирующий буфер (10 мМ глицин, pH 1,5) вводили со скоростью 10 мкл/мин в течение 30 с после каждой фазы диссоциации.

Кинетику связывания этих антител измеряли с помощью SPR. Антитела были захвачены на иммобилизованном антителе против человеческого Fc, и CTLA–4–ECD в различных концентрациях вводили упорядоченно. Сенсограммы для эталонного канала и канала буфера вычитали из тестовых сенсограмм. Данные были использованы для анализа связывания 1:1 на CTLA–4.ECD–6xHis человека, обезьяны и мыши. Как показано в Таблице 7, гуманизированные антитела W3162–1.146.19–Z12, W145 и W3162–1.154.8–Z35 связывались с доменом CTLA–4–ECD человека с аффинностью 0,477 нМ, 1,84 нМ и 0,0968 нМ, соответственно. По сравнению с антителами крысы гуманизированные антитела имели сравнимую аффинность. W3162–1.146.19–Z12 и W3162–1.154.8–Z35 имеют значительно более высокую аффинность, чем у ипилимумаба (KD=3,68 нМ). Антитело W3162–1.146.19–Z12 также может связываться с мышиным CTLA–4, и его аффинность до и после гуманизации показана в Таблице 9. После гуманизации его аффинность 1,39 нМ немного ниже, чем аффинность 0,906 нМ его родительского антитела.

Аффинность связывания W3162–1.146.19–Z12, W3162–1.145.10–z7 и W3162–1.154.8–Z35 с CTLA–4–ECD яванской макаки составила 1,92 нМ, 0,598 нМ, 0,131 нМ, соответственно (Таблица 8).

Таблица 7. Кинетика связывания антител на CTLA–4 ECD человека

Антитела	**ka (1/Mc)**	**kd (1/c)**	**KD (M)**
W3162–1.146.19–z12–uAb.IgG1K	2.06E+05	9.82E–05	4.77E–10
W3162–1.146.19 xAb.IgG1	7.09E+05	1.48E–04	2.08E–10
W3162_1.145.10–z7–uAb.IgG1K	7.37E+06	1.35E–02	1.84E–09
W3162–1.145.10 xAb.IgG1	7.93E+06	1.65E–02	2.08E–09
W3162_1.154.8–z35–uAb.IgG1K	1.23E+06	1.19E–04	9.68E–11
W3162–1.154.8 xAb.IgG1	1.85E+06	1.25E–04	6.80E–11
Ипилимумаб	9.42E+05	3.46E–03	3.68E–09

Таблица 8. Кинетика связывания антител на CTLA–4 ECD обезьяны

Антитела	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
W3162–1.146.19–z12–uAb.IgG1K	1.73E+05	3.31E–04	1.92E–09
W3162–1.146.19 xAb.IgG1	2.91E+05	1.07E–04	3.69E–10
W3162_1.145.10–z7–uAb.IgG1K	4.52E+06	2.71E–03	5.98E–10
W3162–1.145.10 xAb.IgG1	1.06E+07	3.77E–03	3.55E–10
W3162_1.154.8–z35–uAb.IgG1K	9.32E+05	1.22E–04	1.31E–10
W3162–1.154.8 xAb.IgG1	1.25E+06	1.09E–04	8.72E–11

Таблица 9. Кинетика связывания антител на CTLA–4 ECD мыши

Антитела	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
W3162–1.146.19–z8–uAb.IgG1K	1.72E+05	2.39E–04	1.39E–09
W3162–1.146.19 xAb.IgG1	2.51E+05	2.28E–04	9.06E–10

2.2.2 Тест на аффинность с помощью FACS

Конъюгированное с FITC козье антитело против человеческого Fc IgG было приобретено в Jackson Immunoresearch Lab (номер по каталогу 109–095–098), и BD CantoII использовали для этого анализа. Вкратце, клетки HEK293, экспрессирующие человеческий CTLA–4, переносили в 96–луночные планшеты с U–образным дном (BD) при плотности 5×10^4 клеток/лунку. Тестируемые антитела последовательно разводили в 1: 2 в PBS с 1% BSA и инкубировали с клетками при 4°C в течение 1 часа. После центрифугирования при 1500 об/мин в течение 4 минут супернатант отбрасывали. Вторичное антитело, представляющее собой конъюгированное с FITC козье антитело против человеческого Fc IgG (3,2 FITC на IgG, Jackson Immunoresearch Lab), добавляли для повторного суспендирования клеток до конечной концентрации 14 мкг/мл и инкубировали при 4°C в темноте в течение 30 минут. Затем клетки один раз промывали и повторно суспендировали в PBS с 1% BSA и анализировали с помощью проточной цитометрии (BD). Интенсивность флуоресценции была преобразована в связанные молекулы /на клетку на основе количественных гранул (QuantumTM MESF Kits, Bangs Laboratories). KD рассчитывали с использованием Graphpad Prism5.

Аффинность связывания гуманизированных антител с клеточной поверхностью CTLA–4 измеряли методом проточной цитометрии, модифицированный по методу Бенедикта [Benedict 1997 JIM]. После измерения флуоресценции антител, связывающихся с клетками CHO, экспрессирующими CTLA–4, связанное антитело и свободное антитело анализировали и подставляли в уравнение, как показано на Фигуре 5. На основании данных и формулы рассчитанная константа аффинности KD показана в Таблице 10. Гуманизированные антитела W3162–1.146.19–Z12 и W3162–1.154.8–Z35 имели высокую аффинность при 5,05 и 0,35 нМ, соответственно, тогда как аффинность ипилимумаба составляет 0,97 нМ.

Таблица 10. Тест на аффинность с помощью FACS

Образец	KD (M)	Bmax	R2
W3162–1.146.19–z12–IgG1K	5.0E–09	1.2E–10	0.99
W3162–1.154.8–z35–IgG1K	3.5E–10	1.2E–10	0.98

Ипилимумаб	9.7E–10	7.2E–11	0.99

2.3 Конкуренция с лигандами

Чтобы проверить, сохраняют ли гуманизированные антитела способность блокировать связывание CTLA–4 на CD80 и CD86, в анализе конкуренции использовали как ИФА, так и FACS. Два CTLA–4–лиганда CD80 и CD86, были приобретены у Sino Biological (номера по каталогу 10698–H08H и 10699–H08H). Биотинилированное антитело против His–метки было приобретено у Genscript (номер по каталогу A00613). HRP конъюгированный стрептавидин был приобретен у Invitrogen (номер по каталогу SNN1004).

2.3.1 Конкурентный анализ на основе ИФА

ИФА использовали для проверки того, могут ли антитела ингибировать связывание человеческого CTLA–4 с его лигандами, человеческими CD80 и CD86. На планшеты наносили покрытие в виде человеческого CTLA–4.ECD.hFc (0,5 мкг/мл) при 4 °C в течение 16–20 часов. После 1–часового блокирования с использованием 2% BSA в DBPS тестируемые антитела, а также антитела положительного и отрицательного контроля предварительно смешивали с 0,25 мкг/мл CD80–6xHis или CD86–6xHis, а затем добавляли в планшеты и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратного промывания PBS, содержащим 0,05% Tween 20, биотинилированное антитело против His–метки разбавляли 1:2000 и добавляли. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Связанные лиганды детектировали с помощью конъюгированного с HRP стрептавидина (1: 20000). Цвет проявляли путем распределения 100 мкл субстрата TMB в течение 8 минут, а затем реакцию останавливали 100 мкл 2H HCl. Поглощение при 450 нМ измеряли с использованием спектрофотометра на микропланшете.

Как показано на Фигуре 11, W3162–1.146.19–z12–IgGk и W3162–1.154.8–z35–IgGk имели эффект, аналогичный ипилимумабу, в блокировании связывания лигандов с покрытием CTLA–4, с IC50 0,87 нМ, 0,63 нМ и 0,40. нМ для CD80 и 0,71 нМ, 0,50 нМ и 0,42 нМ для CD86.

2.3.2 Анализ FACS

Чтобы проверить, могут ли антитела блокировать связывание CTLA–4 с CD80 и CD86 на клеточной поверхности, использовали FACS для проверки этой конкуренции. Клеточные линии CHO, экспрессирующие CD80 и CD86, были разработаны WuXi Biologics. Биотинилированный CTLA–4.ECD.hFc был сделан WuXi Biologics. PE–конъюгированный стрептавидин был приобретен у eBioscience (номер по каталогу 12–4317).

Клетки, экспрессирующие CD80 или CD86, добавляли в каждую лунку 96–луночного планшета при 1×10^5 на лунку и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 4 минут при 4 °C перед удалением супернатанта. Последовательные разведения тестируемых антител, положительного и отрицательного контролей смешивали с биотинилированным человеческим CTLA4.ECD.hFc. Из–за разной плотности лигандов на

клеточной поверхности 0,02 мкг/мл hCTLA–4.ECD.hFc–биотин использовали для клеток с CD80 человека и 0,08 мкг/мл hCTLA–4.ECD.hFc–биотин для клеток с CD86 человека. Затем смеси антитела и CTLA–4 добавляли к клеткам и инкубировали в течение 1 часа при 4 °C. Клетки промывали два раза с помощью 200 мкл буфера FACS (DPBS содержащего 1% BSA). Стрептавидин PE, разведенный от 1 до 333 раз в буфере FACS, добавляли к клеткам и инкубировали при 4 °C в течение 1 часа. Дополнительные стадии промывки проводили два раза с 200 мкл FACS буфера с последующим центрифугированием при 1500 оборотах в минуту в течение 4 минут при 4 °C. Наконец, клетки ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS и значения флуоресценции измеряли с помощью проточной цитометрии и анализировали с помощью FlowJo.

Результаты представлены на Фигуре 12. Два гуманизированных антитела могут более эффективно блокировать связывание CTLA–4/лиганд, чем ипилимумаб. При самой высокой использованной концентрации ипилимумаб блокировал только 32% связывание CTLA–4 с CD80 и 40% связывания CTLA–4 с CD86. Для сравнения, антитело W3162–1.146.19–Z12 блокировало 71% связывания CTLA–4 на CD80 и 73% связывания CTLA–4 на CD86, а антитело W3162–1.154.8–Z35 блокировало 89% связывания CTLA–4 на CD80 и 98% связывания CTLA–4 на CD86. IC50 ипилимумаба, W3162–1.146.19–Z12 и W3162–1.154.8–Z35, направленных против CD80, составляли 3,23, 6,60 и 0,07 нМ, соответственно. IC_{50} ипилимумаба, W3162–1.146.19–Z12 и W3162–1.154.8–Z35, направленных против CD86, составляли 2,52, 5,15 и 0,28 нМ, соответственно.

2.4 Высвобождение цитокинов PBMC, стимулированных SEB

Тестировали, могут ли антитела против CTLA4 усиливать высвобождение цитокинов из PBMC человека после стимулирования SEB (из Второго военного медицинского университета). Была получена периферическая кровь от здоровых доноров, и клетки были выделены с помощью центрифугирования в градиенте плотности Ficoll GE Healthcare, 17–1440–02. После удаления плавучего слоя тромбоциты удаляли несколькими промывками со средой. В каждую лунку 96–луночного планшета добавляли 1×10^5 клеток PBMC человека. Последовательные разведения тестируемых антител, положительные и отрицательных контролей смешивали с SEB (10 нг/мл), а затем добавляют к осажденным клеткам и инкубировали в течение 3 дней при 37 °C. Супернатанты собирали для измерения концентрации человеческого IL–2.

Для теста на человеческий IL–2 планшеты предварительно покрывали 1 мкг/мл человеческого антитела к IL–2 (R & D System MAB602) при 4 ° C в течение 16–20 часов. После 1 часа блокировки с помощью 2% BSA (BovoGen) в DBPS, супернатанты, содержащие IL–2, добавляли в планшеты и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После трехкратной промывки PBST (содержащего 0,05% Tween 20) биотинилированное человеческое антитело к IL–2 (система R & D, BAF202) разбавляли и добавляли в концентрации 0,5 г/мл. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Связанное биотинилированное антитело детектировали с помощью HRP–конъюгированного стрептавидина 1:20000 (Invitrogen, SNN1004). После 1 часа

инкубации цвет проявился путем дозирования 100 мкл субстрата TMB, а затем реакцию останавливали 100 мкл 2 M HCl. Поглощение при 450 нм и 540 нм измеряли с использованием спектрофотометра для микропланшетов.

В клеточном анализе тестировали гуманизированные антитела (8,60 нМ, 21,4 нМ , 53,6 нМ , 134 нМ , 335 нМ) на предмет того, могут ли они усиливать стимулируемые суперантигеном SEB PBMC человека. После 3–дневной стимуляции IL–2 из PBMC измеряли с помощью ИФА. По сравнению с антителом контроля изотипа оба гуманизированных антитела (W3162–1.146.19–Z12, W3162–1.154.8–Z35) и ипилимумаб могут усиливать высвобождение IL–2 из PBMC зависимым от дозы образом (Фигура 13).

2.5 Термостабильность

Стабильность полученных антител тестировали при различной температуре. Вкратце, 100 мкл каждого образца антитела добавляли пипеткой в отдельные пробирки, и образцы инкубировали при 4 °C или 37 °C в течение 20 часов, или 45 °C или 50 °C в течение 2 часов. Затем образцы центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 минут. Наблюдали, что эти образцы обнаруживают возможное осаждение, и образцы были проанализированы с помощью SEC–HPLC на чистоту и время элюирования.

Профиль SEC W3162–1.146.19–Z12 при различных условиях показан на Фигуре 14 a–d. Ни время разбавления, ни процентное содержание основного пика (от 92,39% до 92,48%) при условиях высокой температуры существенно не изменялись по сравнению с аналогичными параметрами при низкой температуре (92,24%). Профиль SEC W3162–1.154.8–Z35 при различных условиях высокой температуры показан на Фигуре 14 a–h. Ни время разбавления, ни процент основного пика (97,14% – 97,17%) существенно не изменились по сравнению с низкой температурой (96,84%). Этот набор данных указывает на то, что антитела были стабильны в испытанных условиях высокой температуры.

2.6 Неспецифическое связывание

Оба теста, FACS и ИФА, были использованы для проверки, связываются ли антитела с другими мишенями. В анализе FACS различные клеточные линии (Ramos, Raji, MDA–MB–453, BT474, Jurkat, Hut78, A431, A204, CaLu–6, A375, HepG2, BxPC–3, HT29, FaDu, 293F, CHO–K1) доводили до $1x10^5$ клеток на лунку. Тестируемые антитела и антитела контроля изотипа разводили до 10 мкг/мл в PBS, содержащем 1% BSA, и инкубировали с клетками при 4°C в течение 1 часа. Клетки дважды промывали 180 мкл PBS, содержащим 1% BSA. PE– конъюгированное козье антитело против человеческого Fc–фрагмента IgG (Jackson, номер по каталогу 109–115–098) разбавляли до конечной концентрации 5 мкг/мл в PBS с 1% BSA, затем добавляли для повторного суспендирования клеток и инкубировали при 4°C в темноте в течение 30 мин. Дополнительные стадии промывки проводили дважды с помощью 180 мкл PBS, содержащего 1% BSA с последующим центрифугированием при 1500 оборотах в минуту в течение 4 минут при 4 °C. Наконец, клетки ресуспендировали в 100 мкл PBS, содержащего 1% BSA, и значения флуоресценции измеряли с помощью проточной цитометрии (BD CantoII) и анализировали с помощью FlowJo.

В анализе ИФА тестируемые антитела, антитела контроля изотипа тестировали на связывание с 10 различными антигенами–мишенями, включая фактор VIII, FGFR–ECD, PD–1, CTLA–4.ECD, VEGF, HER3. ECD, OX40.ECD, 4–1BB.ECD, CD22.ECD, CD3e.ECD. 96–луночный планшет покрывали отдельными антигенами (2 мкг/мл) при 4 °C в течение ночи. После 1 часа блокировки с 2% BSA в PBS, промывали планшет 3 раза с помощью 300 мкл PBST. Тестируемые антитела, а также антитела контроля изотипа разбавляли до 10 мкг/мл в PBS, содержащем 2% BSA, затем добавляли в планшет и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После трехкратного промывания 300 мкл PBST в планшет добавляли конъюгированное с HRP козье антитело против человеческого IgG (1:5000 разведенное в 2% BSA) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Наконец, планшеты шесть раз промывали 300 мкл PBST. Цвет проявляли путем дозирования 100 мкл субстрата TMB в течение 12 мин, а затем реакцию останавливали 100 мкл 2 M HCl. Поглощение при 450 нМ измеряли с использованием спектрофотометра для микропланшетов.

В дополнение к CTLA–4 были использованы другие нерелевантные белки, чтобы проверить, способны ли антитела W3162–1.146.19–Z12 и W3162–1.154.8–Z35 связываться с этими антигенами. Как показано на Фигуре 16, среди панели антигенов только CTLA–4 был обнаружен двумя антителами. Другие антигены не генерировали сигнал в этом анализе ИФА. Напротив, антитело против OX40 действительно связывалось с OX40, предполагая, что этот антиген был нанесен на планшет.

Специфичность двух антител также тестировали на панели с различными клеточными линиями в анализе FACS. Антитела не генерировали детектируемый сигнал ни к одной из этих клеточных линий (данные не показаны).

2.7 Эффективность in vivo

Поскольку антитело W3162–1.146.19–Z12 перекрестно реагирует как на человеческий, так и на мышиный CTLA–4, противоопухолевая эффективность этого антитела была протестирована на моделях сингенных мышей. Мышиная опухолевая клеточная линия CT26 была использована для создания мышиной модели с ксенотрансплантатом для тестирования антитела против CTLA–4 W3162–1.146.19–Z12.В качестве положительного контроля использовали антитело против мышиного CTLA–4, приобретенное у BioXCell (BioXCell–BE0131). Опухолевые клетки поддерживали in vitro в виде монослойной культуры в среде RPMI–1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37 °C в атмосфере 5% CO_2. Опухолевые клетки обычно пересевали дважды в неделю после открепления клеток обработкой трипсином–ЭДТА. Клетки, выращенные до фазы экспоненциального роста, собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли. Самки мышей Balb/C были приобретены у Beijing Vital River Laboratory Animal Co., Ltd. Мыши в возрасте 6–8 недель с весом приблизительно 18–22 г были использованы для исследования. Каждую мышь подкожно инокулировали в правые подмышечные впадины 1×10^5 опухолевых клеток в 0,1 мл PBS, смешанного с 50 мкл матригеля. Когда средний

объем опухоли достигает 60–80 мм^3, животных случайным образом группировали. Антитела против CTLA–4 и контроль изотипа использовали для обработки: внутривенно инъецировали мышам два раза в неделю. Размер опухоли измеряли два раза в неделю штангенциркулем, а объем опухоли рассчитывали по формуле a × b2 × π/6, где a – длина, b – ширина (a> b).

Когда средний объем опухоли достигал приблизительно 70 мм^3, W3162–1.146.19–Z12 (1 мг/кг, 3 мг/кг, 10 мг/кd) и контрольные антитела (10 мг/кг) вводили два раза в неделю в течение двух недель. Животных наблюдали на предмет роста опухоли и массы тела с течением времени. Как показано на Фигуре 15, W3162–1.146.19–Z12 значительно ингибирует рост опухоли в зависимости от дозы. При дозе 1 мг/кг W3162–1.146.19–Z12 ингибировал рост опухоли по сравнению с контрольной группой. При дозе 3 мг/кг W3162–1.146.19–Z12 ингибировал объем опухоли до 160 мм^3 в день 19, тогда как 10 мг/кг W3162–1.146.19–Z12 вызывал регрессию опухоли в конце периода исследования.

2.8 Эпитопное картирование

Сканирование аланином было использовано для идентификации эпитопа антител CTLA–4. В этом эксперименте остатки аланина на hCTLA4 мутировали в остатки глицина, а все остальные остатки мутировали в аланины. Для каждого остатка внеклеточного домена человеческого CTLA4 (ECD) были сделаны точечные аминокислотные замены были сделаны с использованием двух последовательных стадий ПЦР. В качестве матрицы была использована плазмида pcDNA3.3–hCTLA4_ECD.His, которая кодирует ECD человеческого CTLA4 и C–концевую His–метку, и набор мутагенных праймеров был использован для первой стадии ПЦР с использованием набора для набора мульти–сайт–направленного мутагенеза QuikChange lightning (Agilent technologies, Пало–Альто, Калифорния). Эндонуклеазу Dpn I использовали для расщепления родительской матрицы после реакции синтеза мутантной цепи. Во второй стадии ПЦР линейная экспрессирующая кассета ДНК, состоящая из промотора CMV, мутированного ECD CTLA4, His–tag и сайта полиаденилирования тимидинкиназы (TK) вируса простого герпеса, была амплифицирована и транзиторно экспрессирована в клетках HEK293F (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Кроме того, были сконструированы три плазмидных вектора для тестирования эпитопа гликанов: pcDNA3.3–hCTLA4_ECD.His (N113Q), pcDNA3.3–hCTLA4_ECD.His (N145Q) и pcDNA3.3–hCTLA4_ECD.His (N113Q, N145Q). Эти три мутеина были транзиторно экспрессированы в клетках HEK293F (Life Technologies, Gaithersburg, MD).

Чтобы проверить, как мутации влияют на связывание антител, был проведен ИФА с захватом. Вкратце, ипилимумаб, моноклональные антитела W3162–1.146.19–z12 и W3162–1.154.8–z35 (2 мкг/мл) были захвачены с помощью планшетов, предварительно покрытых 2 мкг/мл козьим антитело против человеческого IgG Fc (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). После взаимодействия с супернатантом, который содержит количественные мутеины CTLA4, конъюгированное с HRP антитело против His (1:5000 ; Rockland Immunochemicals, Pottstown, PA) добавляли в качестве детектирующего

антитела. TMB использовали в качестве субстрата HRP. Абсорбция была нормализована в соответствии со средним уровнем контрольных мутантов. После установки дополнительного отсечения для изменения кратности связывания (<0,55) были определены окончательно определенные остатки эпитопа.

Определяли активности связывания антител W3162–1.146.19–z12, W3162–1.154.8–z35 и ипилимумаба (W316–BMK1) с CTLA4 человека, было обнаружено, что все три антитела связываются с CTLA4 человека (Фигура 17).

Протестированные точечные мутации, которые влияют на связывание антител с CTLA–4, показаны в Таблице 11. Согласно кристаллическим структурам CTLA4 человека (код PDB 1AH1), некоторые аминокислотные остатки (например, Met38, Val40, Tyr60, Val71, Val73, Arg75, Val84, Cys85, Cys129, Ile149) вряд ли могли напрямую связываться с какими–либо антителами. Наблюдаемое снижение связывания, скорее всего, является результатом нестабильности или даже коллапса структуры CTLA4 после аланиновых замен. Окончательно определенные остатки эпитопа перечислены в Таблице 12 и отмечены на Фигуре 18.

Как показано на Фигуре 18D и E, эпитопы ипилимумаба и W3162–1.146.19–z12 перекрывают друг друга, за исключением нескольких остатков, таких как N145 и P138. Для сравнения, W3162–1.15 4.8–z35 связан с меньшей областью CTLA–4 (Фигура 18F), чем два других антитела. Все три антитела связаны с лиганд–связывающим доменом CTLA–4 (Фигура 18 A и B), которые включают мотив MYPPPY.

Перекрывающиеся эпитопы ипилимумаба и W3162–1.146.19–z12 не объясняют уникального межвидового связывания антитела W3162–1.146.19–z12. Поскольку мутация N145 на CTLA–4 влияла только на связывание W3162–1.146.19–z12 с CTLA–4, не затрагивая другие два антитела, мы далее рассматривали сайты N–гликозилирования как потенциальные эпитопы. Влияние мутаций в двух сайтах гликозилирования CTLA4 на активность связывания антител показано на Фигуре 17. Связывание ипилимумаба или W3162–1.154.8–z35 с мутированным CTLA–4 существенно не изменялось (Фигура17 A и C). Напротив, связывание W3162–1.146.19–z12 с мутированным CTLA–4 N145Q значительно уменьшилось, тогда как связывание этого антитела с CTLA–4 с N113Q не изменилось. Этот набор данных указывает на то, что гликан (Фигура 18E) на N145 CTLA–4 может быть эпитопом W3162–1.146.19–z12. Остаток N145 является консервативным в CTLA–4 яванской макаки и мыши.

Описание настоящего изобретения было сделано выше с помощью примеров. Однако специалистам в данной области техники понятно, что настоящее изобретение не ограничивается примерами. Изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без отклонения от его сущности или существенных характеристик. Таким образом, объем изобретения обозначен прилагаемой формулой изобретения, а не предшествующим описанием, и все изменения, которые входят в значение и диапазон эквивалентности формулы изобретения, предназначены для включения в нее.

Таблица 11. Влияние точечных мутаций CTLA4 на связывание антител

Ипилимумаб				**W3162–1,146,19–z12–IgG1K**				**W3162–1,154,8–z35–IgG1K**			
CTLA4 Остатокние	**положе**	**Кратное изменение**	**SD**	**CTLA4 остаток**	**положение**	**Кратное изменение**	**SD**	**CTLA4 Остаток**	**положение**	**Кратное изменение**	**SD**
P	136	0,191	0,00	G	146	0,166	0,00	**P**	136	0,155	0,00
V	40	0,201	0,00	V	40	0,181	0,00	V	40	0,187	0,00
G	146	0,208	0,00	C	129	0,182	0,00	G	146	0,201	0,00
C	129	0,210	0,00	M	38	0,182	0,00	C	129	0,211	0,00
C	85	0,229	0,00	I	149	0,183	0,00	C	85	0,218	0,00
V	84	0,233	0,01	V	81	0,191	0,01	V	84	0,232	0,00
Y	60	0,236	0,04	N*	145	0,196	0,00	M	38	0,238	0,00
M	134	0,240	0,01	Q	76	0,200	0,00	Y	60	0,240	0,07
I	149	0,244	0,01	V	84	0,201	0,00	R	75	0,298	0,00
M	38	0,253	0,02	Y	60	0,223	0,05	I	149	0,319	0,00
V	81	0,268	0,03	**P**	136	0,231	0,00	P	138	0,339	0,00
R	75	0,273	0,00	**M**	134	0,254	0,00	V	71	0,347	0,10
I	143	0,278	0,00	I	128	0,256	0,00	K	65	0,351	0,00
I	128	0,286	0,00	C	85	0,256	0,03	T	88	0,433	0,02
V	71	0,335	0,08	I	143	0,264	0,00	**M**	134	0,455	0,00
K	130	0,364	0,00	R	75	0,278	0,00	E	83	0,479	0,00
G	142	0,369	0,01	V	73	0,338	0,01	V	73	0,498	0,01
G	144	0,375	0,00	V	71	0,343	0,06	R	70	0,515	0,04
T	88	0,377	0,06	K	130	0,348	0,00	A	66	0,519	0,02
R	70	0,378	0,10	A	66	0,395	0,02	L	74	0,520	0,00
V	73	0,380	0,00	L	74	0,398	0,00	**P**	137	0,534	0,00
A	66	0,395	0,03	L	126	0,398	0,02	G	64	0,543	0,10
E	83	0,396	0,02	E	83	0,405	0,01	H	39	0,549	0,01
A	86	0,401	0,03	T	88	0,423	0,06				
P	137	0,407	0,00	P	137	0,425	0,00				
L	74	0,410	0,00	Y	139	0,431	0,00				
L	126	0,412	0,01	T	82	0,436	0,00				
H	39	0,420	0,01	P	138	0,445	0,00				
Y	139	0,434	0,00	E	132	0,457	0,01				
T	82	0,450	0,01	G	144	0,478	0,00				
E	132	0,470	0,04	T	147	0,486	0,03				
M	90	0,479	0,02	L	141	0,486	0,00				
T	147	0,508	0,03	M	90	0,492	0,00				
Y	127	0,508	0,01	Q	148	0,500	0,02				
Q	80	0,517	0,02	V	131	0,504	0,02				
L	141	0,518	0,03	R	70	0,507	0,08				
E	68	0,529	0,00	Y	89	0,512	0,05				
Q	148	0,532	0,04	Y	127	0,529	0,02				
G	125	0,537	0,02	H	39	0,529	0,00				
Q	76	0,545	0,00	T	72	0,541	0,01				
G	92	0,548	0,00	G	142	0,543	0,02				
				C	103	0,544	0,03				

Кратное изменение связывания является относительно связывания нескольких молчащих аланиновых замен.

Таблица 12. Идентифицированные эпитопы трех антител

Ипилимумаб			W3162–1.146.19–z12–IgG1K			W3162–1.154.8–z35–IgG1K		
CTLA	положен	распол	CTLA4	положен	распол	CTLA4	положе	расположк

4 остаток	ие	ожение	остаток	ие	ожение	остаток	ние	ение
H	39	A	H	39	A	H	39	A
A	66	BC петля	A	66	BC петля	G	64	BC петля
E	68	C	R	70	C	K	65	BC петля
R	70	C	T	72	C	A	66	BC петля
L	74	C	L	74	C	R	70	C
Q	76	C	Q	76	C	L	74	C
Q	80	C'	V	81	C'	E	83	C'
V	81	C'	T	82	C'	T	88	C'
T	82	C'	E	83	C'	M	134	F
E	83	C'	T	88	C'	P	136	FG петля
A	86	C'	M	90	C'C" петля	P	137	FG петля
T	88	C'	G	92	C"	P	138	FG петля
M	90	C'C" петля	L	126	F	G	146	G
G	92	C"	I	128	F			
G	125	F	K	130	F			
L	126	F	E	132	F			
I	128	F	M	134	F			
K	130	F	P	136	FG петля			
E	132	F	P	137	FG петля			
M	134	F	P	138	FG петля			
P	136	FG петля	Y	139	FG петля			
P	137	FG петля	L	141	G			
Y	139	FG петля	G	142	G			
L	141	G	I	143	G			
G	142	G	G	144	G			
I	143	G	N	145	G			
G	144	G	G	146	G			
G	146	G	Q	148	G			
Q	148	G						

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с CTLA–4 человека, обезьяны и мыши.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело ингибирует связывание CTLA–4 с CD80 или CD86.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, где эпитоп связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента содержит N145 или полисахарид на N145 CTLA–4.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связываются с CTLA–4 человека, обезьяны, где эпитоп связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента содержит P138 CTLA–4.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент

a) связываются с CTLA–4 человека с KD 4,77E–10 M или менее; и

b) связываются с CTLA–4 мыши с KD 1,39E–09 M или менее.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент проявляют по меньшей мере одно из следующих свойств:

a) связываются с CTLA–4 человека с KD в диапазоне от 4,77E–10 M до 2,08E–10 M и с CTLA–4 мыши с KD в диапазоне от 1,39E–09 M до 9,06E–10 M;

b) усиливает высвобождение интерлейкина–2 из стимулированных PBMC.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 80, 90 или 95% гомологична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14,

где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, и 14, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 80, 90 или 95% гомологична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 5, 6 и 7; и

b) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 80, 90 или 95% гомологична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7; и

b) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14,

где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие область, определяющую комплементарность, (CDR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15–41, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA– 4.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3,

где последовательность CDR3 вариабельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 16, 17 и 18, и их консервативных модификаций,

где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CTLA–4.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.12, где последовательность CDR3 вариабельной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, 20, 21 и 22 и их консервативных модификаций.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.12 или 13, где последовательность CDR2 вариабельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 и 28, и их консервативных модификаций.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.12–14, где последовательность CDR2 вариабельной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 29, 30, 31, и 32, и их консервативных модификаций.

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.12–15, где последовательность CDR1 вариабельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 33, 34, 35, и 36, и их консервативных модификаций.

17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.12–16, где

последовательность CDR1 вариабельной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40 и 41, и их консервативных модификаций.

18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1–17, где антитело является химерным, гуманизированным, полностью человеческим или крысиным антителом.

19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1–4 или 7–18, где антитело проявляет по меньшей мере одно из следующих свойств:

a) связывается с CTLA–4 человека с KD 2,08E–09 M или менее и/или с CTLA–4 мыши с KD 1,39E–09 M или менее;

b) усиливает высвобождение интерлейкина–2 из стимулированных PBMC.

20. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1–19.

21. Клонирующий или экспрессирующий вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.20.

22. Клетка–хозяин, содержащая один или более клонирующих или экспрессирующих векторов по п.21.

23. Способ получения антитела по любому из пп.1–19, включающий культивирование клетки–хозяина по п.22 и выделение антитела.

24. Способ по п.23, где антитело получают путем иммунизации крысы SD с использованием внеклеточного домена CTLA–4 человека и внеклеточного домена CTLA–4 мыши.

25. Трансгенная крыса, содержащая трансгены тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина человека, где крыса экспрессирует антитело по любому из пп.1–19.

26. Гибридома, полученная от крысы по п.25, где гибридома продуцирует антитело по любому из пп.1–19.

27. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1–19 и один или более из фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества, разбавителя и носителя.

28. Иммуноконъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1–19, связанный с терапевтическим агентом.

29. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуноконъюгат по п.28 и один или более из фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества, разбавителя и носителя.

30. Способ получения антитела против CTLA–4 или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий:

(a) обеспечение:

(i) последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела, содержащей последовательность CDR1, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 33–36, последовательность CDR2, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23–28;

и последовательность CDR3, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15–18; и/или

(ii) последовательности вариабельной области легкой цепи антитела, содержащей последовательность CDR1, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37–41, последовательность CDR2, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29–32, и последовательность CDR3, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19–22; и

(b) экспрессию измененной последовательности антитела в виде белка.

31. Способ модулирования иммунного ответа у пациента, включающий введение пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1–19.

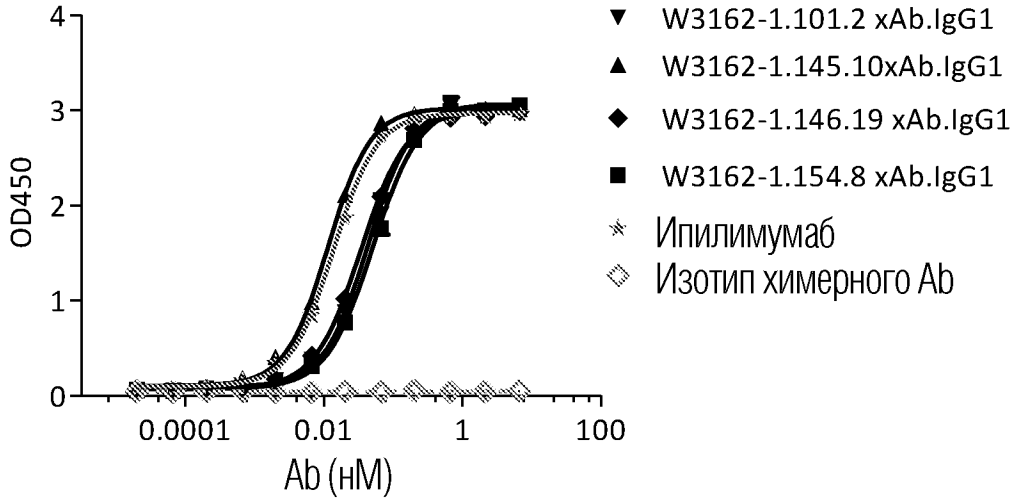
32. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1–19 в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики иммунного расстройства или злокачественного новообразования.

33. Способ ингибирования роста опухолевых клеток у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1–19 для ингибирования роста опухолевых клеток.

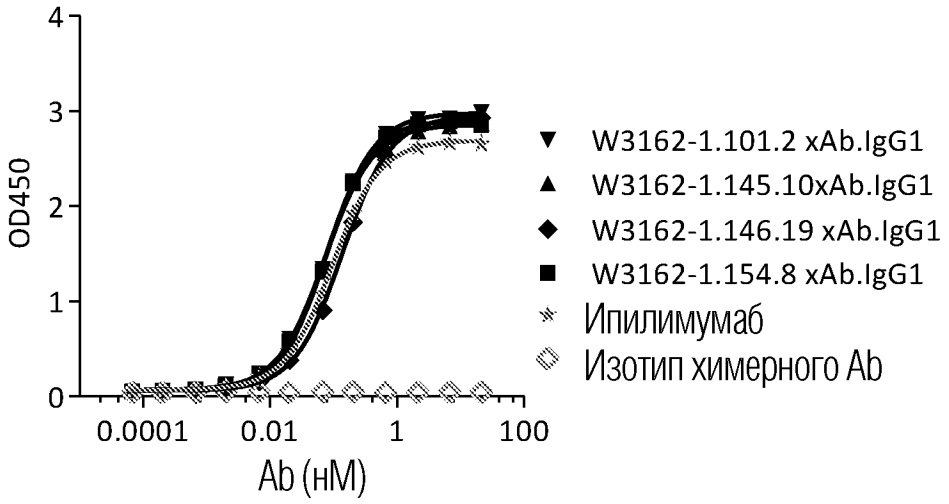
34. Способ по п.33, где опухолевые клетки представляют собой клетки злокачественного новообразования, выбранного из группы, состоящей из меланомы, рака почки, рака простаты, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака легкого, рака кости, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы или шеи, кожной или внутриглазной злокачественной меланомы, рака матки, рака яичников и рака прямой кишки.

35. Способ по любому из пп.33 или 34, где антитело представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело, антитело человека или антитело крысы.

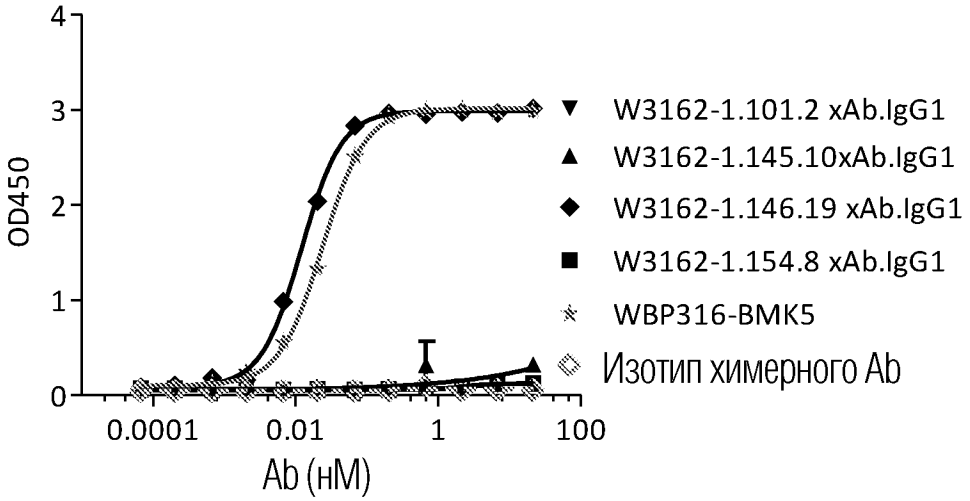
По доверенности


4
3
2
1
0
OD450
0.0001
0.01
1
100
Ab (нМ)
W3162-1.101.2 xAb.IgG1
W3162-1.145.10xAb.IgG1
W3162-1.146.19 xAb.IgG1
W3162-1.154.8 xAb.IgG1
Ипилимумаб
Изотип химерного Ab

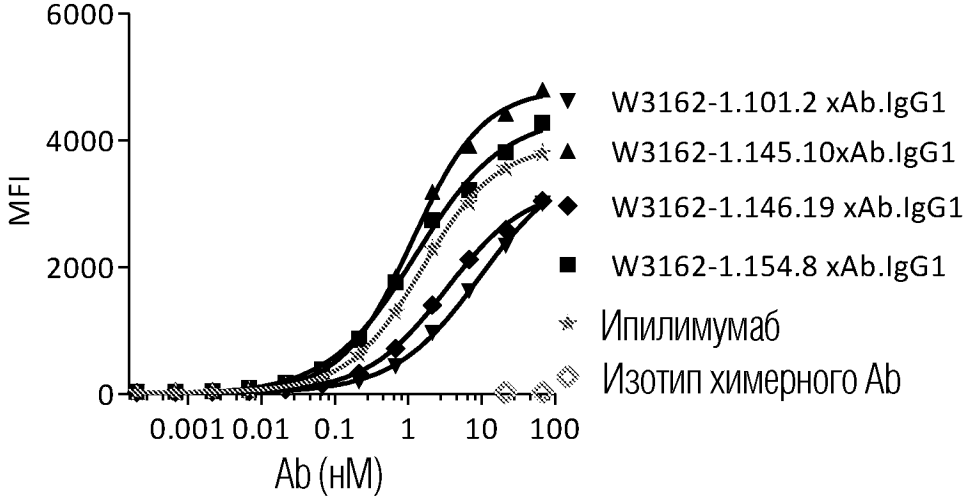
ФИГ. 1


4
3
2
1
0
OD450
0.0001
0.01
1
100
Ab (нМ)
W3162-1.101.2 xAb.IgG1
W3162-1.145.10xAb.IgG1
W3162-1.146.19 xAb.IgG1
W3162-1.154.8 xAb.IgG1
Ипилимумаб
Изотип химерного Ab

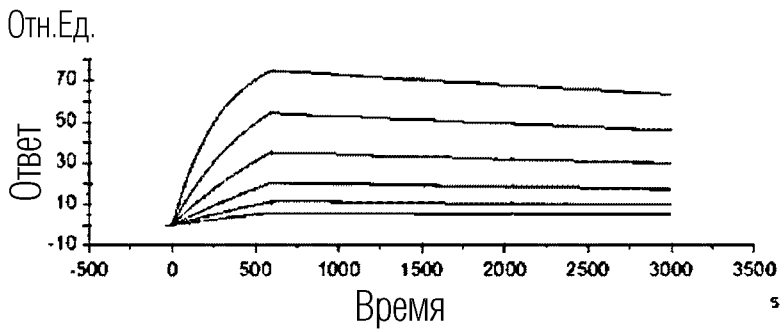
ФИГ. 2


4
3
2
1
0
OD450
0.0001
0.01
1
100
Ab (нМ)
W3162-1.101.2 xAb.IgG1
W3162-1.145.10xAb.IgG1
W3162-1.146.19 xAb.IgG1
W3162-1.154.8 xAb.IgG1
WBP316-BMK5
Изотип химерного Ab

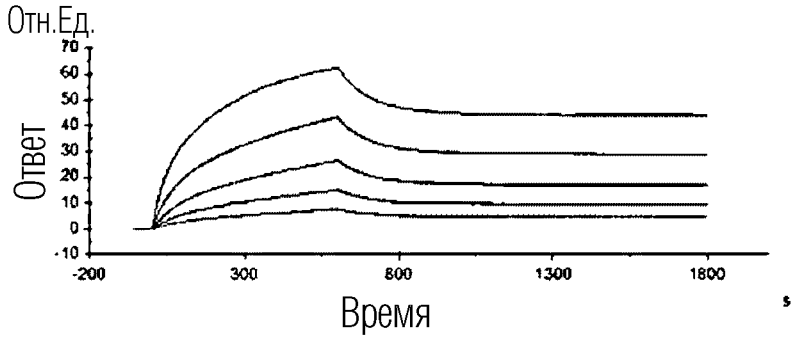
ФИГ. 3


6000
4000
2000
0
MFI
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Ab (нМ)
W3162-1.101.2 xAb.IgG1
W3162-1.145.10xAb.IgG1
W3162-1.146.19 xAb.IgG1
W3162-1.154.8 xAb.IgG1
Ипилимумаб
Изотип химерного Ab

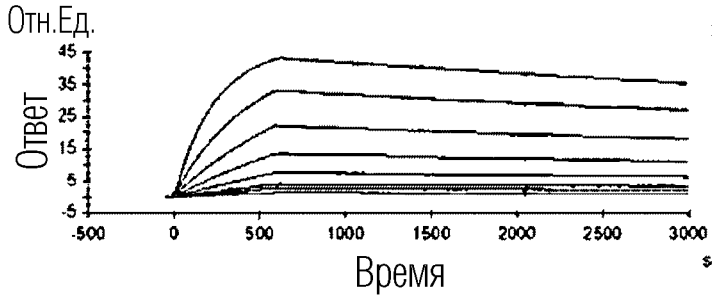
ФИГ. 4



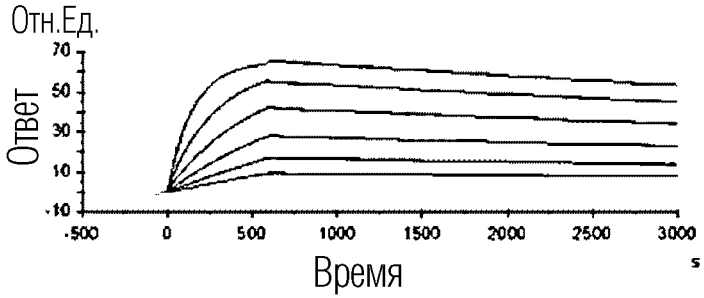
W3162-1.101.2xAb.IgG1



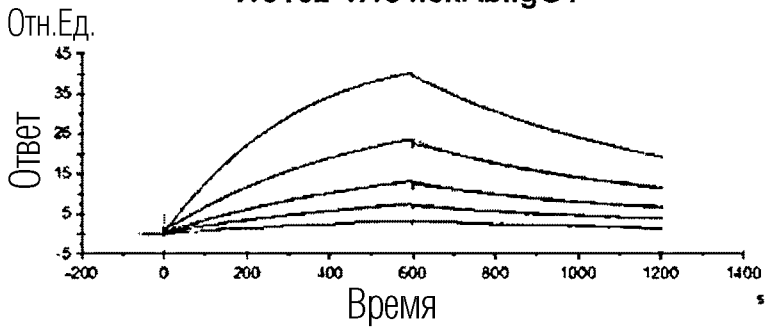
W3162-1.145.10xAb.IgG1



W3162-146.19xAb.IgG1



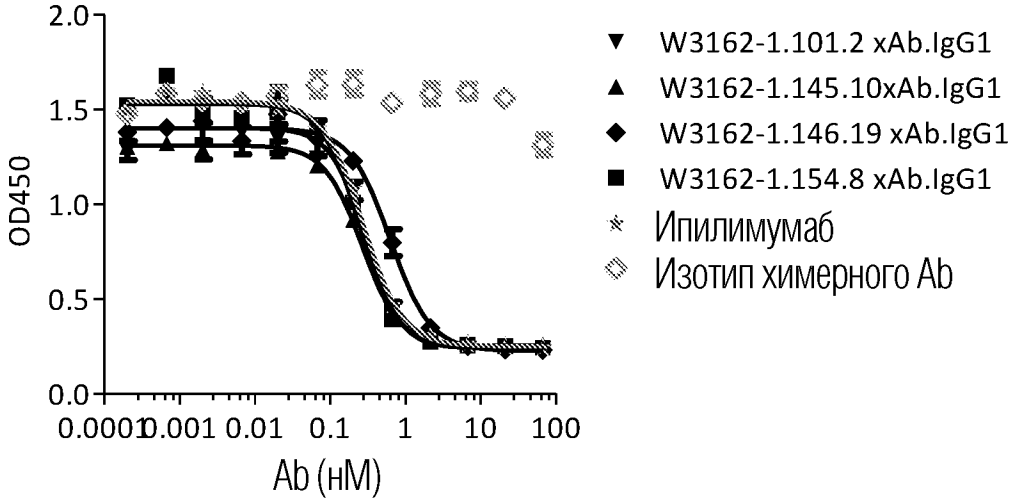
W3162-1.154.8xAb.IgG1



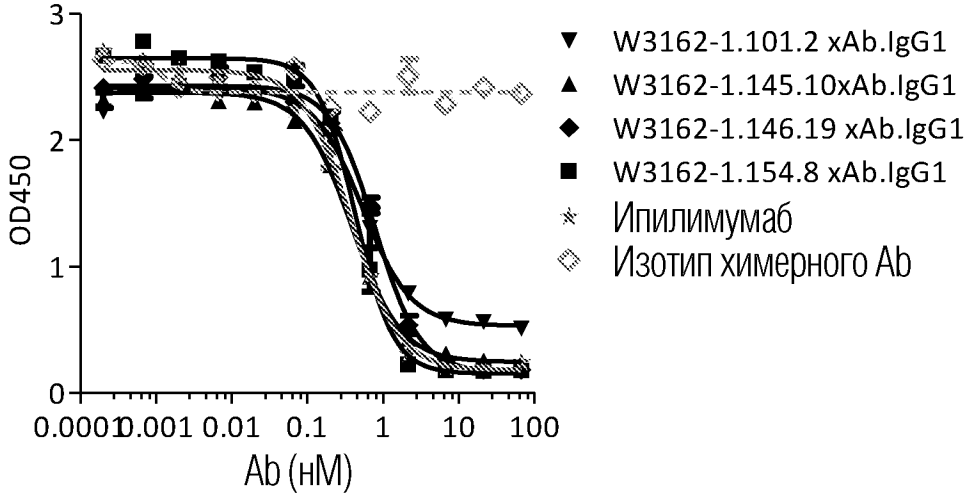
W316.hBMK1.IgG1(Ипилимумаб)

ФИГ. 5

(A) CD80

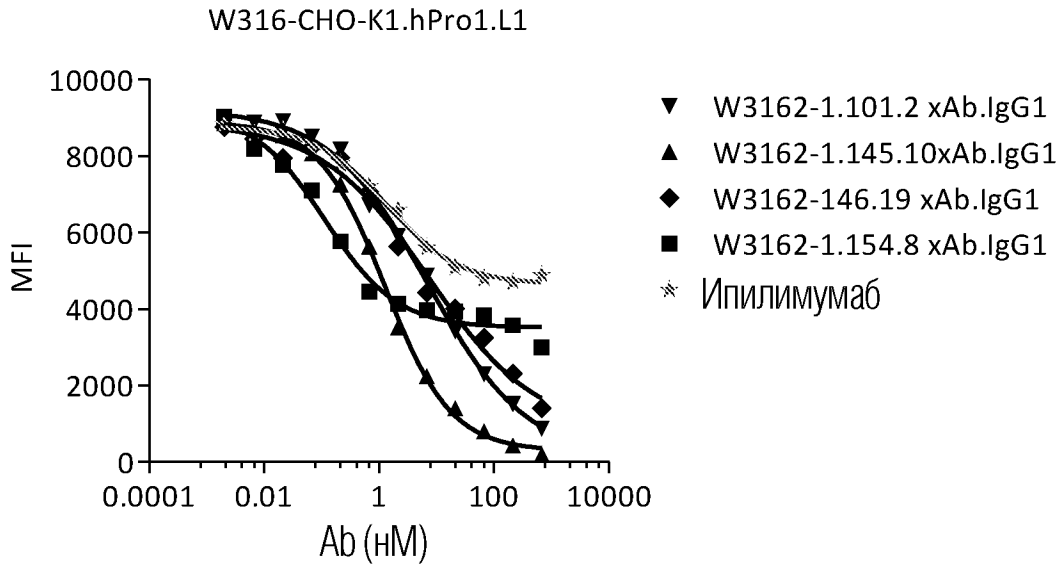


(B) CD86

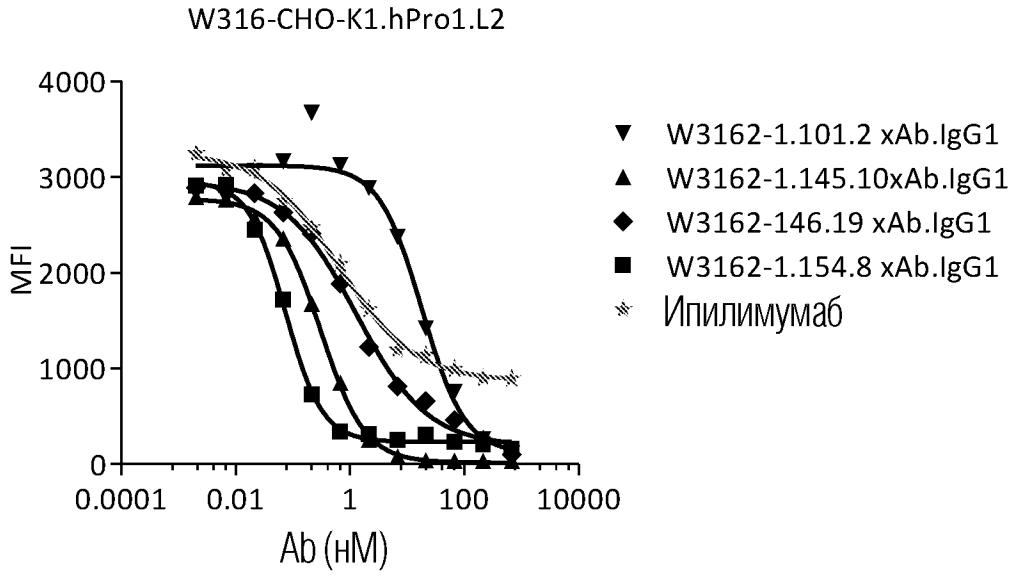


ФИГ. 6

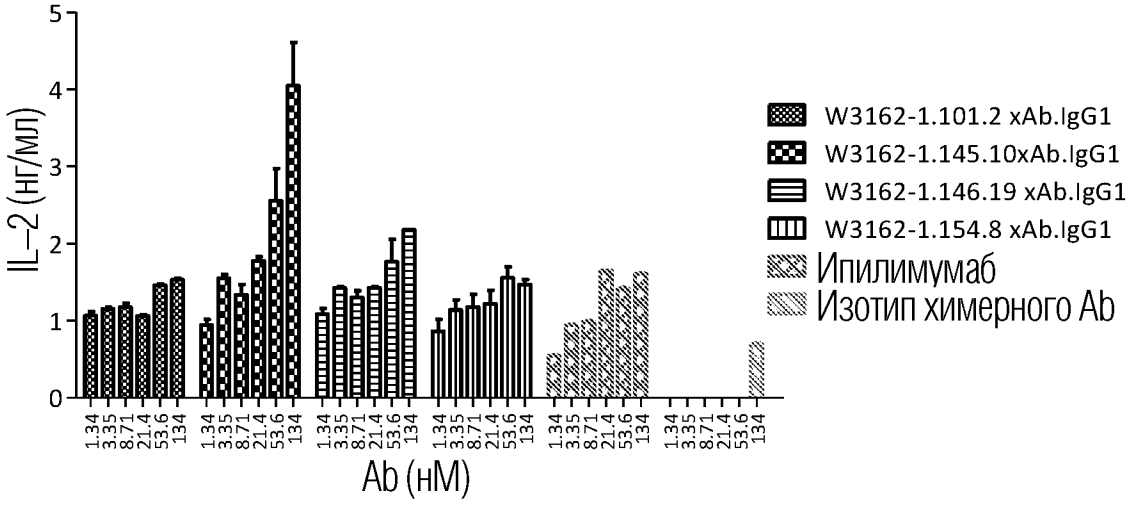
(A)


W316-CHO-K1.hPro1.L1
10000
8000
6000
4000
2000
0
MFI
0.0001
0.01
1
100
10000
Ab (нМ)
W3162-1.101.2 xAb.IgG1
W3162-1.145.10xAb.IgG1
W3162-146.19 xAb.IgG1
W3162-1.154.8 xAb.IgG1
Ипилимумаб

(B)

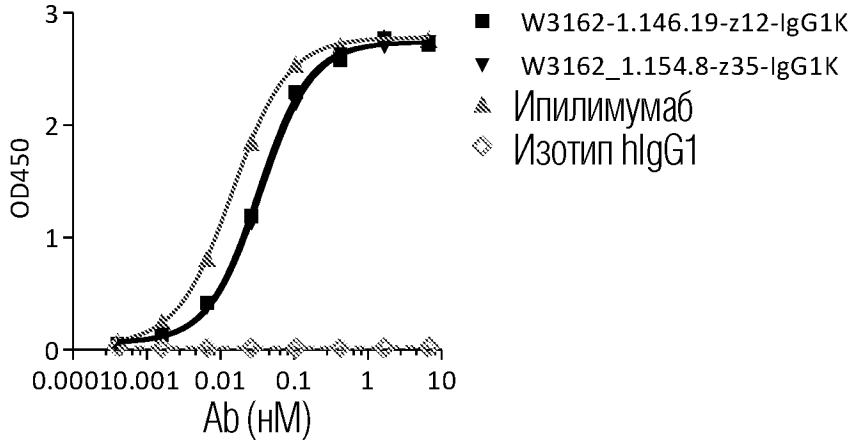

W316-CHO-K1.hPro1.L2
4000
3000
2000
1000
0
MFI
0.0001
0.01
1
100
10000
Ab (нМ)
W3162-1.101.2 xAb.IgG1
W3162-1.145.10xAb.IgG1
W3162-146.19 xAb.IgG1
W3162-1.154.8 xAb.IgG1
Ипилимумаб

ФИГ. 7

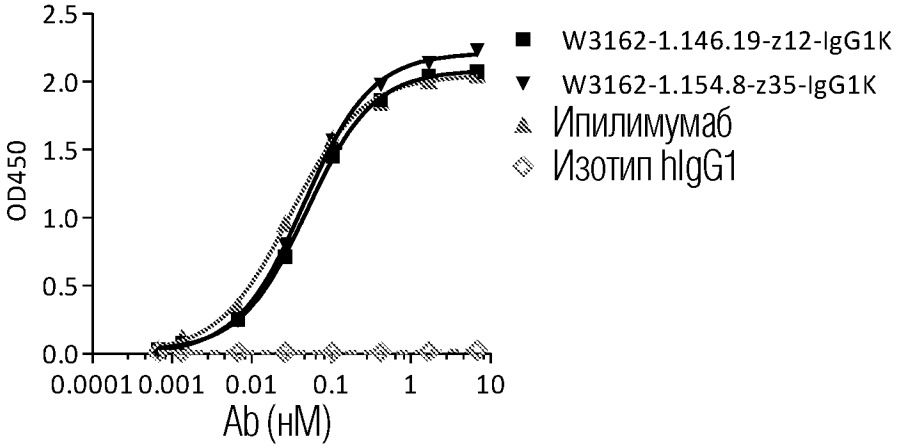

IL–2 (нг/мл)
0
1
2
3
4
5
1.34
3.35
8.71
21.4
53.6
134
Ab (нМ)
W3162-1.101.2 xAb.IgG1
W3162-1.145.10xAb.IgG1
W3162-1.146.19 xAb.IgG1
W3162-1.154.8 xAb.IgG1
Ипилимумаб
Изотип химерного Ab

ФИГ. 8

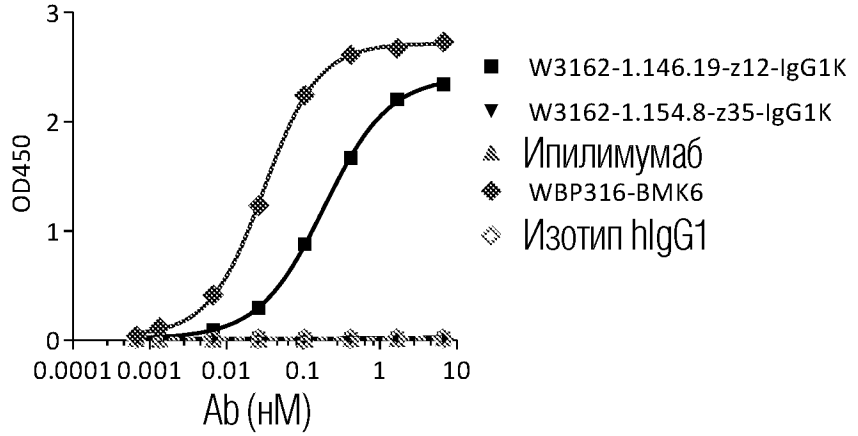
(A) CTLA–4 человека



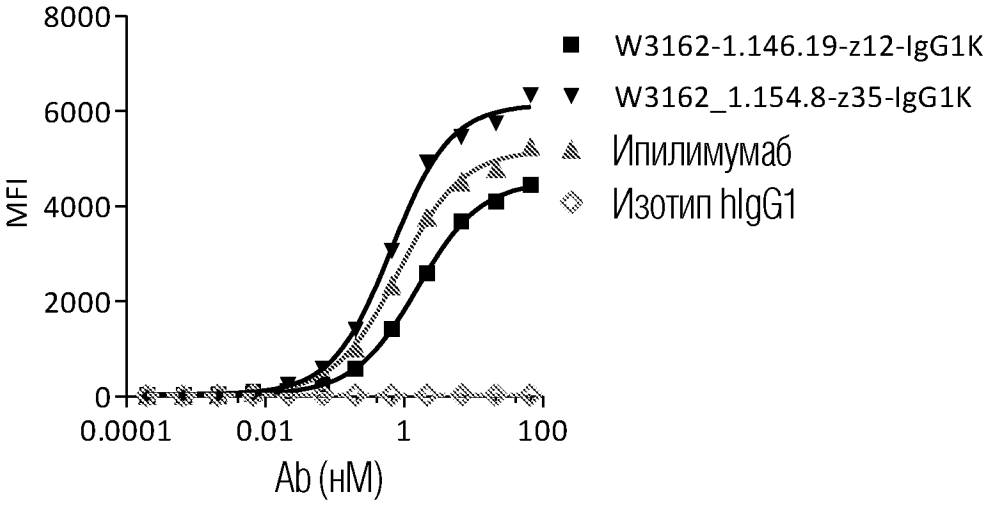
(B) CTLA–4 яванской макаки



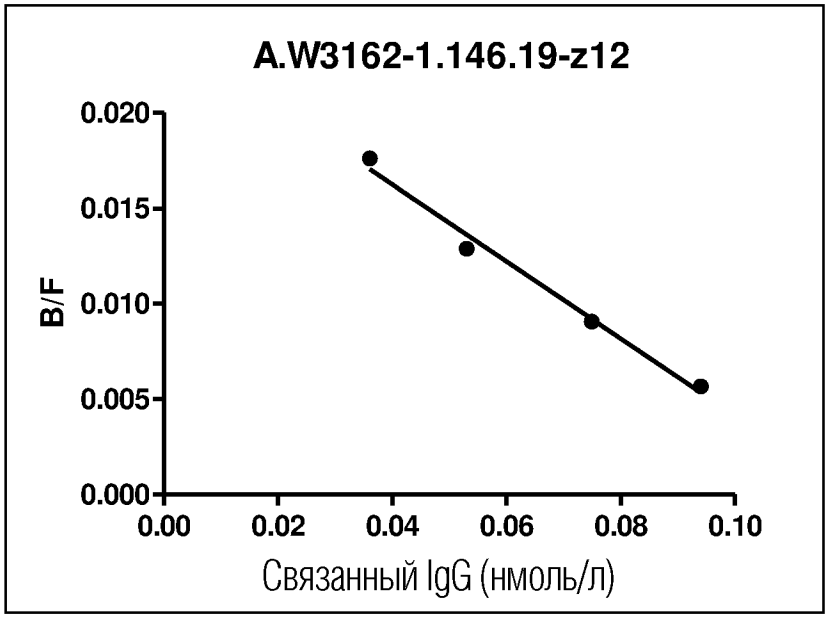
(C) CTLA–4 яванской макаки

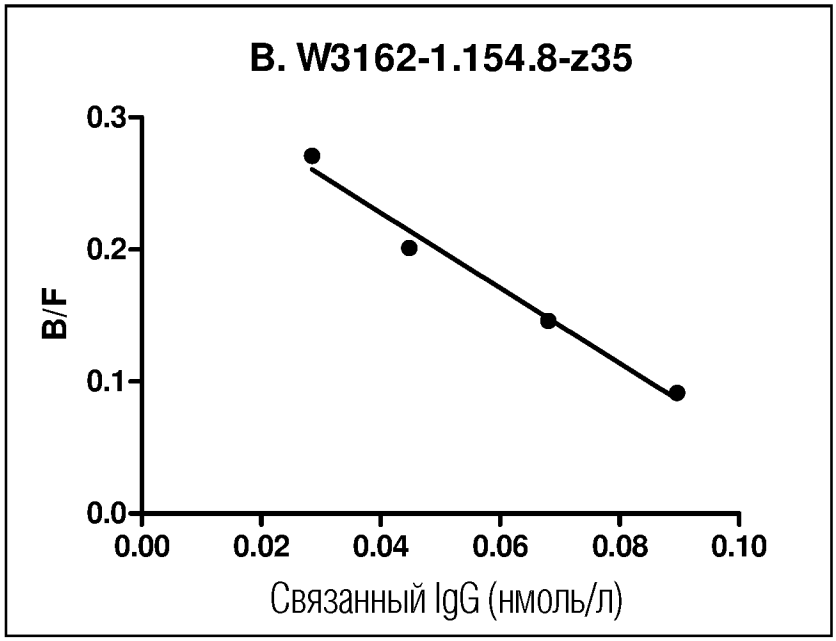


ФИГ. 9


8000
6000
4000
2000
0
MFI
0.0001
0.01
1
100
Ab (нМ)
W3162-1.146.19-z12-IgG1K
W3162_1.154.8-z35-IgG1K
Ипилимумаб
Изотип hIgG1

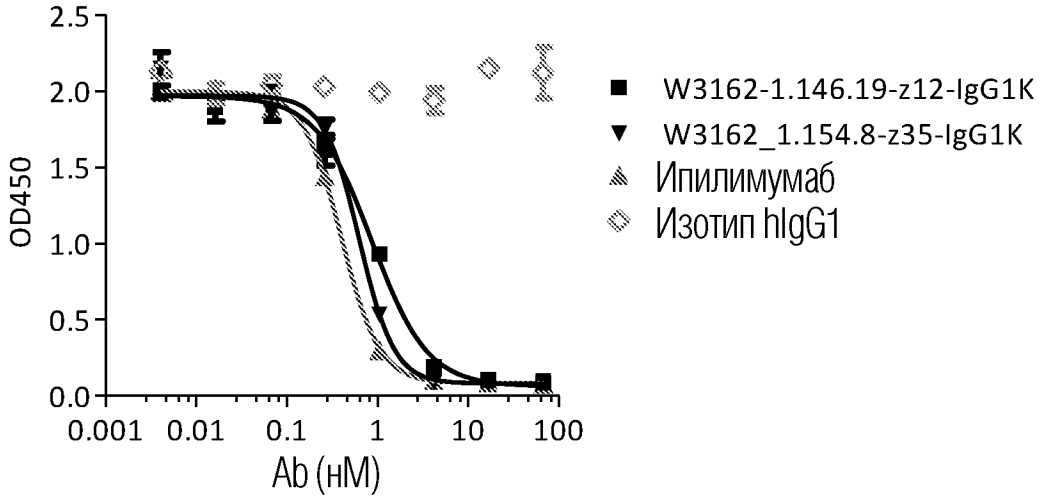
ФИГ. 10a


A.W3162-1.146.19-z12
B/F
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
0.10
Связанный IgG (нмоль/л)

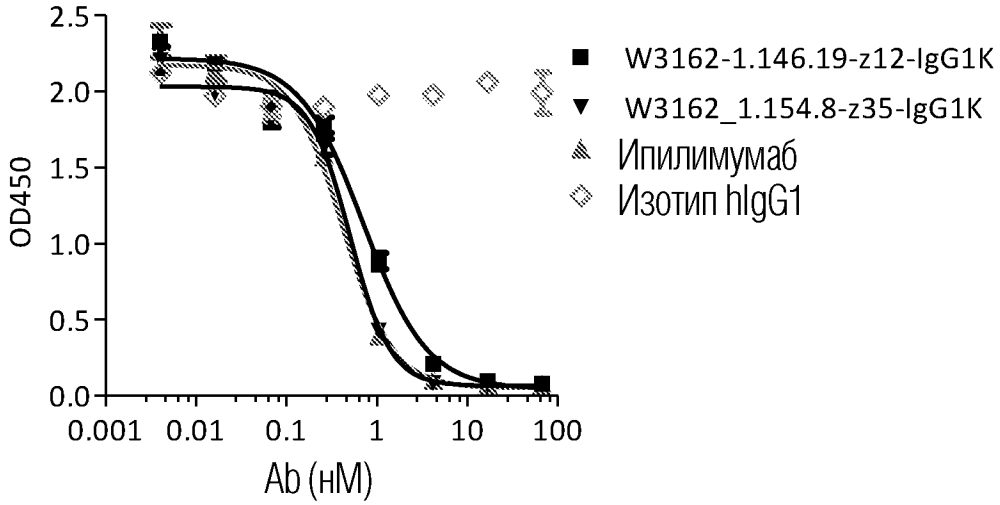

B. W3162-1.154.8-z35
B/F
0.3
0.2
0.1
0.0
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
0.10
Связанный IgG (нмоль/л)

ФИГ. 10b

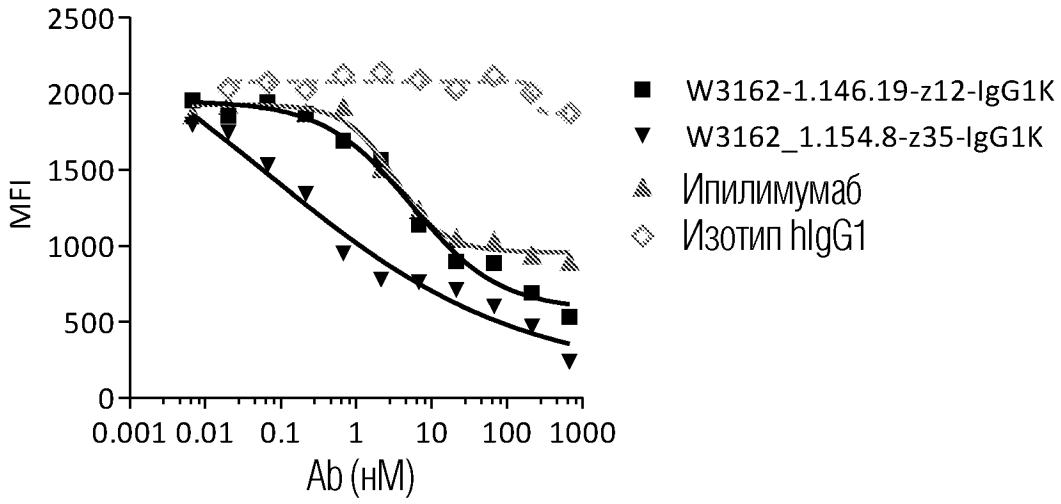
(A) CD80

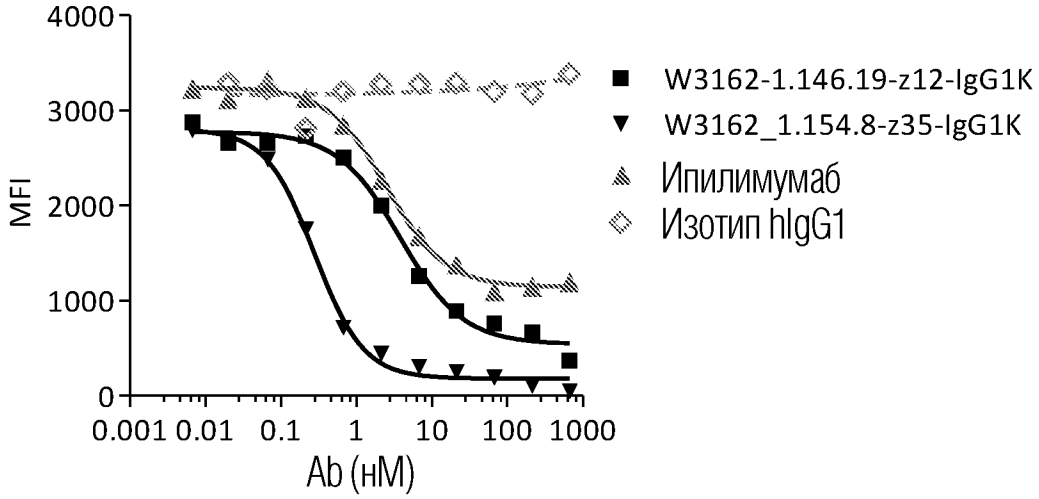


(B) CD86

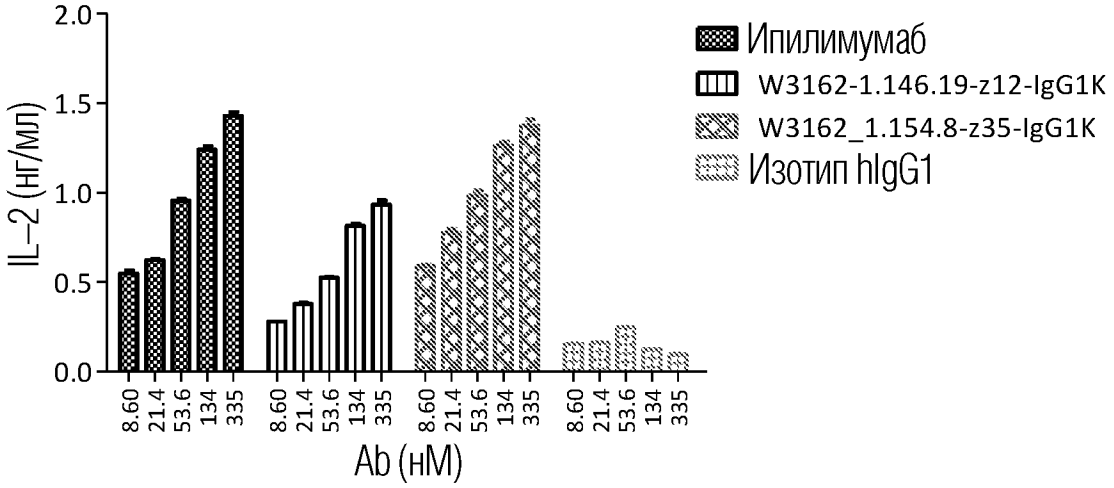


ФИГ. 11

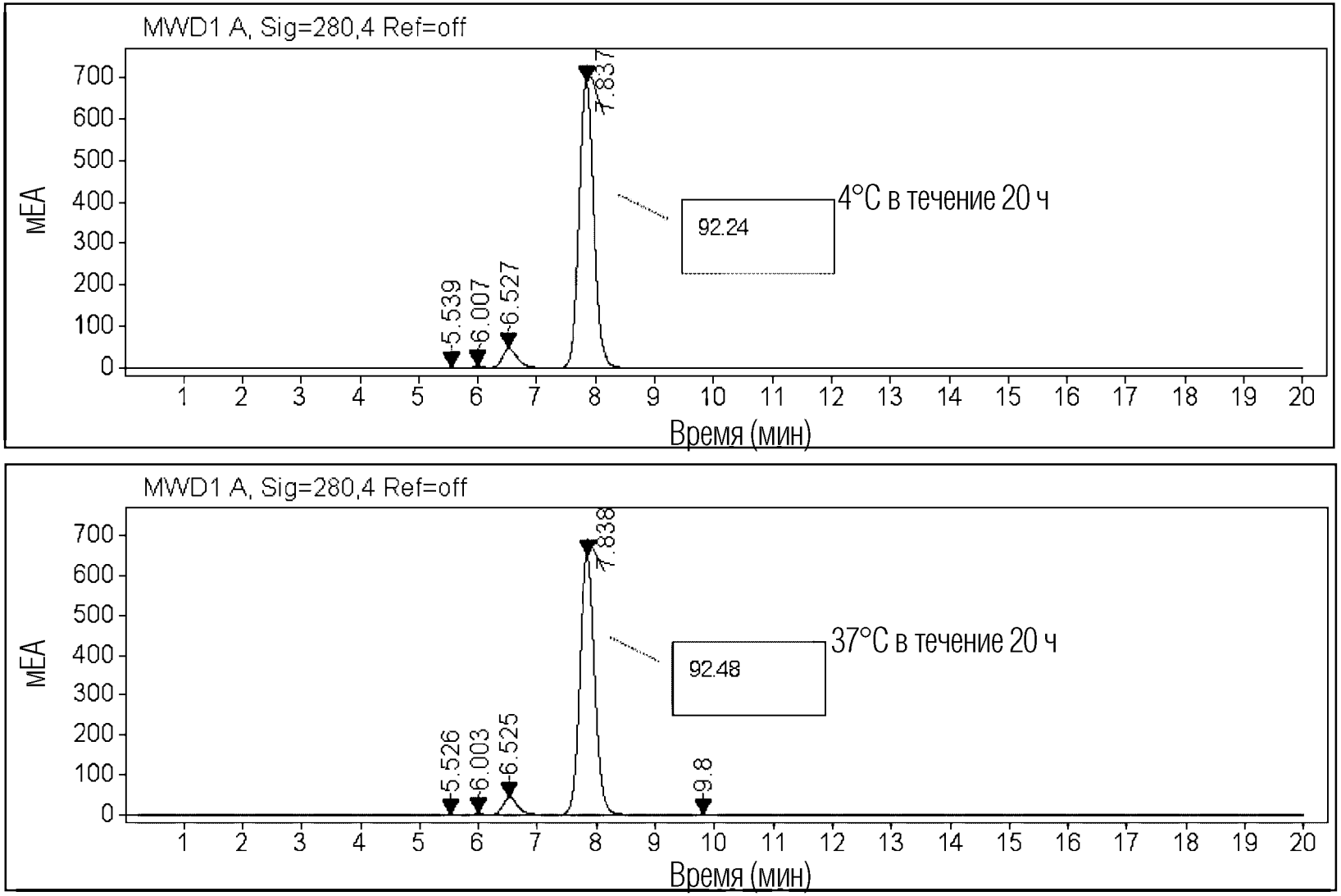

2500
2000
1500
1000
500
0
MFI
0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
Ab (нМ)
W3162-1.146.19-z12-IgG1K
W3162_1.154.8-z35-IgG1K
Ипилимумаб
Изотип hIgG1


4000
3000
2000
1000
0
MFI
0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
Ab (нМ)
W3162-1.146.19-z12-IgG1K
W3162_1.154.8-z35-IgG1K
Ипилимумаб
Изотип hIgG1

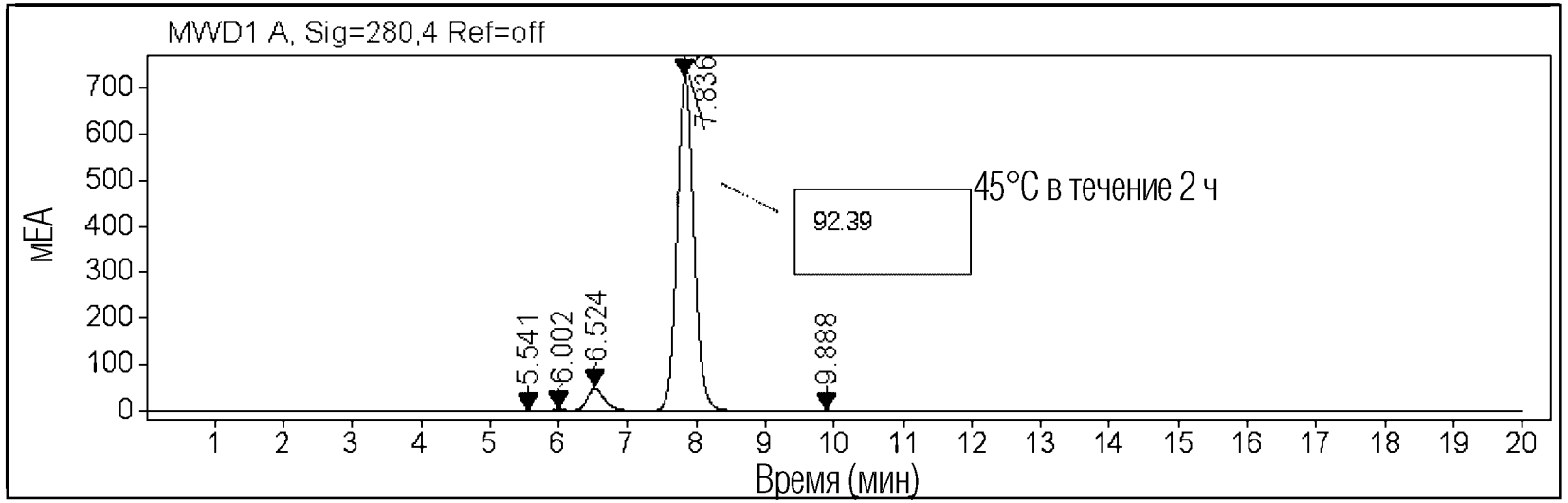
ФИГ. 12

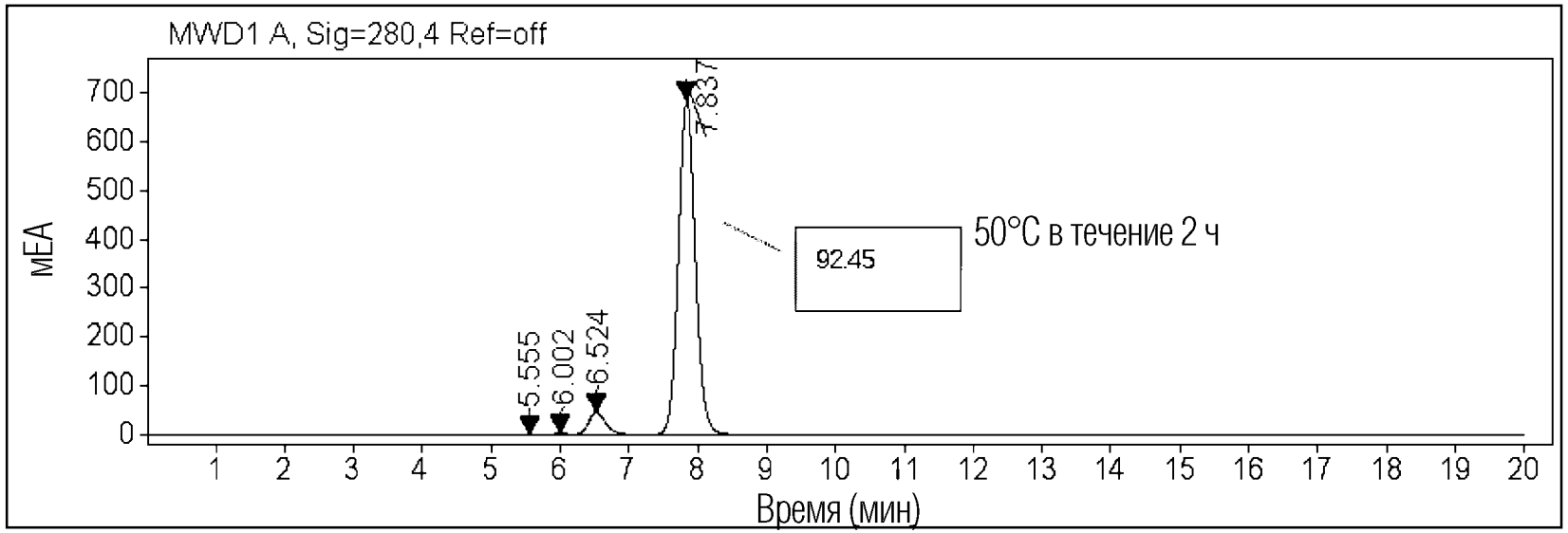

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
IL–2 (нг/мл)
8.60
21.4
53.6
134
335
Ab (нМ)
Ипилимумаб
W3162-1.146.19-z12-IgG1K
W3162_1.154.8-z35-IgG1K
Изотип hIgG1

ФИГ. 13

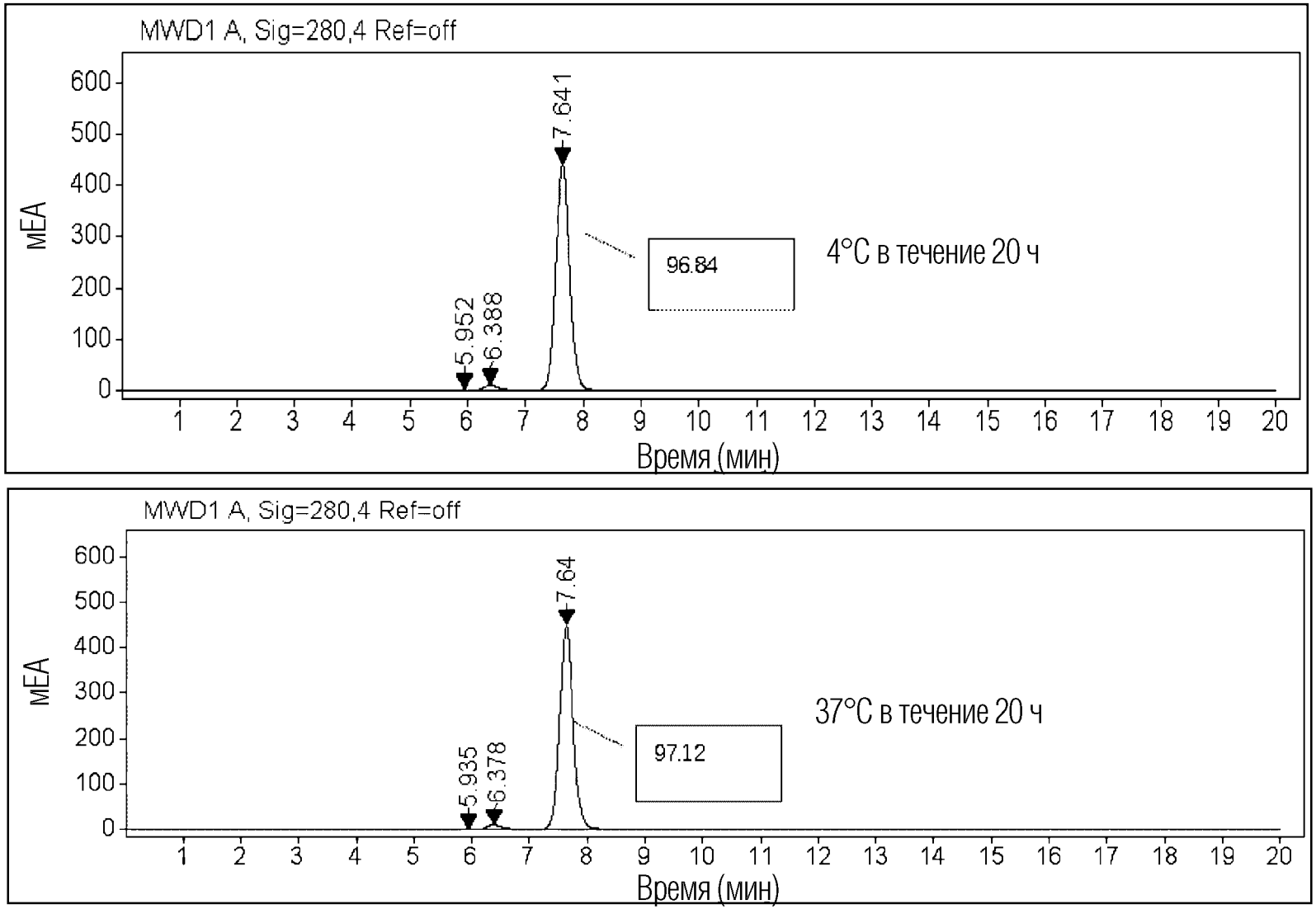

MWD1 A, Sig=280,4 Ref=off
mEA
700
600
500
400
300
200
100
0
5.539
6.007
6.527
7.837
4°C в течение 20 ч
92.24
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
Время (мин)
MWD1 A, Sig=280,4 Ref=off
mEA
700
600
500
400
300
200
100
0
5.526
6.003
6.525
7.838
9.8
37°C в течение 20 ч
92.48
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
Время (мин)

ФИГ. 14a-b

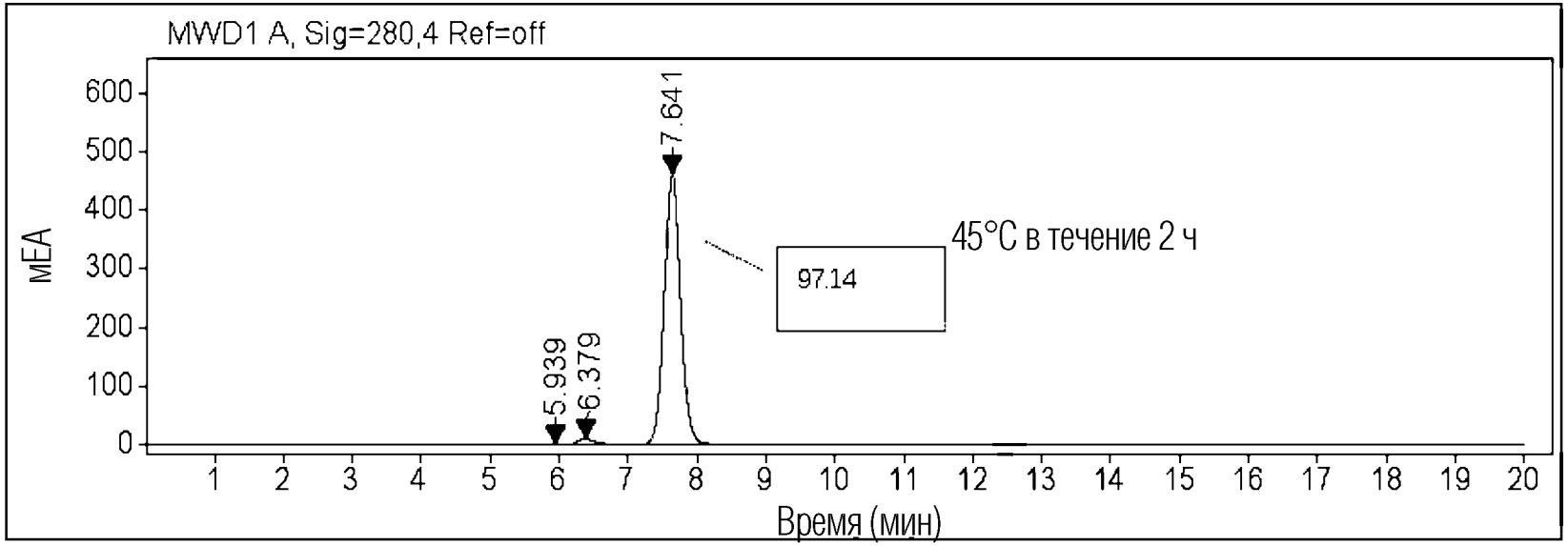

MWD1 A, Sig=280,4 Ref=off
mEA
700
600
500
400
300
200
100
0
5.541
6.002
6.524
7.836
9.888
92.39
45°C в течение 2 ч
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
Время (мин)

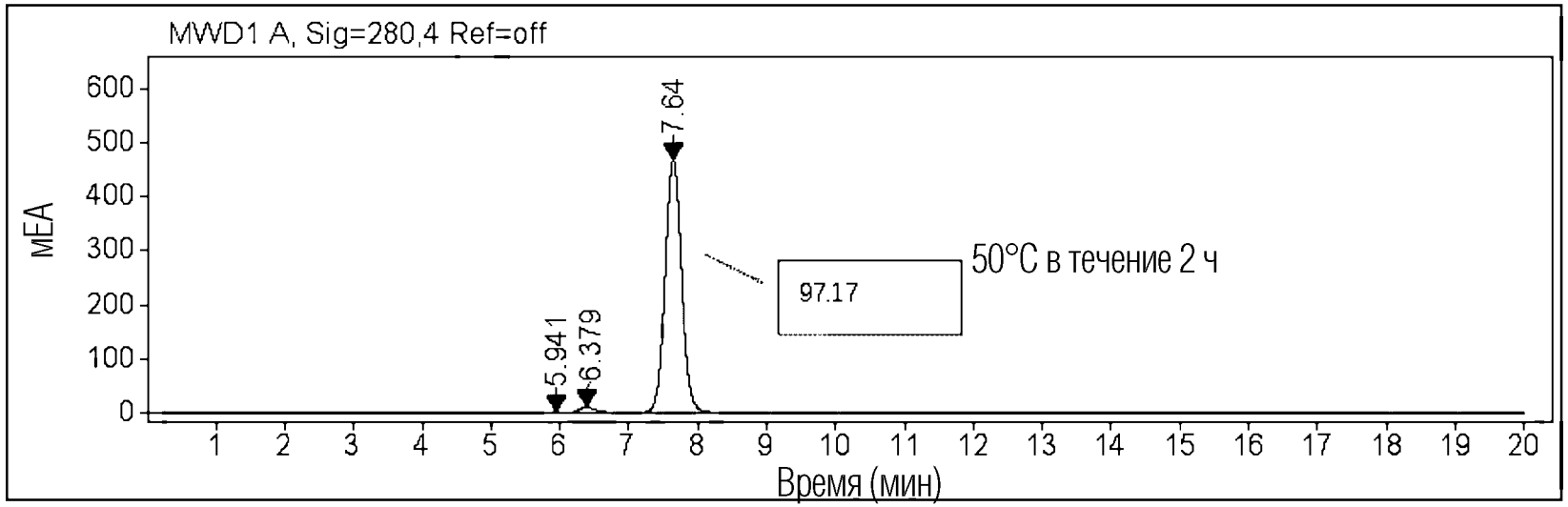

MWD1 A, Sig=280,4 Ref=off
mEA
700
600
500
400
300
200
100
0
5.555
6.002
6.524
7.837
92.45
50°C в течение 2 ч
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
Время (мин)

ФИГ. 14c-d

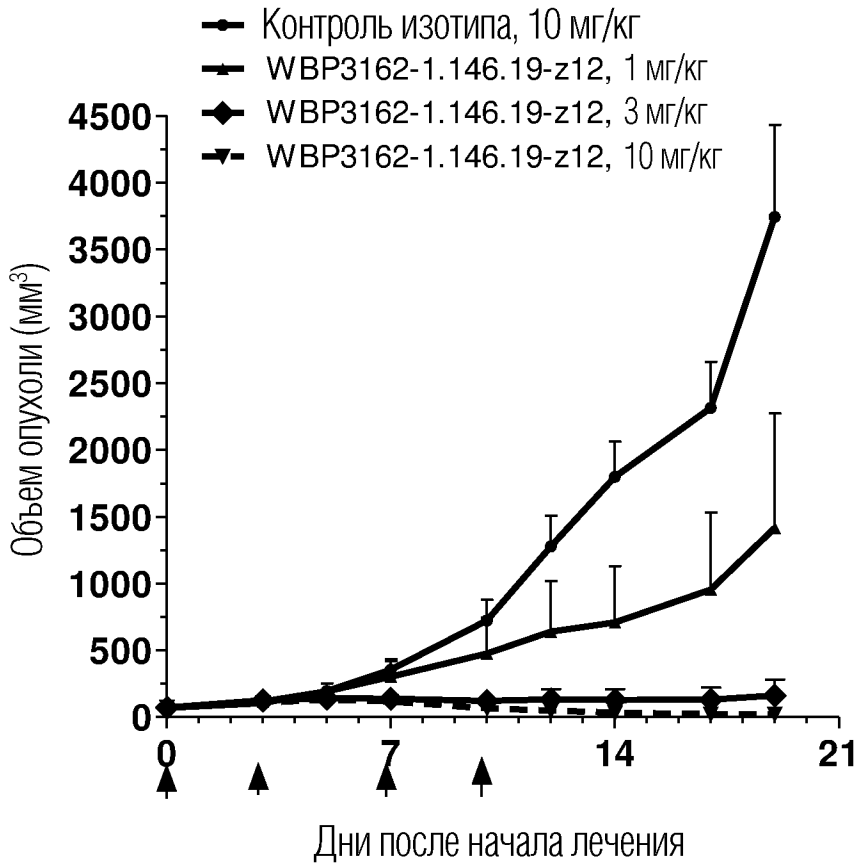

MWD1 A, Sig=280,4 Ref=off
mEA
600
500
400
300
200
100
0
5.952
6.388
7.641
96.84
4°C в течение 20 ч
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
Время (мин)
MWD1 A, Sig=280,4 Ref=off
mEA
600
500
400
300
200
100
0
5.935
6.378
7.64
97.12
37°C в течение 20 ч
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
Время (мин)

ФИГ. 14e-f

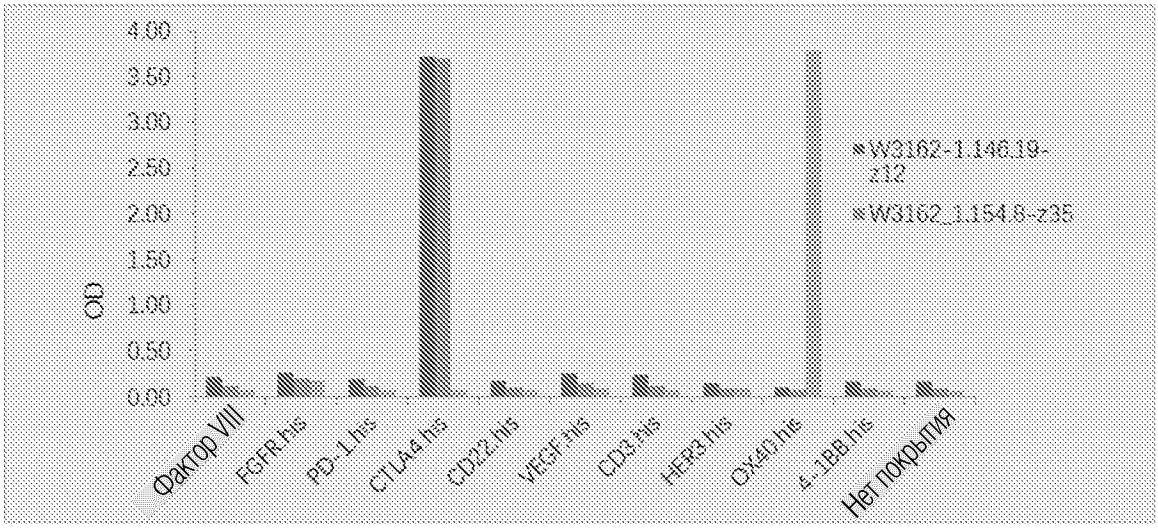

MWD1 A, Sig=280,4 Ref=off
mEA
600
500
400
300
200
100
0
5.939
6.379
7.641
45°C в течение 2 ч
97.14
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
Время (мин)


MWD1 A, Sig=280,4 Ref=off
mEA
600
500
400
300
200
100
0
5.941
6.379
7.64
50°C в течение 2 ч
97.17
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
Время (мин)

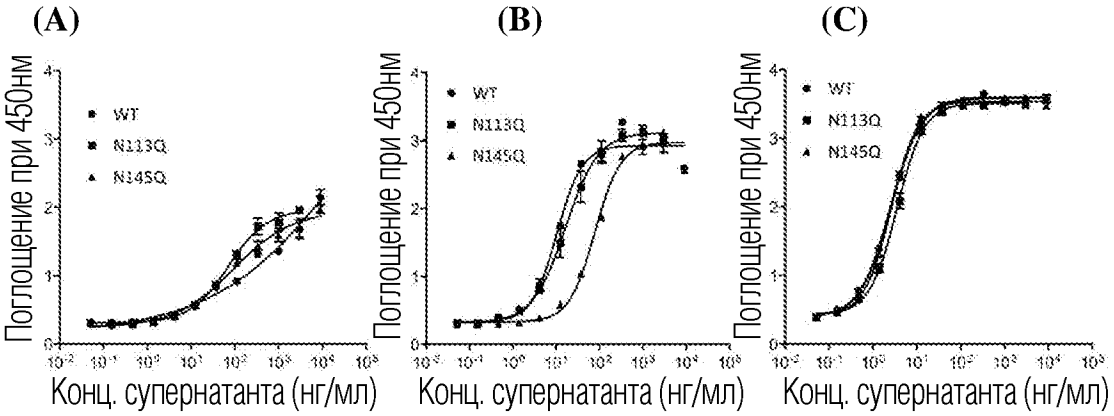
ФИГ. 14g-h


Контроль изотипа, 10 мг/кг
WBP3162-1.146.19-z12, 1 мг/кг
WBP3162-1.146.19-z12, 3 мг/кг
WBP3162-1.146.19-z12, 10 мг/кг
Объем опухоли (мм3)
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
7
14
21
Дни после начала лечения

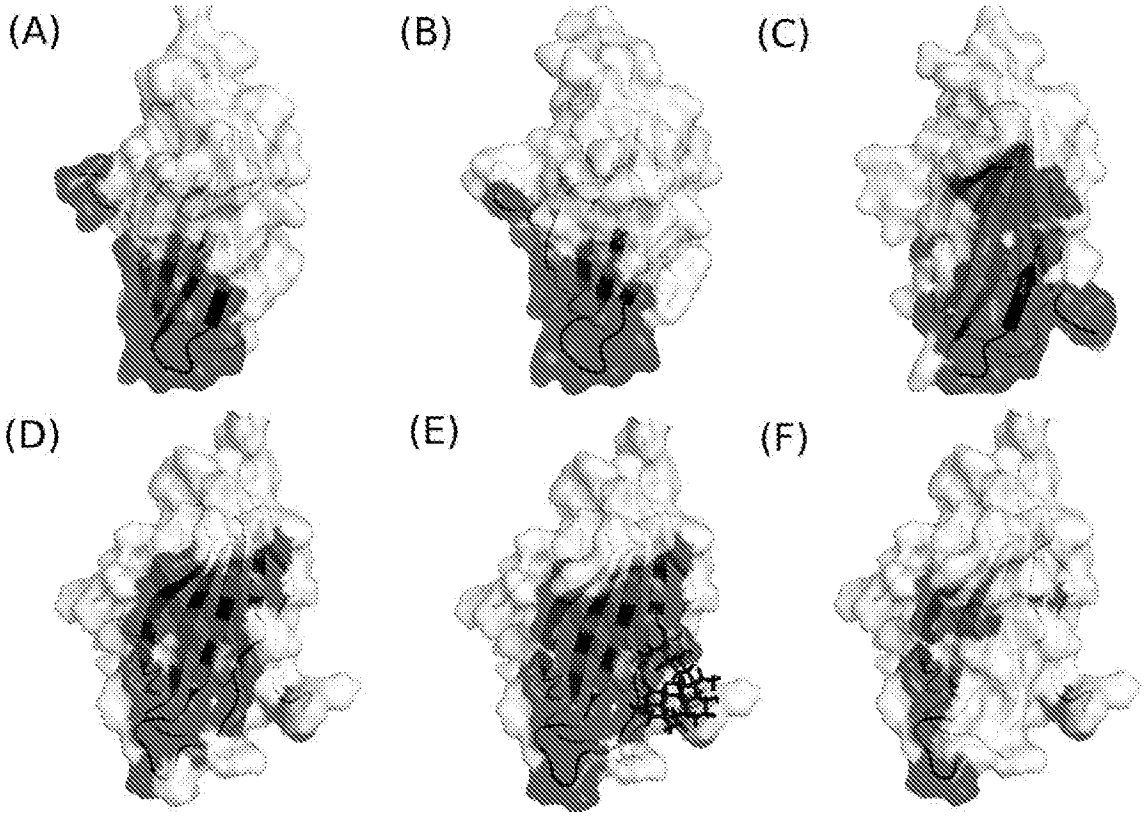
ФИГ. 15


OD
4.00
3.50
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
Фактор VIII
FGFR.his
PD-1.his
CTLA4.his
CD22.his
VEGF.his
CD3.his
HER3.his
CX40.his
4-1BB.his
Нет покрытия
W3162-1.146.19-z12
W3162_1.154.6-z35

ФИГ. 16


(A)
(B)
(C)
Поглощение при 450нм
WT
N113Q
N145Q
Конц. супернатанта (нг/мл)

ФИГ. 17


(A)
(B)
(C)
(D)
(E)
(F)

ФИГ. 18