

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090272 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.20

(22) Дата подачи заявки
2018.07.23

(51) Int. Cl. *A61K 49/00* (2006.01)
A61K 49/16 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К CD8 И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/536,239; 62/660,902

(32) 2017.07.24; 2018.04.20

(33) US

(86) PCT/US2018/043343

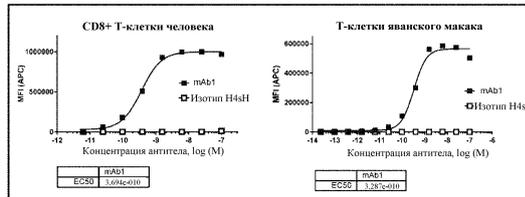
(87) WO 2019/023148 2019.01.31

(71) Заявитель:
РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Гирлео Джейсон Т., Ма Дангше, Олсон
Уилльям, Таваре Ричард, Терстон
Гэвин (US)

(74) Представитель:
Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Глухарёва А.О., Гизатуллина
Е.М., Строкова О.В., Лебедев В.В.,
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин
Ш.Ф., Парамонова К.В. (RU)

(57) Изобретением предусмотрены антитела к CD8, меченные радиоактивной меткой антитела к CD8, меченные флуоресцентной меткой антитела к CD8 и их применение в визуализации. Включены способы выявления наличия белков CD8 у субъекта или в образце.



202090272

A1

A1

202090272

АНТИТЕЛА К CD8 И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[001] Настоящее изобретение относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые специфически связываются с гликопротеином CD8, терапевтическим и диагностическим способам применения этих антител, меченым радиоактивной меткой антителам к CD8, меченым флуоресцентной меткой антителам к CD8 и их применению в визуализации.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[002] Официальная копия перечня последовательностей подана одновременно с описанием в электронном виде посредством EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII с названием файла 10357WO01_SEQ_LIST_ST25.txt, дата создания 23 июля 2018 года и размер приблизительно 12 килобайт. Перечень последовательностей, содержащийся в данном документе в формате ASCII, является частью описания и настоящим включен посредством ссылки во всей своей полноте.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[003] Т-клеточные костимулирующие и коингибирующие молекулы (в совокупности называемые косигнальными молекулами) играют решающую роль в регуляции активации Т-клеток, дифференцировке субпопуляций, эффекторной функции и выживаемости (Chen et al 2013, Nature Rev. Immunol. 13: 227-242). После распознавания комплексов когнатный пептид-МНС на антигенпрезентирующих клетках с помощью Т-клеточного рецептора (TCR), косигнальные рецепторы совместно локализуются с Т-клеточными рецепторами в иммунном синапсе, где они синергетически действуют с передачей сигнала с участием TCR для стимуляции или подавления активации и функционирования Т-клеток (Flies et al., 2011, Yale J. Biol. Med. 84: 409-421). Конечный иммунный ответ регулируется балансом между костимулирующими и коингибирующими сигналами («контрольными точками иммунного ответа») (Pardoll 2012, Nature Reviews Cancer 12: 252-264). CD8, гликопротеин клеточной поверхности, стабилизирует взаимодействие между Т-клеточным рецептором и МНС-I и инициирует внутриклеточную передачу сигнала посредством фосфорилирования с участием лимфоцитспецифической

протеинтирозинкиназы (Lck) CD3-ассоциированных иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов (ITAM) для активации.

[004] У людей CD8 преимущественно экспрессируется на цитотоксических Т-лимфоцитах, но также экспрессируется на субпопуляциях дендритных клеток, естественных киллеров, Т-клеток естественных киллеров и $\gamma\delta$ Т-клеток. Гликопротеин состоит из двух изоформ, α и β , которые кодируются разными генами и экспрессируются в форме $\alpha\alpha$ -гомодимеров или $\alpha\beta$ -гетеродимеров. более распространенными являются $\alpha\beta$ -гетеродимеры.

[005] Иммуно-позитронно-эмиссионная томография (PET) представляет собой инструмент для диагностической визуализации, в котором применяют моноклональные антитела, меченные позитронными излучателями, сочетающие в себе нацеливающие свойства антитела с чувствительностью камер для позитронно-эмиссионной томографии. См., например, *The Oncologist*, 12: 1379 (2007); *Journal of Nuclear Medicine*, 52(8): 1171 (2011). Иммуно-PET делает возможной визуализацию и количественную оценку накопления антигенов и антител *in vivo* и, следовательно, может служить важным инструментом для диагностики и дополняющей терапии. Например, иммуно-PET может помочь в отборе потенциальных субъектов-кандидатов для конкретной терапии, а также в отслеживании хода лечения.

[006] Существует потребность в диагностических инструментах для прогнозирования и отслеживания пригодности или чувствительности субъекта к конкретному средству противоопухолевой терапии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[007] В данном документе предусмотрены моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с CD8. Антитела могут быть применимы, *среди прочего*, для нацеливания на иммунные клетки, экспрессирующие CD8, и для модуляции активности CD8-положительных Т-клеток. В определенных вариантах осуществления антитела применимы для подавления или нейтрализации активности CD8-положительных Т-клеток, например, для подавления продуцирования IFN γ в CD8-положительных Т-клетках и/или для подавления белка-активатора фактора транскрипции (AP-1) в активированных Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты применимы для

связывания CD8 *in vivo*. Антитела применимы при лечении заболевания или состояния, связанного с активацией CD8-положительных Т-клеток.

[008] Антитела, предусмотренные данным документом, могут быть полноразмерными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, Fab-, F(ab')₂- или scFv-фрагмент) и могут быть модифицированы для изменения функциональности, *например*, с устранением остаточных эффекторных функций (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933).

[009] В первом аспекте данным документом предусмотрены выделенные рекомбинантные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с CD8. В определенных вариантах осуществления антитела являются полностью человеческими.

[010] Иллюстративные антитела к CD8 перечислены в таблице 1, в которой представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей и идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты для последовательностей определяющих комплементарность областей тяжелой и легкой цепей и последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей.

[011] Также данным документом предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 или по существу сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[012] Также данным документом предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 или по существу сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[013] Также данным документом предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или по существу

сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[014] Также данным документом предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или по существу сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[015] Также данным документом предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или по существу сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[016] Также данным документом предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12 или по существу сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[017] Также данным документом предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 или по существу сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[018] Также данным документом предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16 или по существу сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей

мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[019] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 8/16. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 2/10. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотные последовательности CDR в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 2/10. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат комбинацию из шести аминокислотных последовательностей CDR (HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3) под SEQ ID NO: 4/6/8/12/14/16.

[020] Способы и методики идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны из уровня техники и могут быть применены для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрытых в данном документе. К иллюстративным общепринятым способам, которые можно применять для идентификации границ CDR, относятся, *например*, определение по Kabat, определение по Chothia и определение по AbM. В общих чертах, определение по Kabat основано на вариабельности последовательности, определение по Chothia основано на местоположении структурных областей петли, а определение по AbM является компромиссным решением между подходами по Kabat и Chothia. *См., например*, Kabat, «Sequences of Proteins of Immunological Interest,» National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); и Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Также для идентификации последовательностей CDR в антителе доступны открытые базы данных.

[021] В данном документе предусмотрены антитела к CD8, имеющие модифицированный характер гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления может быть применима модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования, или антитело без фукозного фрагмента, который наличует в олигосахаридной цепи, например, для увеличения функции антителозависимой

клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других путях применения модификацию галактозилирования можно осуществлять для модифицирования комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

[022] В данном документе предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с CD8 человека или другого вида. В определенных вариантах осуществления антитела могут связываться с CD8 человека и/или CD8 обезьяны. В определенных вариантах осуществления антитела связываются с CD8 α человека.

[023] Во втором аспекте данным документом предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют антитела к CD8 или их части. Например, данным документом предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 2; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1 или по существу сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней. Данным документом предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 10; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 9 или по существу сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней. Данным документом предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей CDR, перечисленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей CDR, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[024] В связанном аспекте данным документом предусмотрены рекомбинантные векторы экспрессии, способные обеспечивать экспрессию

полипептида, содержащего переменную область тяжелой или легкой цепи антитела к CD8. Например, данным документом предусмотрены рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из упомянутых выше молекул нуклеиновой кислоты, *т. е.* молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в таблице 1. Также предусмотрены рекомбинантные векторы экспрессии, способные обеспечивать экспрессию полипептида, содержащего тяжелую или легкую цепь антитела к CD8. Например, данным документом предусмотрены рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из упомянутых выше молекул нуклеиновой кислоты, *т. е.* молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любую из последовательностей тяжелой цепи или легкой цепи, представленных в таблице 1. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих продуцирование антител или фрагментов антител, и выделение полученных таким образом антител и фрагментов антител.

[025] В третьем аспекте данным документом предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантное антитело человека или его фрагмент, которые специфически связываются с CD8, и фармацевтически приемлемый носитель. В связанном аспекте композиция представляет собой комбинацию антитела к CD8 и второго терапевтического средства. В одном варианте осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, при объединении которого с антителом к CD8 обеспечивается преимущество. К иллюстративным средствам, которые можно преимущественно объединять с антителом к CD8, относятся без ограничения другие средства, которые обеспечивают связывание и/или модулирование передачи сигнала с участием активированных Т-клеток (в том числе другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и т. д.), и/или средства, которые непосредственно не связываются с CD8, но, тем не менее, обеспечивают модулирование активации иммунных клеток. Дополнительные комбинированные средства терапии и совместные составы, включающие антитела к CD8, предусмотренные данным документом, представлены в других частях настоящего изобретения.

[026] В четвертом аспекте предусмотрены способы модуляции иммунного

ответа у субъекта, при этом способ предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества антитела к CD8 или его антигенсвязывающего фрагмента. В определенных вариантах осуществления способы обеспечивают уменьшение иммунного ответа у субъекта, например, уменьшение продуцирования IFN γ в активированных CD8-положительных Т-клетках и/или подавление белка-активатора фактора транскрипции (AP-1) в активированных Т-клетках. Способы предусматривают введение субъекту эффективного количества антитела или его фрагмента, связывающих CD8. В одном варианте осуществления данным документом предусмотрен способ ослабления активации Т-клеток у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества антитела к CD8 или его антигенсвязывающего фрагмента. В определенных вариантах осуществления нуждающийся в этом субъект может страдать от заболевания или нарушения, такого как инфекция или аутоиммунное заболевание.

[027] В пятом аспекте данным документом предусмотрены терапевтические способы лечения заболевания или нарушения, такого как инфекция или аутоиммунное заболевание, у субъекта с применением антитела к CD8 или антигенсвязывающей части антитела, предусмотренных данным документом, при этом терапевтические способы предусматривают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или фрагмент антитела, предусмотренных данным документом. Подлежащее лечению нарушение представляет собой любое заболевание или состояние, которое уменьшают, облегчают, подавляют или предупреждают путем подавления активности или передачи сигнала CD8-положительных Т-клеток. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят нуждающемуся в этом субъекту в комбинации со вторым терапевтическим средством. Второе терапевтическое средство может быть выбрано из группы, состоящей из антитела к другому коингибитору Т-клеток, антитела к антигену опухолевых клеток, антитела к рецептору Т-клеток, антитела к эпитопу на клетке, инфицированной вирусом, цитотоксического средства, противоракового лекарственного средства, противовирусного лекарственного средства, противовоспалительного лекарственного средства (*например*, кортикостероидов), химиотерапевтического средства, средства лучевой терапии, иммунодепрессанта и любого другого лекарственного средства или

средства терапии, которые известны в данной области техники. В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство может представлять собой средство, которое способствует противодействию или снижению любого(-ых) возможного(-ых) побочного(-ых) эффекта(-ов), ассоциированного(-ых) с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, предусмотренными данным документом, если такой(-ие) побочный(-ые) эффект(-ы) будет(-ут) возникать.

[028] Антитело или его фрагмент можно вводить подкожно, внутривенно, внутрикочно, внутрибрюшинно, перорально, внутримышечно или интракраниально. Антитело или его фрагмент можно вводить в дозе от приблизительно 0,1 мг/кг веса тела до приблизительно 100 мг/кг веса тела субъекта.

[029] Данным документом также предусмотрено применение антитела к CD8 или его антигенсвязывающего фрагмента в изготовлении лекарственного препарата для лечения заболевания или нарушения, которое получит полезный эффект в результате блокады связывания и/или передачи сигнала CD8 или от ослабления активации CD8-положительных Т-клеток.

[030] В другом аспекте данным документом предусмотрены меченные радиоактивной меткой конъюгаты на основе антитела к CD8 для применения в иммуно-РЕТ-визуализации. Конъюгат содержит антитело к CD8 или его антигенсвязывающий фрагмент, хелатообразующий фрагмент и позитронный излучатель.

[031] Данным документом предусмотрены способы синтеза указанных конъюгатов и синтетических промежуточных соединений, пригодных для этого.

[032] Данным документом предусмотрены способы визуализации ткани, которая экспрессирует CD8, при этом способы предусматривают введение меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8, описанного в данном документе, в ткань и визуальное наблюдение экспрессии CD8 посредством визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии (РЕТ).

[033] Данным документом предусмотрены способы визуализации ткани, содержащей CD8-экспрессирующие клетки, например, CD8-экспрессирующие внутриопухолевые лимфоциты или CD8-положительные Т-клетки, при этом способы предусматривают введение меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8, описанного в данном документе, в ткань и визуальное наблюдение

экспрессии CD8 с помощью PET-визуализации.

[034] Данным документом предусмотрены способы выявления CD8 в ткани, при этом способы предусматривают введение меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8, описанного в данном документе, в ткань и визуальное наблюдение экспрессии CD8 с помощью PET-визуализации. В одном варианте осуществления ткань присутствует у субъекта-человека. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой отличное от человека млекопитающее. В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется заболевание или нарушение, такое как рак, воспалительное заболевание или инфекция.

[035] Данным документом предусмотрены способы выявления CD8 в ткани, при этом способы предусматривают приведение ткани в контакт с антителом к CD8, конъюгированным с флуоресцентной молекулой, описанным в данном документе; и визуальное наблюдение экспрессии CD8 с помощью флуоресцентной визуализации.

[036] Данным документом предусмотрены способы идентификации субъекта, подходящего для противоопухолевой терапии, при этом способы предусматривают проведение отбора субъекта с солидной опухолью, введение меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8, описанного в данном документе, и визуальное наблюдение введенного меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в опухоли с помощью PET-визуализации, при этом наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в опухоли позволяет идентифицировать субъекта как подходящего для противоопухолевой терапии.

[037] Данным документом предусмотрены способы лечения опухоли, при этом способы предусматривают проведение отбора субъекта с солидной опухолью, определение того, что солидная опухоль является CD8-положительной, и введение средства противоопухолевой терапии нуждающемуся в этом субъекту. В определенных вариантах осуществления средство противоопухолевой терапии предусматривает ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 (*например*, антитело к PD-1 или антитело к PD-L1), пример средства терапии на основе ингибитора контрольных точек. В определенных вариантах осуществления субъекту вводят меченный радиоактивной меткой конъюгат на основе антитела к CD8, описанный в данном документе, и осуществляют визуализацию локализации меченного радиоактивной

меткой конъюгата на основе антитела посредством визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии (PET) для определения того, является ли опухоль CD8-положительной. В определенных вариантах осуществления субъекту дополнительно вводят меченный радиоактивной меткой конъюгат на основе антитела к PD-1 и осуществляют визуализацию локализации меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела посредством визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии (PET) для определения того, является ли опухоль PD-1-положительной.

[038] Настоящим документом предусмотрены способы отслеживания эффективности средства противоопухолевой терапии у субъекта, при этом способы предусматривают проведение отбора субъекта с солидной опухолью, при этом субъект подвергается лечению с помощью средства противоопухолевой терапии, введение субъекту меченного радиоактивной меткой конъюгата, воздействующего на CD8, описанного в данном документе, осуществление визуализации локализации введенного меченного радиоактивной меткой конъюгата в опухоли с помощью PET-визуализации и определение роста опухоли, при этом уменьшение поглощения конъюгата или сигнала радиоактивной метки относительно исходного уровня указывает на эффективность средства противоопухолевой терапии. В определенных вариантах осуществления средство противоопухолевой терапии предусматривает ингибитор PD-1 (например, REGN2810, BGB-A317, ниволумаб, пидилизумаб и пембролизумаб), ингибитор PD-L1 (например, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, MDX-1105 и REGN3504, а также те, которые раскрыты в публикации патента № US 2015-0203580), ингибитор CTLA-4 (например, ипилимумаб), ингибитор TIM3, ингибитор BTLA, ингибитор TIGIT, ингибитор CD47, ингибитор GITR, антагонист другого T-клеточного коингибитора или лиганда (например, антитело к LAG3, CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 или VISTA), ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагонист фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [например, «VEGF-Трап», такой как афлиберцепт или другой ингибирующий VEGF слитый белок, как изложено в US 7087411, или антитело к VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент (например, бевацизумаб или ранибизумаб) или низкомолекулярный ингибитор киназы рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)], ингибитор Ang2 (например, несвакумаб), ингибитор трансформирующего фактора

роста бета (TGF β), ингибитор рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (*например*, эрлотиниб, цетуксимаб), ингибитор CD20 (*например*, антитело к CD20, такое как ритуксимаб), антитело к опухоль-специфическому антигену [*например*, CA9, CA125, ассоциированному с меланомой антигену 3 (MAGE3), карциноэмбриональному антигену (CEA), виментину, опухолевому M2-PK, специфическому для предстательной железы антигену (PSA), муцину-1, MART-1 и CA19-9], вакцина (*например*, бациллы Кальмета-Герена, противораковая вакцина), адъювант для повышения презентирования антигена (*например*, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), биспецифическое антитело (*например*, биспецифическое антитело к CD3xCD20 или биспецифическое антитело к PSMAxCD3), цитотоксин, химиотерапевтическое средство (*например*, дакарбазин, темозоломид, циклофосфамид, доцетаксел, доксорубицин, даунорубицин, цисплатин, карбоплатин, гемцитабин, метотрексат, митоксантрон, оксалиплатин, паклитаксел и винкристин), циклофосфамид, средство лучевой терапии, ингибитор IL-6R (*например*, сарилумаб), ингибитор IL-4R (*например*, дупилумаб), ингибитор IL-10, цитокин, такой как IL-2, IL-7, IL-21 и IL-15, конъюгат антитела и лекарственного средства (ADC) (*например*, ADC на основе антитела к CD19 и DM4 и ADC на основе антитела к DS6 и DM4).

[039] Данным документом предусмотрены способы прогнозирования ответа субъекта на средство противоопухолевой терапии, при этом способы предусматривают проведение отбора субъекта с солидной опухолью и определение, является ли опухоль CD8-положительной, при этом, если опухоль является CD8-положительной, это позволяет прогнозировать положительный ответ субъекта в отношении средства противоопухолевой терапии. В определенных вариантах осуществления опухоль определяют как положительную путем введения меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8 по настоящему изобретению и локализации меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в опухоли с помощью PET-визуализации, при этом наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является CD8-положительной. В некоторых вариантах осуществления средство противоопухолевой терапии выбрано из ингибитора PD-1 (*например*, REGN2810, BGB-A317, ниволумаба, пидилизумаба и пембролизумаба), ингибитора PD-L1 (*например*, атезолизумаба, авелумаба,

дурвалумаба, MDX-1105 и REGN3504), ингибитора CTLA-4 (*например*, ипилимумаба), ингибитора TIM3, ингибитора BTLA, ингибитора TIGIT, ингибитора CD47, ингибитора GITR, ингибитора LAG3, антагониста другого Т-клеточного коингибитора или лиганда (*например*, антитела к CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 или VISTA), ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагониста фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [*например*, «VEGF-Трап», такого как афлиберцепт или другой ингибирующий VEGF слитый белок, как изложено в US 7087411, или антитела к VEGF или его антигенсвязывающего фрагмента (*например*, бевацизумаба или ранибизумаба), или низкомолекулярного ингибитора киназы рецептора VEGF (*например*, сунитиниба, сорафениба или пазопаниба)], ингибитора Ang2 (*например*, несвакумаба), ингибитора трансформирующего фактора роста бета (TGF β), ингибитора рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (*например*, эрлотиниба, цетуксимаба), ингибитора CD20 (*например*, антитела к CD20, такого как ритуксимаб), антитела к опухоль-специфическому антигену [*например*, CA9, CA125, ассоциированному с меланомой антигену 3 (MAGE3), карциноэмбриональному антигену (CEA), виментину, опухолевому M2-ПК, специфическому для предстательной железы антигену (PSA), муцину-1, MART-1 и CA19-9], вакцины (*например*, бацилл Кальмета-Герена, противораковой вакцины), адьюванта для повышения презентирования антигена (*например*, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора), биспецифического антитела (*например*, биспецифического антитела к CD3xCD20 или биспецифического антитела к PSMAxCD3), цитотоксина, химиотерапевтического средства (*например*, дакарбазина, темозоломида, циклофосфида, доцетаксела, доксорубицина, даунорубицина, цисплатина, карбоплатина, гемцитабина, метотрексата, митоксантрона, оксалиплатина, паклитаксела и винкристина), циклофосфида, средства лучевой терапии, ингибитора IL-6R (*например*, сарилумаба), ингибитора IL-4R (*например*, дупилумаба), ингибитора IL-10, цитокина, такого как IL-2, IL-7, IL-21 и IL-15, конъюгата антитела и лекарственного средства (ADC) (*например*, ADC на основе антитела к CD19 и DM4 и ADC на основе антитела к DS6 и DM4).

[040] Данным документом предусмотрены способы прогнозирования положительного ответа в отношении средства противоопухолевой терапии у субъекта с солидной опухолью. Способы предусматривают введение субъекту меченного

радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8 для определения наличия CD8-положительных клеток в солидной опухоли, при этом наличие CD8-положительных клеток позволяет прогнозировать положительный ответ в отношении средства противоопухолевой терапии.

[041] Данным документом предусмотрены способы отслеживания положительного ответа в отношении средства противоопухолевой терапии у субъекта с солидной опухолью. Способы предусматривают (а) введение субъекту одной или более доз средства противоопухолевой терапии и (b) введение субъекту меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8 через 1-20 недель после введения средства противоопухолевой терапии для определения наличия CD8-положительных клеток в солидной опухоли. Наличие CD8-положительных клеток указывает на положительный ответ в отношении средства противоопухолевой терапии.

[042] Данным документом предусмотрены способы прогнозирования или отслеживания успеха или эффективности средства противоопухолевой терапии у субъекта, у которого имеется солидная опухоль, при этом способ предусматривает (а) определение уровня CD8-положительных клеток в опухоли и (b) соотнесение уровня CD8-положительных клеток и успешного средства противоопухолевой терапии. Повышение уровня CD8 выше определенного порога является прогностическим фактором или показателем успешного средства противоопухолевой терапии.

[043] Данным документом предусмотрены способы отслеживания наличия Т-клеток или инфильтрации Т-клеток в опухоль в течение времени, при этом способ предусматривает (а) введение субъекту, у которого имеется опухоль, меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8 в первый момент времени и определение наличия CD8-положительных Т-клеток в опухоли; (b) введение субъекту одной или более доз средства противоопухолевой терапии; и (c) введение субъекту меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8 во второй момент времени через 1-20 недель после введения средства противоопухолевой терапии и определение наличия CD8-положительных Т-клеток в опухоли. Наличие Т-клеток в опухоли указывает на положительный ответ в отношении средства противоопухолевой терапии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[044] На **фигуре 1** изображено связывание mAb1 с CD8⁺ Т-клетками человека и яванского макака.

[045] На **фигуре 2** изображена модуляция активности CD8 Т-клеток человека посредством подавления продуцирования IFN γ с помощью mAb1.

[046] На **фигуре 3** представлены данные, полученные в результате люциферазного анализа с применением CD8 Т-клеток/APC, демонстрирующие подавление транскрипционной активности CD8 с помощью mAb1.

[047] На **фигуре 4** изображен UV/VIS-спектр конъюгата DFO-mAb1.

[048] На **фигуре 5** изображены результаты HPLC-SEC введения 25 мкг конъюгата DFO-mAb1 на колонке Superdex 200 Increase с детекцией УФ-поглощения при 280 нм. Указаны мономерные (97,5%) и высокомолекулярные (HMW) частицы (2,5%).

[049] На **фигуре 6** изображены электрофореграммы конъюгата DFO-mAb1. На **фиг. 6А)** представлен невосстановленный конъюгат, а на **фиг. 6В)** представлен восстановленный конъюгат.

[050] На **фигуре 7** изображена SEC-HPLC-хроматограмма радиоиммуноконъюгата mAb1-L2-111016 на колонке Superdex 200 Increase с детекцией гамма-излучения. Немеченый ⁸⁹Zr составляет менее 0,1% от общей суммарной активности.

[051] На **фигуре 8** изображена SEC-HPLC-хроматограмма радиоиммуноконъюгата mAb1-L2-111516 на колонке Superdex 200 Increase с детекцией гамма-излучения. Немеченый ⁸⁹Zr составляет менее 0,1% от общей суммарной активности.

[052] На **фигуре 9** изображена SEC-HPLC-хроматограмма радиоиммуноконъюгата mAb1-L2-111016 на колонке Superdex 200 Increase с детекцией УФ-поглощения при 280 нм. Указаны мономерные (98,5%) и высокомолекулярные (HMW) частицы (1,5%).

[053] На **фигуре 10** изображена SEC-HPLC-хроматограмма радиоиммуноконъюгата mAb1-L2-111516 на колонке Superdex 200 Increase с детекцией УФ-поглощения при 280 нм. Указаны мономерные (98,6%) и высокомолекулярные

(HMW) частицы (1,4%).

[054] На **фигуре 11** представлены репрезентативные PET-изображения ^{89}Zr -DFO-mAb1, инъецированного в дозах белка 0,5 или 1,5 мг/кг, у мышей, экспрессирующих hCD8. Специфическое поглощение ^{89}Zr -DFO-mAb1 выявлено в селезенке и лимфатических узлах мышей, экспрессирующих hCD8, при обеих введенных дозах. Уменьшение поглощения выявлено в селезенке и лимфатических узлах при более высокой дозе белка 1,5 мг/кг, что указывает на нацеливающую специфичность в отношении лимфоидных органов. Сокращения: шейн. ЛУ – шейные лимфатические узлы; подм. ЛУ – подмышечные лимфатические узлы; плеч. ЛУ – плечевые лимфатические узлы; брыж. ЛУ – брыжеечные лимфатические узлы; пах. ЛУ – паховые лимфатические узлы.

[055] На **фигуре 12** показаны репрезентативные PET-изображения ^{89}Zr -DFO-mAb1, инъецированного в дозе белка 0,1 мг/кг, у мышей, несущих опухоли Raji и Raji/hPVMC. Специфическое поглощение ^{89}Zr -DFO-mAb1 выявлено в селезенке и опухоли у мышей, несущих опухоли Raji/hPVMC.

[056] На **фигуре 13** показаны результаты сравнения обработки антителами мышей, инфицированных LCMV, и продемонстрировано, что мыши, обработанные mAb1, сохраняли способность устранять LCMV по сравнению с мышами, обработанными сильным CD8-блокирующим антителом.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Определения

[057] Если в данном документе не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой принадлежит раскрытый объект изобретения.

[058] Термин «CD8» (кластер дифференцировки 8) относится к гликопротеину клеточной поверхности, преимущественно экспрессируемому на цитотоксических Т-лимфоцитах, но также экспрессируемому на субпопуляциях дендритных клеток, естественных киллеров, Т-клеток естественных киллеров и $\gamma\delta$ Т-клеток. Гликопротеин состоит из двух изоформ, α и β , которые кодируются разными генами и

экспрессируются в форме α -гомомеров или $\alpha\beta$ -гетеродимеров, последний из которых является доминантным. Корцепторы CD8 стабилизируют взаимодействие Т-клеточного рецептора МНС-1 и инициируют внутриклеточную передачу сигнала посредством фосфорилирования с участием лимфоцитспецифической протеинтирозинкиназы (Lck) CD3-ассоциированных иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов (ITAM) для активации.

[059] Аминокислотная последовательность полноразмерного CD8 α представлена в UniProt под номером доступа P01732, а также указана в данном документе как SEQ ID NO: 18. Аминокислотная последовательность полноразмерного CD8 β представлена в UniProt под номером доступа 10966, а также указана в данном документе как SEQ ID NO: 20. Термин «CD8» включает полноразмерный CD8 α или CD8 β , рекомбинантный CD8, их фрагменты и их продукты слияния. Термин также охватывает CD8 α или CD8 β или их фрагмент, соединенный, например, с гистидиновой меткой, Fc мыши или человека или сигнальной последовательностью, такой как сигнальная последовательность ROR1. Например, термин включает последовательности, проиллюстрированные под SEQ ID NO: 18 или 20, содержащие Fc мыши (mIgG2a) на С-конце, соединенный с фрагментом CD8 α или CD8 β . Другие варианты белка содержат гистидиновую метку на С-конце, соединенную с CD8 или его фрагментом. Если не указано, что он получен от вида, отличного от человека, термин «CD8» означает CD8 человека.

[060] CD8 является представителем суперсемейства иммуноглобулинов (Ig) с внеклеточным доменом, подобным вариабельному домену (IgV) иммуноглобулина, соединенным с мембраной посредством толстого стебля, и внутриклеточным хвостом.

[061] Используемый в данном документе термин «коингибитор Т-клеток» относится к лиганду и/или рецептору, которые обеспечивают модуляцию иммунного ответа посредством активации или супрессии Т-клеток. Термин «коингибитор Т-клеток», также известный как косигнальная молекула Т-клеток, включает без ограничения белок гена 3 активации лимфоцитов (LAG-3, также известный как CD223), белок 1 запрограммированной смерти (PD-1), цитотоксический антиген 4 Т-лимфоцитов (CTLA-4), аттенюатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA), CD-28, 2B4, LY108, Т-клеточный содержащий домены иммуноглобулина и муцина белок 3 (TIM3), иммунорецептор Т-клеток с доменами иммуноглобулина и ITIM (TIGIT; также

известный как VSIG9), связанный с лейкоцитами иммуноглобулиноподобный рецептор 1 (LAIR1; также известный как CD305), индуцируемый костимулятор Т-клеток (ICOS; также известный как CD278), B7-1 (CD80) и CD160.

[062] Термин «антитело», используемый в данном документе, предназначен для обозначения молекул иммуноглобулинов, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями (*т. е.* «молекул полного антитела»), а также их мультимеров (*например*, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи («HCVR» или «V_H») и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи («LCVR» или «V_L») и константной области легкой цепи (C_L). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гиперварибельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В определенных вариантах осуществления FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичными последовательностям зародышевого типа человека или могут быть естественно или искусственно изменены. Аминокислотную консенсусную последовательность можно определить на основании параллельного анализа двух или более CDR.

[063] Также возможны замена одного или более остатков CDR или удаление одной или более CDR. В научной литературе описаны антитела, в которых можно обойтись для связывания без одной или двух CDR. Padlan *et al.* (1995 FASEB J. 9:133-139) проанализировали области контакта между антителами и их антигенами, исходя из опубликованных кристаллических структур, и сделали заключение, что только приблизительно от одной пятой до одной третьей остатков CDR в действительности контактируют с антигеном. Padlan также обнаружил множество антител, в которых одна или две CDR не имеют аминокислотных остатков, вступающих в контакт с антигеном (см. также Vajdos *et al.* 2002 J Mol Biol 320:415-428).

[064] Остатки CDR, которые не вступают в контакт с антигеном, можно идентифицировать на основе предыдущих исследований (*например*, остатки H60-H65

в CDRH2 зачастую не нужны) среди CDR-областей по Kabat, находящихся за пределами CDR по Chothia, путем молекулярного моделирования и/или эмпирическим путем. При удалении CDR или ее остатка(остатков) они обычно заменяются на аминокислоту, занимающую соответствующее положение в последовательности другого человеческого антитела или консенсусной последовательности таких последовательностей. Положения для замены в пределах CDR и аминокислоты для замены также можно выбрать эмпирическим путем. Эмпирические замены могут быть консервативными или неконсервативными заменами.

[065] Раскрытые в данном документе полностью человеческие моноклональные антитела к CD8 могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или CDR-областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевого типа. Такие мутации можно легко определить путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, с последовательностями зародышевого типа, доступными, например, из публичных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любых аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, где одна или более аминокислот в пределах одной или более каркасных областей и/или CDR-областей мутированы с получением соответствующего(соответствующих) остатка(остатков) последовательности зародышевого типа, из которой антитело получено, или с получением соответствующего(соответствующих) остатка(остатков) другой последовательности зародышевого типа, или с получением консервативной аминокислотной замены соответствующего(соответствующих) остатка(остатков) зародышевого типа (такие изменения последовательностей в данном документе в совокупности называются «мутациями зародышевого типа»). Специалист в данной области техники, исходя из раскрытых в данном документе последовательностей переменных областей тяжелых и легких цепей, легко может получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевого типа или их комбинации. В определенных вариантах осуществления все остатки каркасных областей и/или CDR в доменах V_H и/или V_L мутированы обратно с получением остатков, встречающихся в

первоначальной последовательности зародышевого типа, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки мутированы обратно с получением первоначальной последовательности зародышевого типа, *например*, только мутированные остатки, находящиеся в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, находящиеся в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более остатков каркасных областей и/или CDR мутированы в соответствующий(соответствующие) остаток(остатки) отличной последовательности зародышевого типа (*т. е.* последовательности зародышевого типа, которая отличается от последовательности зародышевого типа, из которой первоначально было получено антитело). Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию из двух или более мутаций зародышевого типа в каркасных областях и/или областях CDR, *например*, где определенные отдельные остатки мутированы с получением соответствующего остатка определенной последовательности зародышевого типа, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от первоначальной последовательности зародышевого типа, сохранены или мутированы с получением соответствующего остатка другой последовательности зародышевого типа. После получения антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или более мутаций зародышевого типа, могут быть легко протестированы в отношении одного или более требуемых свойств, таких как улучшение специфичности связывания, повышение аффинности связывания, улучшение или усиление биологических антагонистических или агонистических свойств (в случае необходимости), снижение иммуногенности и т. п. Настоящим изобретением охвачены антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные с помощью этого общего способа.

[066] Настоящее изобретение также включает полностью человеческие моноклональные антитела к CD8, содержащие варианты любых из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе, с одной или более консервативными заменами. Например, настоящее изобретение включает антитела к CD8, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, *например*, с 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т. д. консервативными аминокислотными заменами по отношению к любой

из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе.

[067] Используемый в данном документе термин «антитело человека» подразумевает включение не встречающихся в природе антител человека. Данный термин включает антитела, которые получают рекомбинантным путем у отличного от человека млекопитающего или в клетках отличного от человека млекопитающего. Данный термин не подразумевает включение антител, выделенных от человека-субъекта или полученных у него.

[068] Термин «специфически связывает» или «специфически связывается с» или ему подобный означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют комплекс с антигеном, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфическое связывание можно охарактеризовать с помощью равновесной константы диссоциации, составляющей по меньшей мере приблизительно 5×10^{-8} М или меньше (*например*, меньшее значение K_D означает более сильное связывание). Способы определения того, связываются ли специфически две молекулы, хорошо известны в данной области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т. п. Описанные в данном документе антитела были идентифицированы с помощью поверхностного плазмонного резонанса, *например*, BIACORE™, которые специфически связываются с CD8.

[069] Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т. п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, полученный ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или «фрагмент антитела», используемый в данном документе, относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с CD8.

[070] Термин «выделенное антитело», используемый в данном документе, предназначен для обозначения антитела, которое по существу не предусматривает других антител (Ab), имеющих отличные антигенные специфичности (*например*, выделенное антитело, которое специфически связывается с CD8, или его фрагмент,

который по существу не предусматривает Ab, которые специфически связывают антигены, отличные от CD8).

[071] Термин «поверхностный плазмонный резонанс», используемый в данном документе, относится к оптическому феномену, который делает возможным анализ биомолекулярных взаимодействий в реальном времени посредством выявления изменений концентраций белков в биосенсорной матрице, например, с помощью системы BIAcore™ (Pharmacia Biosensor AB, Уппсала, Швеция, и Пискатауэй, Нью-Джерси).

[072] Используемый в данном документе термин «K_D» предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

[073] Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в варибельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут оказывать различные биологические эффекты. Термин «эпитоп» также относится к сайту на антигене, в отношении которого отвечают В-и/или Т-клетки. Он также относится к области антигена, с которой связывается антитело. Эпитопы можно определять как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы в общем представляют собой подгруппу структурных эпитопов и содержат те остатки, которые непосредственно обуславливают свойство аффинности взаимодействия. Также эпитопы могут быть конформационными, т. е. состоять из нелинейных аминокислот. В определенных вариантах осуществления эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группировки молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и в определенных вариантах осуществления могут иметь специфические характеристики трехмерных структур и/или специфические характеристики заряда.

[074] Термин «идентичность по существу» или «по существу идентичный» по отношению к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту указывает на то, что при оптимальном выравнивании соответствующих вставок или делеций с другой

нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной нитью) идентичность нуклеотидной последовательности составляет по меньшей мере приблизительно 90% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, измеренная с помощью хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP.

[075] Применительно к полипептидам термин «сходство по существу» или «по существу сходный» означает, что две последовательности пептидов при оптимальном выравнивании, как, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием значений штрафа за открытие гэпа по умолчанию характеризуются по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 95%, 98% или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно положения остатков, не являющихся идентичными, отличаются по консервативным аминокислотным заменам. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен на другой аминокислотный остаток, содержащий боковую цепь (R-группу) со сходными химическими свойствами (*например*, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена по существу не будет изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент или степень аналогичности можно регулировать в сторону повышения для коррекции консервативного характера замены. Средства для осуществления такой регулировки хорошо известны специалистам в данной области. См., *например*, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, которая включена в данный документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические боковые цепи с гидроксильными группами: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат; и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин,

глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативной заменой является любое изменение с положительным значением в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-45, которая включена в данный документ посредством ссылки. «Умеренно консервативной» заменой является любое изменение с неотрицательным значением в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250. Сходство последовательностей полипептидов обычно измеряют с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка сопоставляет сходные последовательности с помощью измерений сходства, присвоенного различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программный пакет GCG включает программы, такие как GAP и BESTFIT, которые могут быть применены с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнить с помощью FASTA с применением параметров по умолчанию или рекомендованных параметров, программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и расчет процента идентичности последовательностей в областях с наибольшим перекрытием между запрашиваемой и найденной последовательностями (Pearson (2000), *выше*). Другим предпочтительным алгоритмом для сравнения последовательности по настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из различных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности, BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

[076] Выражение «терапевтически эффективное количество» означает количество, которое приводит к требуемому эффекту, ради которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения и будет установлено специалистом в данной области с помощью известных методик (см., например, Lloyd (1999) *The Art,*

Science and Technology of Pharmaceutical Compounding).

[077] Используемый в данном документе термин «субъект» относится к животному, предпочтительно млекопитающему, нуждающемуся в снижении тяжести, предупреждении и/или лечении заболевания или нарушения, таких как хроническая инфекция, рак или аутоиммунное заболевание.

II. Общее описание

[078] CD8 экспрессируется на цитотоксических Т-клетках, которые образуются в тимусе и экспрессируют Т-клеточный рецептор. CD8 экспрессируется в виде димерного корцептора, обычно содержащего один белок CD8 α и один белок CD8 β . CD8⁺ Т-клетки распознают пептиды, презентированные МНС I, и гетеродимер CD8 связывается с $\alpha 3$ МНС I во время презентирования антигена. Активированные CD8⁺ Т-клетки участвуют в элиминации инфицированных или злокачественных клеток, а также участвуют в аутоиммунном заболевании.

[079] Полностью человеческие антитела к CD8, описанные в данном документе, демонстрируют специфическое связывание с CD8 α и/или CD8 β . Такие антитела можно применять для лечения хронической инфекции, рака или аутоиммунного заболевания.

[080] В определенных вариантах осуществления антитела, предусмотренные в данном документе, получены от мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как белок CD8 α человека и/или белок CD8 β человека, который можно приобрести коммерчески или можно получить рекомбинантным способом. Полноразмерные аминокислотные последовательности CD8 α человека и CD8 β человека показаны под SEQ ID NO: 18 и 20 соответственно. В определенных вариантах осуществления антитела, предусмотренные в данном документе, получены от мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как ДНК CD8 α человека и/или ДНК CD8 β человека. Полноразмерную последовательность нуклеиновой кислоты CD8 α человека можно найти под SEQ ID NO: 17. Полноразмерную последовательность нуклеиновой кислоты CD8 β человека можно найти под SEQ ID NO: 19.

[081] Иммуноген может быть биологически активным и/или иммуногенным фрагментом рекомбинантно полученного CD8, слитым белком, ДНК, кодирующей его активный фрагмент, или ДНК, кодирующей весь белок CD8 α или белок CD8 β . Фрагмент может быть получен из N-конца или C-конца CD8 α человека и CD8 β

человека или из любого участка в пределах аминокислотных последовательностей CD8 α человека и CD8 β человека.

Получение антител человека

[082] Способы создания антител человека у трансгенных мышей известны из уровня техники. Любые такие известные способы можно применять в контексте настоящего изобретения для создания человеческих антител, которые специфически связываются с CD8.

[083] С помощью технологии VELOCIMMUNE™ (см., например, патентный документ US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа получения моноклональных антител первоначально выделяют высокоаффинные химерные антитела к CD8, характеризующиеся человеческой вариабельной областью и мышшиной константной областью. Технология VELOCIMMUNE® предусматривает получение трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий человеческие вариабельные области тяжелых и легких цепей, функционально связанные с эндогенными локусами мышшиных константных областей, за счет чего мышь в ответ на стимуляцию антигеном продуцирует антитело, содержащее человеческую вариабельную область и мышшиную константную область. ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелых и легких цепей антитела, выделяют и осуществляют функциональное связывание с ДНК, кодирующей человеческие константные области тяжелой и легкой цепей. Затем обеспечивают экспрессию ДНК в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

[084] Как правило, в мышшь VELOCIMMUNE® вводят представляющий интерес антиген, и из мышей, которые экспрессируют антитела, выделяют лимфатические клетки (такие как В-клетки). Лимфатические клетки можно подвергнуть слиянию с линией миеломных клеток с получением immortalized линий клеток гибридомы, и такие линии клеток гибридомы подвергают скринингу и отбирают для идентификации линий клеток гибридомы, которые продуцируют антитела, специфические к представляющему интерес антигену. ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи, можно выделять и связывать с константными областями требуемых изотипов тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела может продуцироваться в клетке, такой как клетка CHO.

Альтернативно, ДНК, кодирующую антигенспецифические химерные антитела или переменные домены легкой и тяжелой цепей, можно выделять непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

[085] Первоначально выделяют высокоаффинные химерные антитела, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Как показано в приведенном ниже экспериментальном разделе, антитела характеризуют и отбирают в отношении требуемых характеристик, включая аффинность, селективность, эпитоп и т. д. Мышиные константные области заменяют на требуемые человеческие константные области с получением полностью человеческого антитела, предусмотренного данным документом, например, IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4. Хотя отобранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, характеристики, заключающиеся в высокой аффинности связывания антигена или специфичности к мишени, присущи переменной области.

[086] В целом, предусмотренные данным документом антитела обладают очень высокими значениями аффинности, как правило, характеризуются K_D , составляющей от приблизительно 10^{-12} до приблизительно 10^{-8} М при измерении по связыванию с антигеном, либо иммобилизованным на твердой фазе, либо в жидкой фазе. Для получения полностью человеческих антител мышинные константные области заменяют на необходимые человеческие константные области. Хотя отобранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, характеристики, заключающиеся в высокой аффинности связывания антигена или специфичности к мишени, присущи переменной области.

Биологические эквиваленты

[087] Антитела к CD8 и фрагменты антител, предусмотренные данным документом, охватывают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связывать CD8. Такие варианты антител и фрагментов антител содержат одно или более из добавлений, делеций или замен аминокислот при сравнении с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по существу эквивалентна активности описанных антител. Аналогичным

образом, предусмотренные данным документом последовательности ДНК, кодирующие антитело, охватывают последовательности, которые содержат одно или более из добавлений, делеций или замен нуклеотидов при сравнении с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которые по существу являются биологическими эквивалентами антитела или фрагмента антитела, раскрытых в данном документе.

[088] Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биологическими эквивалентами, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и/или степень поглощения которых значительно не отличаются при введении одинаковой молярной дозы в сходных экспериментальных условиях в случае либо однократных доз, либо множества доз. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны в степени их поглощения, но не в скорости их поглощения, и все еще могут считаться биологически эквивалентными, поскольку такие различия в скорости поглощения предусмотрены и отражены при введении метки, не являются существенными для достижения в организме эффективных концентраций лекарственного средства, *например*, при длительном применении, и считаются несущественными с медицинской точки зрения в случае конкретного исследуемого лекарственного продукта.

[089] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологическими эквивалентами, если отсутствуют клинически значимые различия в отношении их безопасности, чистоты и активности.

[090] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологическими эквивалентами, если у субъекта один или более раз можно осуществить переход с эталонного продукта на биологический продукт без ожидаемого повышения риска неблагоприятных эффектов, в том числе клинически значимого изменения иммуногенности или уменьшения эффективности, по сравнению с длительной терапией без такого перехода.

[091] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологическими эквивалентами, если они оба действуют согласно общему механизму или механизмам действия по отношению к условию или условиям

применения, в том объеме, в котором такие механизмы известны.

[092] Биологическую эквивалентность можно выявить с помощью *in vivo* и/или *in vitro* способов. Измерения биологической эквивалентности включают, *например*, (a) *in vivo* тестирование у людей или других млекопитающих, при котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме крови, сыворотке крови или других биологических жидкостях в зависимости от времени; (b) *in vitro* тестирование, которое коррелировало с данными *in vivo* тестирования биологической доступности у человека и достаточно прогнозировало их; (c) *in vivo* тестирование у людей и других млекопитающих, у которых соответствующий ранний фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют в зависимости от времени; и (d) строго контролируемое клиническое испытание, в котором устанавливают безопасность, эффективность, или биологическую доступность, или биологическую эквивалентность антитела.

[093] Биологически эквивалентные варианты антител, предусмотренного данным документом, можно сконструировать с помощью, *например*, осуществления разных замен остатков или последовательностей или делеции концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. *Например*, остатки цистеина, не являющиеся значимыми для биологической активности, можно подвергнуть делеции или заменить на другие аминокислоты для предупреждения образования нежелательных или несоответствующих внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других ситуациях биологически эквивалентные антитела могут включать варианты антител, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, *например*, мутации, которые обеспечивают устранение или удаление гликозилирования.

Терапевтическое введение и составы

[094] Данным документом предусмотрены терапевтические композиции, содержащие антитела к CD8 или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению. Введение терапевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением будут осуществлять подходящим путем, включая без ограничения внутривенно, подкожно, внутримышечно, интраназально, с подходящими носителями,

вспомогательными веществами и другими средствами, которые включают в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и т. п. Множество подходящих составов можно найти в справочнике, хорошо известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воска, масла, липиды, содержащие (катионные или анионные) липиды пузырьки (такие как LIPOFECTIN™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа «масло воде» и «вода в масле», эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли с различной молекулярной массой), полужидкие гели и полужидкие смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell *et al.* «Compendium of excipients for parenteral formulations» PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

[095] Доза антитела может варьироваться в зависимости от возраста и размера субъекта, которому будут осуществлять введение, целевого заболевания, состояний, пути введения и т. п.

[096] Известны различные системы доставки, и их можно применять для введения фармацевтических композиций, предусмотренных данным документом, например, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu *et al.*, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают без ограничения внутрикожный, трансдермальный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным способом, например инфузией или болюсной инъекцией, абсорбцией через эпителиальные или кожно-слизистые покровы (например, слизистую ротовой полости, слизистую прямой кишки и кишечника и др.), и ее можно вводить совместно с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным.

[097] Фармацевтическую композицию также можно доставлять в везикуле, в частности, липосоме (см., например, Langer, 1990, Science 249: 1527-1533).

[098] В определенных ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте

осуществления можно использовать помпу. В другом варианте осуществления можно использовать полимерные материалы. В еще одном варианте осуществления систему с контролируемым высвобождением можно поместить вблизи мишени для композиции, при этом требуется лишь часть системной дозы.

[099] Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных, и внутримышечных инъекций, для капельных инфузий и т. п. Эти инъекционные препараты можно получить с помощью общеизвестных способов. Например, инъекционные препараты можно получить, *например*, растворением, суспендированием или эмульгированием антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемых для инъекций. Водной средой для инъекций, является, *например*, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т. п., которые можно использовать в комбинации с подходящим солюбилизующим средством, таким как спирт (*например*, этанол), многоатомный спирт (*например*, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [*например*, полисорбат 80, НСО-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т. п. В качестве масляной среды используют, *например*, кунжутное масло, соевое масло и т. п., которые можно использовать в комбинации с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т. п. Полученным таким способом инъекционным составом предпочтительно наполняют подходящую ампулу.

[0100] Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, то при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению с легкостью можно применять устройство для доставки по типу шприц-ручки. Такое устройство для доставки по типу шприц-ручки может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве для доставки по типу шприц-ручки обычно используют сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция из картриджа была введена и картридж опустел, пустой картридж можно легко выбросить и поместить новый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Устройство для доставки по типу шприц-ручки затем можно повторно

использовать. В случае одноразового устройства для доставки по типу шприц-ручки сменный картридж отсутствует. Вернее, одноразовое устройство для доставки по типу шприц-ручки предварительно заполнено фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. После опустошения из резервуара фармацевтической композиции выбрасывают все устройство.

[0101] При подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению применяют разнообразные многоразовые шприц-ручки и автоинжекторные устройства для доставки. Примеры включают, разумеется, без ограничения AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин-Лэйкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), при этом упомянуты лишь несколько из них. Примеры одноразовых устройств для доставки по типу шприц-ручки, применяемых при подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, разумеется, без ограничения шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Таузанд-Окс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Эббот-Парк, Иллинойс), при этом упомянуты лишь несколько из них.

[0102] Преимущественно описанные выше фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения получают в лекарственных формах в стандартной дозе, приспособленной таким образом, чтобы она соответствовала дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в стандартной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т. д.

III. Меченные радиоактивной меткой иммуноконъюгаты антител к CD8 для иммуно-РЕТ-визуализации

[0103] Данным документом предусмотрены меченные радиоактивной меткой

антигенсвязывающие белки, которые связываются с CD8. В некоторых вариантах осуществления меченные радиоактивной меткой антигенсвязывающие белки предусматривают антигенсвязывающий белок, ковалентно связанный с позитронным излучателем. В некоторых вариантах осуществления меченные радиоактивной меткой антигенсвязывающие белки предусматривают антигенсвязывающий белок, ковалентно связанный с одним или более хелатообразующими фрагментами, которые представляют собой химические фрагменты, способные образовывать хелатный комплекс с позитронным излучателем.

[0104] К подходящим меченым радиоактивной меткой антигенсвязывающим белкам, например, меченым радиоактивной меткой антителам, относятся такие, которые не нарушают или по существу не нарушают функцию Т-клеток при воздействии меченым радиоактивной меткой антигенсвязывающим белком. В некоторых вариантах осуществления меченный радиоактивной меткой антигенсвязывающий белок, который связывает CD8, является слабым блокатором функции CD8 Т-клеток, т. е. функция Т-клеток не нарушается или по существу не нарушается при воздействии меченого радиоактивной меткой антитела. Применение меченого радиоактивной меткой связывающего CD8 белка, оказывающего минимальное влияние на опосредованную CD8 функцию Т-клеток в соответствии со способами, предусмотренными данным документом, обеспечивает то, что субъект, которого подвергают лечению с помощью такой молекулы, не будет получать негативных эффектов вследствие неспособности его Т-клеток устранять инфекцию.

[0105] В некоторых вариантах осуществления предусмотрены антигенсвязывающие белки, которые связываются с CD8, *например*, антитела, где указанные антигенсвязывающие белки, которые связываются с CD8, ковалентно связаны с одним или более фрагментами, имеющими следующую структуру:

$$-L-M_z,$$

где L представляет собой хелатообразующий фрагмент, M представляет собой позитронный излучатель, и z независимо в каждом случае равняется 0 или 1, и при этом по меньшей мере один из z равняется 1.

[0106] В некоторых вариантах осуществления меченный радиоактивной меткой антигенсвязывающий белок представляет собой соединение формулы (I):



(I),

где A представляет собой белок, который связывает CD8, L представляет собой хелатообразующий фрагмент, M представляет собой позитронный излучатель, z равняется 0 или 1, и k представляет собой целое число от 0 до 30. В некоторых вариантах осуществления k равняется 1. В некоторых вариантах осуществления k равняется 2.

[0107] В определенных вариантах осуществления меченный радиоактивной меткой антигенсвязывающий белок представляет собой соединение формулы (II):



(II),

где A представляет собой белок, который связывает CD8, L представляет собой хелатообразующий фрагмент, M представляет собой позитронный излучатель, и k представляет собой целое число от 1 до 30.

[0108] В некоторых вариантах осуществления данным документом предусмотрены композиции, содержащие конъюгат, имеющий следующую структуру:



где A представляет собой белок, который связывает CD8, L представляет собой хелатообразующий фрагмент, и k представляет собой целое число от 1 до 30; при этом конъюгат образует хелатное соединение с позитронным излучателем в количестве, достаточном для обеспечения специфической активности, подходящей для клинической ПЕТ-визуализации.

[0109] Ниже представлены подходящие связывающие белки, хелатообразующие фрагменты и позитронные излучатели.

A. Связывающие CD8 белки

[0110] Подходящие связывающие CD8 белки специфически связываются с CD8 и включают белки, которые описаны в WO 2014/164553, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Иллюстративным белком, связывающим CD8, предусмотренным данным документом, является моноклональное

антитело, называемое далее в данном документе mAb1, предусматривающее характеристики последовательностей нуклеиновой кислоты и аминокислотных последовательностей, изложенных в таблице 1.

Таблица 1. Идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты и аминокислотных последовательностей

mAb1	SEQ ID NO							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты	1	3	5	7	9	11	13	15
Идентификаторы аминокислотных последовательностей	2	4	6	8	10	12	14	16

В таблице 1 изложены идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты и идентификаторы аминокислотных последовательностей варибельной области тяжелой цепи (HCVR), варибельной области легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител к CD8.

[0111] В некоторых вариантах осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие HCVR, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 или по существу сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0112] В некоторых вариантах осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие LCVR, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 или по существу сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0113] В некоторых вариантах осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие пару

аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR) под SEQ ID NO: 2/10, например, mAb1.

[0114] В некоторых вариантах осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 4 или по существу сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0115] В некоторых вариантах осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) под SEQ ID NO: 6 или по существу сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0116] В некоторых вариантах осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) под SEQ ID NO: 8 или по существу сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0117] В некоторых вариантах осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 12 или по существу сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0118] В некоторых вариантах осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи (LCDR2) под SEQ ID NO: 14 или по существу сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью

последовательности.

[0119] В некоторых вариантах осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи (LCDR3) под SEQ ID NO: 16 или по существу сходную с ней последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

[0120] В некоторых вариантах осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), которая содержит SEQ ID NO: 8/16.

[0121] В некоторых вариантах осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие набор из шести CDR (т. е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в иллюстративном антителе к CD8, представленных в таблице 1. В определенных вариантах осуществления комбинация аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 содержит SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16.

[0122] В некоторых вариантах осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие набор из шести CDR (т. е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 2/10. Способы и методики идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны из уровня техники и могут быть применены для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрытых в данном документе. К иллюстративным общепринятым способам, которые можно применять для идентификации границ CDR, относятся, *например*, определение по Kabat, определение по Chothia и определение по AbM. В общих чертах, определение по Kabat основано на вариативности последовательности, определение по Chothia основано на местоположении структурных областей петли, а определение по AbM является компромиссным решением между подходами по Kabat и Chothia. *См., например*, Kabat, «Sequences of Proteins of Immunological Interest,» National Institutes of

Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); и Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Также для идентификации последовательностей CDR в антителе доступны открытые базы данных.

[0123] В некоторых вариантах осуществления связывающие белки представляют собой антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют за специфическое связывание с CD8 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащими CDR из HCVR и CDR из LCVR, при этом пара аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR содержит SEQ ID NO: 2/10.

[0124] Данным документом также предусмотрены выделенные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с CD8 и подавляют продуцирование IFN γ в активированных CD8-положительных Т-клетках. В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению, которые связываются с CD8 и подавляют продуцирование IFN γ в активированных CD8-положительных Т-клетках, содержат CDR из HCVR, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и CDR из LCVR, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10.

[0125] Данным документом также предусмотрены выделенные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с CD8 и ингибируют белок-активатор фактора транскрипции (AP-1) в активированных Т-клетках. В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению, которые связываются с CD8 и ингибируют AP-1 в активированных Т-клетках, включают CDR из HCVR, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и CDR из LCVR, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10.

[0126] В некоторых вариантах осуществления связывающие белки представляют собой антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с CD8 человека или другого вида. В определенных вариантах осуществления антитела могут связываться с CD8 человека и/или CD8 яванского макака.

[0127] В некоторых вариантах осуществления связывающие белки представляют собой антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые перекрестно конкурируют за связывание с CD8 с эталонным антителом или его

антигенсвязывающим фрагментом, содержащими CDR из HCVR и CDR из LCVR, при этом каждая из HCVR и LCVR содержит пару аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 2/10.

[0128] В одном варианте осуществления связывающий белок представляет собой выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые имеют одну или более из следующих характеристик: (a) представляют собой полностью человеческое моноклональное антитело; (b) связываются с CD8 с K_D , равной $3,5 \times 10^{-8}$ М или меньше, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса; (c) связываются с CD8 α человека; (d) подавляют продуцирование IFN γ в активированных CD8 Т-клетках; (e) ингибируют белок-активатор фактора транскрипции (AP-1) в активированных Т-клетках; (f) перекрестно реагирует с CD8 человека и обезьяны; (g) содержат три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) под SEQ ID NO: 2; и (h) содержат три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи (LCVR) под SEQ ID NO: 10.

[0129] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут специфически связываться с CD8 агонистическим образом, т. е. они могут обеспечивать усиление или стимуляцию связывания и/или активности CD8; в других вариантах осуществления антитело может специфически связываться с CD8 антагонистическим образом, т. е. оно может блокировать связывание CD8 с природным партнером CD8 по связыванию.

[0130] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут специфически связываться с CD8 нейтральным образом, т. е. они связываются, но не блокируют, или не обеспечивают усиление или стимуляцию связывания и/или активности CD8.

[0131] В некоторых вариантах осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты связываются с CD8, например, CD8 α или CD8 β , с полупериодом диссоциации ($t_{1/2}$), превышающим приблизительно 2,0 минуты, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C, например, с применением формата анализа, который определен в примере 2, или по

существованию сходного анализа. В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с CD8 с $t_{1/2}$, составляющим более приблизительно 5 минут, более приблизительно 10 минут, более приблизительно 30 минут, более приблизительно 50 минут, более приблизительно 60 минут, более приблизительно 70 минут, более приблизительно 80 минут, более приблизительно 90 минут, более приблизительно 100 минут, более приблизительно 200 минут, более приблизительно 300 минут, более приблизительно 400 минут, более приблизительно 500 минут, более приблизительно 600 минут, более приблизительно 700 минут, более приблизительно 800 минут, более приблизительно 900 минут, более приблизительно 1000 минут или более приблизительно 1100 минут, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C, *например*, с применением формата анализа, который определен в примере 2 (*например*, формата захвата mAb или захвата антигена), или по существованию сходного анализа.

[0132] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с клеткой, экспрессирующей CD8 человека, с EC_{50} , составляющей менее приблизительно 1 нМ, измеренной с помощью анализа проточной цитометрии, который определен в примере 6, или по существованию сходного анализа. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с клеткой, экспрессирующей hCD8, с EC_{50} , составляющей менее приблизительно 0,9 нМ, менее приблизительно 0,8 нМ, менее приблизительно 0,7 нМ, менее приблизительно 0,6 нМ, менее приблизительно 0,5 нМ или менее приблизительно 0,4 нМ, измеренной с помощью анализа проточной цитометрии, *например*, с применением формата анализа в примере 6 или по существованию сходного анализа.

[0133] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с клеткой, экспрессирующей CD8 яванского макака, с EC_{50} , составляющей менее приблизительно 1 нМ, измеренной с помощью анализа проточной цитометрии, определенного в примере 6, или по существованию сходного анализа. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с клеткой, экспрессирующей CD8 человека, с EC_{50} , составляющей менее приблизительно 0,9 нМ, менее приблизительно 0,8 нМ, менее приблизительно 0,7 нМ, менее приблизительно 0,6 нМ, менее

приблизительно 0,5 нМ или менее приблизительно 0,4 нМ, измеренной с помощью анализа проточной цитометрии, *например*, с помощью формата анализа в примере 6 или по существу сходного анализа.

[0134] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты обеспечивают ослабление или блокирование активации CD8-положительных Т-клеток с EC_{50} , составляющей менее $1,2E-09$ М, измеренной с помощью анализа с применением Т-клеток/репортера люциферазы APC, определенного в примере 8, или по существу сходного анализа. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты обеспечивают блокирование активации CD8-положительных Т-клеток на по меньшей мере приблизительно 85% или на приблизительно 89% с EC_{50} , измеренной с помощью анализа с применением Т-клеток/репортера люциферазы APC, *например*, с помощью формата анализа, который определен в примере 8, или по существу сходного анализа.

[0135] В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент представляют собой полностью человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD8, при этом антитело или его фрагмент демонстрируют одну или более из следующих характеристик: (i) содержат аминокислотную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 2 или по существу сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (ii) содержит аминокислотную последовательность LCVR, выбранную из SEQ ID NO: 10, или по существу сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (iii) содержат пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 под SEQ ID NO: 8/16 или по существу сходных с ней последовательностей, характеризующихся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (iv) содержат пару аминокислотных последовательностей HCDR1/LCDR1 под SEQ ID NO: 4/12 или по существу сходных с ней последовательностей, характеризующихся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью

последовательности; пару аминокислотных последовательностей HCDR2/LCDR2 под SEQ ID NO: 6/14 или по существу сходных с ней последовательностей, характеризующихся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 под SEQ ID NO: 8/16 или по существу сходных с ней последовательностей, характеризующихся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (v) связывают CD8 человека с равновесной константой диссоциации связывания (K_D), составляющей менее приблизительно $3,5 \times 10^{-8}$ М, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (vi) подавляют продуцирование IFN γ в активированных CD8-положительных Т-клетках; и (vii) ингибируют белок-активатор фактора транскрипции (AP-1) в активированных Т-клетках.

[0136] В определенных вариантах осуществления антитела могут функционировать путем блокирования или подавления активности связывания МНС I класса, ассоциированной с CD8 α , с помощью связывания с любой областью или фрагментом полноразмерного белка, аминокислотная последовательность которого показана под SEQ ID NO: 18. В определенных вариантах осуществления антитела могут функционировать путем блокирования или подавления активности связывания МНС I класса, ассоциированной с CD8 β , с помощью связывания с любой областью или фрагментом полноразмерного белка, аминокислотная последовательность которого показана под SEQ ID NO: 20.

[0137] В определенных вариантах осуществления антитела к CD8 или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом в пределах любой одной или более областей, проиллюстрированных в CD8 α , либо в природной форме, как проиллюстрировано под SEQ ID NO: 18, либо полученной рекомбинантным способом, либо его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления антитела связываются с внеклеточной областью, содержащей одну или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков 22–182 из CD8 α . В определенных вариантах осуществления антитела к CD8 или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом в пределах любой одной или более областей, проиллюстрированных в CD8 β , либо в природной форме, как проиллюстрировано под

SEQ ID NO: 20, либо полученной рекомбинантным способом, либо его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления антитела связываются с внеклеточной областью, содержащей одну или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков 22–170 из CD8 β .

[0138] В определенных вариантах осуществления антитела к CD8 и их антигенсвязывающие фрагменты взаимодействуют с одним или более эпитопами, находящимися в пределах внеклеточной области CD8 α (SEQ ID NO: 18) или CD8 β (SEQ ID NO: 20). Эпитоп(-ы) может(могут) состоять из одной или более смежных последовательностей из 3 или больше (*например*, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше) аминокислот, расположенных в пределах внеклеточной области CD8 α или CD8 β . Альтернативно, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в пределах внеклеточной области CD8 α или CD8 β .

[0139] Настоящее изобретение включает антитела к CD8, которые связываются с тем же эпитопом или частью эпитопа, что и конкретное иллюстративное антитело, описанное в данном документе в таблице 1, или антитело, имеющее последовательности CDR иллюстративного антитела, описанного в таблице 1. Аналогичным образом включены также антитела к CD8, которые конкурируют за связывание с CD8 или фрагментом CD8 с конкретным иллюстративным антителом, описанным в данном документе в таблице 1, или антителом, имеющим последовательности CDR иллюстративного антитела, описанного в таблице 1. Например, настоящее изобретение включает антитела к CD8, которые перекрестно конкурируют за связывание с CD8 с одним или более антителами, предусмотренными данным документом (*например*, mAb1).

[0140] Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, специфически связываются с CD8 и модулируют взаимодействие CD8 с МНС I класса. Антитела к CD8 могут связываться с CD8 с высокой аффинностью или низкой аффинностью. В определенных вариантах осуществления антитела представляют собой блокирующие антитела, где антитела связываются с CD8 и блокируют взаимодействие CD8 с МНС I класса. В некоторых вариантах блокирующие антитела по настоящему изобретению блокируют связывание CD8 с МНС I класса и/или ослабляют активность Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления

блокирующие антитела применимы для подавления иммунного ответа и/или для лечения инфекции или аутоиммунного заболевания или нарушения.

[0141] В некоторых вариантах осуществления антитела связываются с CD8 и подавляют продуцирование IFN γ в активированных CD8-положительных Т-клетках. В определенных вариантах осуществления антитела связываются с CD8 и подавляют регуляторную активность Т-клеток, например, ингибируют фактор транскрипции AP-1 в CD8-положительных Т-клетках.

[0142] Определенные антитела к CD8 способны связываться с CD8 и нейтрализовать его активность, как определено с помощью анализов *in vitro* или *in vivo*. Способность антител связываться с CD8 и нейтрализовать его активность можно измерять с помощью любой стандартной методики, известной специалистам в данной области, включая анализы связывания или анализы активности, описанные в данном документе.

[0143] Неограничивающие иллюстративные анализы *in vitro* для измерения активности связывания проиллюстрированы в приведенных в данном документе примерах: в примере 2 показатели аффинности связывания и кинетические константы иллюстративного человеческого антитела к CD8 к CD8 человека определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса, и измерения проводили на приборе Biacore 4000 или T200; в примере 6 применяли флуоресцентный анализ для определения способности антител к CD8 связываться с CD8-положительными Т-клетками и Т-клетками яванского макака; в примере 7 применяли анализы связывания для определения способности антител к CD8 снижать продуцирование IFN γ в CD8-положительных Т-клетках; и в примере 8 применяли анализы связывания для определения способности антител к CD8 изменять транскрипционную активность Т-клеток.

[0144] Если конкретно не указано иное, термин «антитело», используемый в данном документе, следует понимать как охватывающий молекулы антител, которые содержат две тяжелые цепи иммуноглобулинов и две легкие цепи иммуноглобулинов (т. е. «полные молекулы антител»), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т. п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся

в природе, полученный ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или «фрагмент антитела», используемый в данном документе, относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с CD8. Фрагмент антитела может включать Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fv-фрагмент, dAb-фрагмент, фрагмент, содержащий CDR, или выделенную CDR. В определенных вариантах осуществления термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к полипептиду или его фрагменту полиспецифической антигенсвязывающей молекулы. В таких вариантах осуществления термин «антигенсвязывающий фрагмент» включает, например, молекулу МНС II класса, которая специфически связывается с CD8. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, *например*, из полных молекул антител с помощью любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные технологии генной инженерии, включающие манипулирование с ДНК, кодирующей переменные и (необязательно) константные домены антитела, и осуществление ее экспрессии. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, *например*, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, *например*, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать, и с ней можно проводить химические манипуляции или манипуляции с применением методик молекулярной биологии, например, для расположения одного или более переменных и/или константных доменов с образованием подходящей конфигурации или для введения кодонов, включения остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т. д.

[0145] Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (*например*, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), как, например, пептид CDR3) или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как доменспецифические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным

доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетрадела, минитела, нанотела (*например*, моновалентные антитела, бивалентные антитела и т. д.), иммунофармацевтические препараты на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также включены в выражение «антигенсвязывающий фрагмент», используемое в данном документе.

[0146] Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может быть любого размера или аминокислотного состава и будет, как правило, содержать по меньшей мере одну CDR, которая находится в рамке считывания с одной или более каркасными последовательностям или прилегает к ней. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H , связанный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут располагаться относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . В качестве альтернативы, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V_H - или V_L -домен.

[0147] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые можно обнаружить в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (i) V_H - C_H1 , (ii) V_H - C_H2 , (iii) V_H - C_H3 , (iv) V_H - C_H1 - C_H2 , (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 , (vi) V_H - C_H2 - C_H3 , (vii) V_H - C_L , (viii) V_L - C_H1 , (ix) V_L - C_H2 , (x) V_L - C_H3 , (xi) V_L - C_H1 - C_H2 , (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 , (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 и (xiv) V_L - C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, в том числе любых иллюстративных конфигурациях, изложенных выше, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны с помощью целой шарнирной или линкерной области или ее части. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (*например*, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, которые обеспечивают образование гибкой или полугибкой связи между смежными переменными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой

мультимер) из любых конфигураций переменных и константных доменов, изложенных выше, нековалентно связанных друг с другом и/или с одним или более мономерными V_H - или V_L -доменами (например, с помощью дисульфидной(дисульфидных) связи(связей)).

[0148] Антитела к CD8 и фрагменты антител по настоящему изобретению охватывают белки с аминокислотными последовательностями, которые отличаются от последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связывать CD8. Такие варианты антител и фрагментов антител содержат одно или более из добавлений, делеций или замен аминокислот при сравнении с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по существу эквивалентна активности описанных антител. Аналогичным образом, последовательности ДНК по настоящему изобретению, кодирующие антитело, охватывают последовательности, которые содержат одно или более из добавлений, делеций или замен нуклеотидов при сравнении с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которые по сути биологически эквивалентны антителу или фрагменту антитела по настоящему изобретению.

[0149] Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биологическими эквивалентами, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и/или степень поглощения которых значительно не отличаются при введении одинаковой молярной дозы в сходных экспериментальных условиях в случае либо однократной дозы, либо множества доз. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны в степени их поглощения, но не в скорости их поглощения, и все еще могут считаться биологически эквивалентными, поскольку такие различия в скорости поглощения предусмотрены и отражены при введении метки, не являются существенными для достижения в организме эффективных концентраций лекарственного средства, например, при длительном применении, и считаются несущественными с медицинской точки зрения в случае конкретного исследуемого лекарственного продукта.

[0150] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологическими эквивалентами, если отсутствуют клинически значимые различия в их безопасности, чистоте или активности.

[0151] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологическими эквивалентами, если у субъекта один или более раз можно осуществить переход с эталонного продукта на биологический продукт без ожидаемого повышения риска неблагоприятных эффектов, в том числе клинически значимого изменения иммуногенности или уменьшения эффективности, по сравнению с длительной терапией без такого перехода.

[0152] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологическими эквивалентами, если они оба действуют согласно общему механизму или механизмам действия по отношению к условию или условиям применения, в том объеме, в котором такие механизмы известны.

[0153] Биологическую эквивалентность можно выявить с помощью *in vivo* и/или *in vitro* способов. Измерения биологической эквивалентности включают, например, (a) *in vivo* тестирование у людей или других млекопитающих, при котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме крови, сыворотке крови или других биологических жидкостях в зависимости от времени; (b) *in vitro* тестирование, которое коррелировало с данными *in vivo* тестирования биологической доступности у человека и достаточно прогнозировало их; (c) *in vivo* тестирование у людей и других млекопитающих, у которых соответствующий ранний фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют в зависимости от времени; и (d) строго контролируемое клиническое испытание, в котором устанавливают безопасность, эффективность, или биологическую доступность, или биологическую эквивалентность антитела.

[0154] Биологически эквивалентные варианты антител по настоящему изобретению можно сконструировать с помощью, например, осуществления разных замен остатков или последовательностей или делеции концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся значимыми для биологической активности, можно подвергнуть делеции или заменить на другие аминокислоты для предупреждения образования нежелательных или несоответствующих внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других ситуациях биологически эквивалентные антитела могут включать варианты антител, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют

характеристики гликозилирования антител, *например*, мутации, которые обеспечивают устранение или удаление гликозилирования.

Антитела к CD8, содержащие Fc-варианты

[0155] В соответствии с определенными вариантами осуществления по настоящему изобретению антитела к CD8 содержат Fc-домен, содержащий одну или более мутаций, которые обеспечивают усиление или ослабление связывания антитела с FcRn-рецептором, *например*, при кислотном значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Например, настоящее изобретение включает антитела к CD8, содержащие мутацию в C_H2- или C_H3-области Fc-домена, при этом мутация(мутации) обеспечивает(-ют) повышение аффинности Fc-домена к FcRn в кислой среде (*например*, в эндосоме, где значение pH варьируется от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Результатом таких мутаций может быть увеличение периода полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, *например*, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T), или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K), и/или 434 (*например*, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]), или модификацию в положении 250 и/или 428, или модификацию в положении 307 или 308 (*например*, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация предусматривает модификацию 428L (*например*, M428L) и 434S (*например*, N434S), модификацию 428L, 259I (*например*, V259I) и 308F (*например*, V308F), модификацию 433K (*например*, H433K) и 434 (*например*, 434Y), модификацию 252, 254 и 256 (*например*, 252Y, 254T и 256E), модификацию 250Q и 428L (*например*, T250Q и M428L) и модификацию 307 и/или 308 (*например*, 308F или 308P). В еще одном варианте осуществления модификация предусматривает модификацию 265A (*например*, D265A) и/или 297A (*например*, N297A).

[0156] Например, настоящее изобретение включает антитела к CD8, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из 250Q и 248L (*например*, T250Q и M248L), 252Y, 254T и 256E (*например*, M252Y, S254T и T256E), 428L и 434S (*например*, M428L и N434S), 257I и 311I (*например*, P257I и Q311I), 257I и 434H (*например*, P257I и N434H), 376V и 434H

(например, D376V и N434H), 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A) и 433K и 434F (например, H433K и N434F). В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает антитела к CD8, содержащие Fc-домен, содержащий мутацию S108P в шарнирной области IgG4 с обеспечением стабилизации димера. Объемом настоящего изобретения предусмотрены все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций в Fc-домене и другие мутации в переменных доменах антитела, раскрытых в данном документе.

[0157] Настоящее изобретение также включает антитела к CD8, содержащие химерную константную область тяжелой цепи (C_H), где химерная область C_H содержит сегменты, полученные из областей C_H более чем одного изоформа иммуноглобулина. Например, антитела по настоящему изобретению могут содержать химерную область C_H , содержащую часть домена C_{H2} или весь этот домен, полученный из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации с частью домена C_{H3} или всем этим доменом, полученным из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению содержат химерную область C_H с химерной шарнирной областью. Например, химерный шарнир может содержать «верхнюю шарнирную» аминокислотную последовательность (аминокислотные остатки положений 216-227 согласно нумерации EU), полученную из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации с «нижней шарнирной» последовательностью (аминокислотные остатки положений 228-236 согласно нумерации EUt), полученной из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, полученные из верхней шарнирной последовательности IgG1 человека или IgG4 человека, и аминокислотные остатки, полученные из нижней шарнирной последовательности IgG2 человека. Антитело, содержащее химерную область C_H , описанную в данном документе, может, в определенных вариантах осуществления, проявлять эффекторные функции модифицированного Fc без неблагоприятного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, публикацию патента США № 20140243504, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей полноте).

В. Позитронные излучатели и хелатообразующие фрагменты

[0158] Подходящие позитронные излучатели включают без ограничения те, которые образуют стабильные комплексы с хелатообразующим фрагментом и характеризуются периодами физической полужизни, подходящими для целей иммуно-РЕТ-визуализации. Иллюстративные позитронные излучатели включают без ограничения ^{89}Zr , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{44}Sc и ^{86}Y . Подходящие позитронные излучатели также включают те, которые непосредственно связываются со связывающим CD8 белком, включая без ограничения ^{76}Br и ^{124}I , и те, которые введены посредством простетической группы, *например*, ^{18}F .

[0159] Описанные в данном документе хелатообразующие фрагменты, которые представляют собой химические фрагменты, которые ковалентно связаны со связывающим CD8 белком, *например*, антителом к CD8, и содержат часть, способную образовывать хелатное соединение с позитронным излучателем, *т. е.* способную вступать в реакцию с позитронным излучателем с образованием координированного хелатного комплекса. Подходящие фрагменты включают фрагменты, которые обеспечивают эффективную загрузку конкретного металла и образуют комплексы металл-хелатор, которые являются достаточно стабильными *in vivo* в случае диагностических путей применения, *например*, для иммуно-РЕТ-визуализации. Иллюстративные хелатообразующие фрагменты включают фрагменты, которые обеспечивают сведение к минимуму диссоциации позитронного излучателя и его накопление в минеральном костном веществе, белках плазмы крови и/или его отложение в костном мозге до степени, подходящей для диагностических путей применения.

[0160] Примеры хелатообразующих фрагментов включают без ограничения фрагменты, которые образуют стабильные комплексы с позитронными излучателями ^{89}Zr , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{44}Sc и/или ^{86}Y . Иллюстративные хелатообразующие фрагменты включают без ограничения фрагменты, описанные в *Nature Protocols*, 5(4): 739, 2010; *Bioconjugate Chem.*, 26(12): 2579 (2015); *Chem Commun (Camb)*, 51(12): 2301 (2015); *Mol. Pharmaceutics*, 12: 2142 (2015); *Mol. Imaging Biol.*, 18: 344 (2015); *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 37:250 (2010); *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* (2016). doi:10.1007/s00259-016-3499-x; *Bioconjugate Chem.*, 26(12): 2579 (2015); WO 2015/140212A1 и US 5639879, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0161] Иллюстративные хелатообразующие фрагменты также включают без ограничения фрагменты, которые включают десферриоксамин (ДФО), 1,4,7,10-тетрауксусную кислоту (ДОТА), диэтилентриаминпентауксусную кислоту (ДТПА), этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЕДТА), (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетра(метиленфосфоновую) кислоту (ДОТР), 1R, 4R, 7R, 10R) - α' " α "-тетраметил-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту (ДОТМА), 1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрауксусную кислоту (ТЕТА), Н₄октапа, Н₆фосфа, Н₂депа, Н₅декапа, Н₂запа, НОРО, DO2A, 1,4,7,10-тетракис(карбамоилметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан (ДОТАМ), 1,4,7-триазациклононан-N,N',N''-триуксусную кислоту (НОТА), 1,4,7,10-тетракис(карбамоилметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан (ДОТАМ), 1,4,8,11 -тетраазабицикло[6.6.2]гексадекан-4,11-дикетиновую кислоту (СВ-ТЕ2А), 1,4,7,10-тетраазациклододекан (циклен), 1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан (циклам), октадентатные хелаторы, гексадентатные хелаторы, фосфонатные хелаторы, макроциклические хелаторы, хелаторы, содержащие макроциклические терефталамидные лиганды, бифункциональные хелаторы, фузаринин С и хелаторы, которые представляют собой производные фузаринина С, триацетилфузарин С (ТАФС), ферриоксамин Е (ФОХЕ), ферриоксамин В (ФОХВ), феррихром А (ФСНА) и т. п.

[0162] В некоторых вариантах осуществления хелатообразующие фрагменты ковалентно связаны со связывающим CD8 белком, *например*, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, посредством линкерного фрагмента, который ковалентно присоединяет хелатообразующую часть хелатообразующего фрагмента к связывающему белку. В некоторых вариантах осуществления эти линкерные фрагменты образованы в результате реакции между реакционноспособным фрагментом связывающего CD8 белка, *например*, цистеином или лизином антитела, и реакционноспособным фрагментом, который присоединен к хелатору, включая, *например*, п-изотиоцианатобенильную группу и реакционноспособные фрагменты, представленные ниже в способах конъюгации. Кроме того, такие линкерные фрагменты необязательно содержат химические группы, используемые в целях регулирования полярности, растворимости, стерических взаимодействий, жесткости и/или длины между хелатообразующей частью и связывающим CD8 белком.

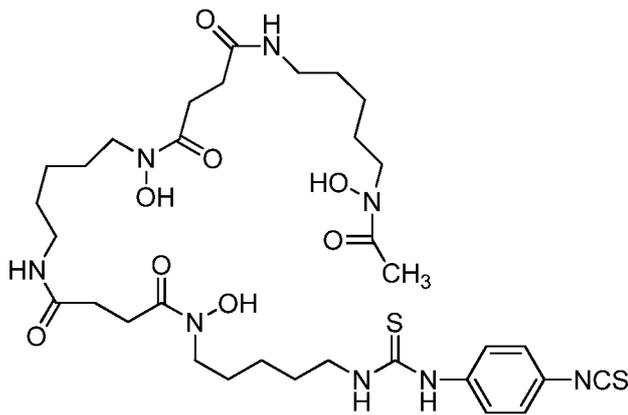
С. Получение меченных радиоактивной меткой конъюгатов на основе антитела к CD8

[0163] Меченные радиоактивной меткой конъюгаты на основе белка, воздействующего на CD8, можно получать путем (1) осуществления реакции связывающего CD8 белка, *например*, антитела, с молекулой, содержащей хелатор с позитронным излучателем и фрагмент, вступающий в реакцию с требуемым участком конъюгации связывающего CD8 белка, и (2) загрузки требуемого позитронного излучателя.

[0164] Подходящие участки конъюгации включают без ограничения участки по лизину и цистеину, которые могут, *например*, быть природными или сконструированными, и могут, *например*, присутствовать в тяжелой или легкой цепи антитела. Участки конъюгации по цистеину включают без ограничения участки, полученные путем мутации, вставки или восстановления дисульфидных связей антитела. Способы получения антител со сконструированным остатком цистеина включают без ограничения способы, раскрытые в WO 2011/056983. Сайтспецифические способы конъюгации также можно применять для направления реакции конъюгации к конкретным участкам антитела, получения требуемой стехиометрии и/или достижения требуемого соотношения хелатора и антитела. Такие способы конъюгации известны специалистам в данной области техники и включают без ограничения конструирование по остатку цистеина и ферментативные и химико-ферментативные способы, включая без ограничения конъюгацию по остатку глутамина, конъюгацию в Q295 и конъюгацию, опосредованную трансглутаминазой, а также те, которые описаны в *J.Clin.Immunol.*, 36: 100 (2016), включенном в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Подходящие фрагменты, вступающие в реакцию с требуемым участком конъюгации, обычно обеспечивают эффективное и легкое связывание связывающего CD8 белка, *например*, антитела и хелатора позитронного излучателя. Фрагменты, вступающие в реакцию с лизиновыми и цистеиновыми участками, включают электрофильные группы, которые известны специалистам в данной области. В определенных аспектах, когда требуемым участком конъюгации является остаток лизина, реакционноспособный фрагмент представляет собой изотиоцианат, *например*, п-изотиоцианатобенильную группу или реакционноспособный сложный эфир. В определенных аспектах, когда требуемым

участком конъюгации является остаток цистеина, реакционноспособный фрагмент представляет собой малеимид.

[0165] Когда хелатор представляет собой десферриоксамин (ДФО), подходящие реакционноспособные фрагменты включают без ограничения изотиоцианатобензильную группу, сложный *n*-гидроксисукцинимидный эфир, сложный 2,3,5,6-тетрафторфенольный эфир, *n*-сукцинимидил-*S*-ацетилтиоацетат и описанные в *BioMed Research International*, Vol 2014, ID статьи 203601, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В определенных вариантах осуществления связывающий CD8 белок представляет собой антитело, и молекула, содержащая хелатор позитронного излучателя и фрагмент, вступающий в реакцию с участком конъюгации, представляет собой *p*-изотиоцианатобензилдесферриоксамин (*p*-SCN-Bn-DFO):



[0166] Загрузку позитронного излучателя осуществляют путем инкубирования конъюгата хелатора и связывающего CD8 белка с позитронным излучателем в течение времени, достаточного для обеспечения координационной связи указанного позитронного излучателя с хелатором, *например*, путем осуществления способов, описанных в приведенных в данном документе примерах, или по существу сходного способа.

D. Иллюстративные варианты осуществления конъюгатов

[0167] В настоящее изобретение включены меченные радиоактивной меткой конъюгаты на основе антитела, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD8 человека, и позитронный излучатель. Также в настоящее изобретение включены меченные радиоактивной меткой конъюгаты на основе антитела, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

которые связываются с CD8 человека, хелатообразующий фрагмент и позитронный излучатель.

[0168] В некоторых вариантах осуществления хелатообразующий фрагмент предусматривает хелатор, способный образовывать комплекс с ^{89}Zr . В определенных вариантах осуществления хелатообразующий фрагмент предусматривает десферриоксамин. В определенных вариантах осуществления хелатообразующий фрагмент представляет собой п-изотиоцианатобензилдесферриоксамин.

[0169] В некоторых вариантах осуществления позитронный излучатель представляет собой ^{89}Zr . В некоторых вариантах осуществления менее 1,0% антитела к CD8 конъюгировано с позитронным излучателем, менее 0,9% антитела к CD8 конъюгировано с позитронным излучателем, менее 0,8% антитела к CD8 конъюгировано с позитронным излучателем, менее 0,7% антитела к CD8 конъюгировано с позитронным излучателем, менее 0,6% антитела к CD8 конъюгировано с позитронным излучателем, менее 0,5% антитела к CD8 конъюгировано с позитронным излучателем, менее 0,4% антитела к CD8 конъюгировано с позитронным излучателем, менее 0,3% антитела к CD8 конъюгировано с позитронным излучателем, менее 0,2% от антитела к CD8 конъюгирован с позитронным излучателем или менее 0,1% антитела к CD8 конъюгировано с позитронным излучателем.

[0170] В некоторых вариантах осуществления соотношение хелатообразующего фрагмента к антителу в конъюгате составляет от 1,0 до 2,0. Используемый в данном документе термин «соотношение хелатообразующего фрагмента к антителу» представляет собой среднее соотношение хелатообразующего фрагмента к антителу и является показателем загрузки хелатора на антитело. Это соотношение аналогично «DAR», т. е. соотношению лекарственного средства к антителу, которое применяют специалисты в данной области для измерения загрузки лекарственного средства на антитело в случае конъюгатов антитела и лекарственного средства (ADC); в случае конъюгатов, описанных в данном документе, для iPET-визуализации соотношение хелатообразующего фрагмента к антителу можно установить с помощью способов, описанных в данном документе, и других известных в данной области способов определения DAR, например, описанных в Wang et al., *Antibody-Drug Conjugates, The 21st Century Magic Bullets for Cancer* (2015). В некоторых вариантах осуществления

соотношение хелатообразующего фрагмента к антителу составляет приблизительно 1,7. В некоторых вариантах осуществления соотношение хелатообразующего фрагмента к антителу составляет от 1,0 до 2,0. В некоторых вариантах осуществления соотношение хелатообразующего фрагмента к антителу составляет приблизительно 1,7.

[0171] В конкретном варианте осуществления хелатообразующий фрагмент представляет собой п-изотиоцианатобензилдесферриоксамин, и позитронный излучатель представляет собой ^{89}Zr . В другом конкретном варианте осуществления хелатообразующий фрагмент представляет собой п-изотиоцианатобензилдесферриоксамин, и позитронный излучатель представляет собой ^{89}Zr , и соотношение хелатообразующего фрагмента к антителу в конъюгате составляет от 1 до 2.

[0172] В некоторых вариантах осуществления данным документом предусмотрены антигенсвязывающие белки, которые связываются с CD8, при этом указанные антигенсвязывающие белки, которые связываются с CD8, ковалентно связаны с одним или более фрагментами, имеющими следующую структуру:

-L-M_z,

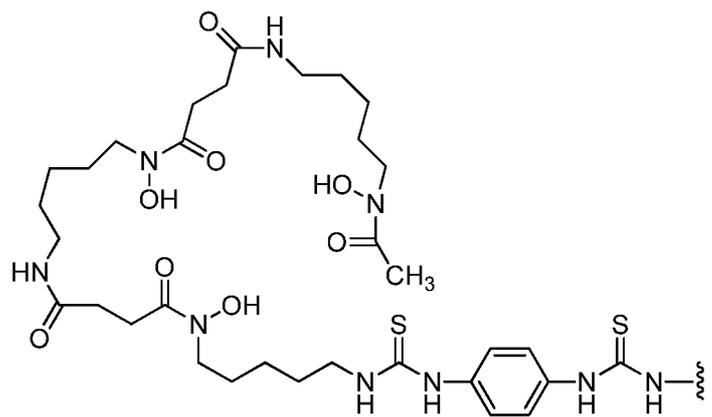
где L представляет собой хелатообразующий фрагмент, M представляет собой позитронный излучатель, и z независимо в каждом случае равняется 0 или 1, и при этом по меньшей мере один из z равняется 1. В определенных вариантах осуществления меченный радиоактивной меткой антигенсвязывающий белок представляет собой соединение формулы (I):

$$\text{M-L-A-[L-M}_z\text{]}_k$$

(I),

где A представляет собой белок, который связывает CD8, L представляет собой хелатообразующий фрагмент, M представляет собой позитронный излучатель, z равняется 0 или 1, и k представляет собой целое число от 0 до 30. В некоторых вариантах осуществления k равняется 1. В некоторых вариантах осуществления k равняется 2.

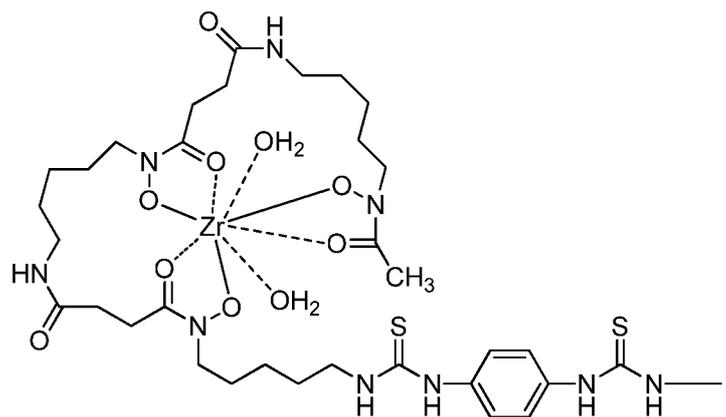
[0173] В некоторых вариантах осуществления L представляет собой:



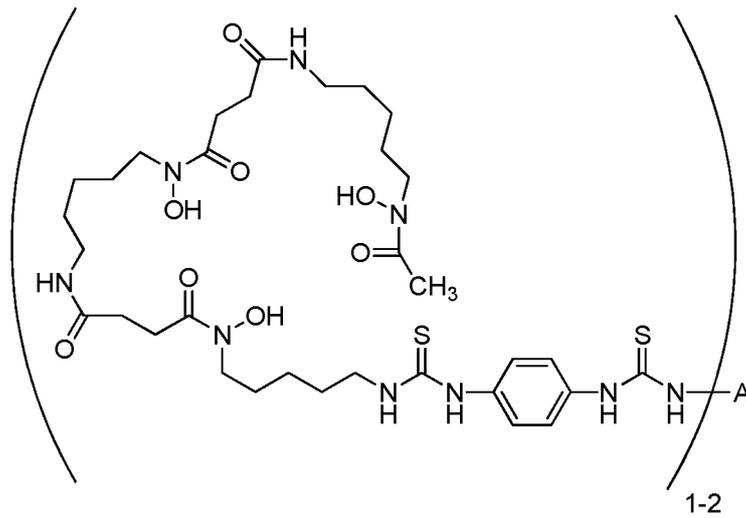
[0174] В некоторых вариантах осуществления М представляет собой ⁸⁹Zr.

[0175] В некоторых вариантах осуществления k представляет собой целое число от 1 до 2. В некоторых вариантах осуществления k равняется 1. В некоторых вариантах осуществления k равняется 2.

[0176] В некоторых вариантах осуществления -L-M представляет собой:



[0177] В настоящее изобретение также включены способы синтеза меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела, предусматривающие приведение в контакт соединения формулы (III):

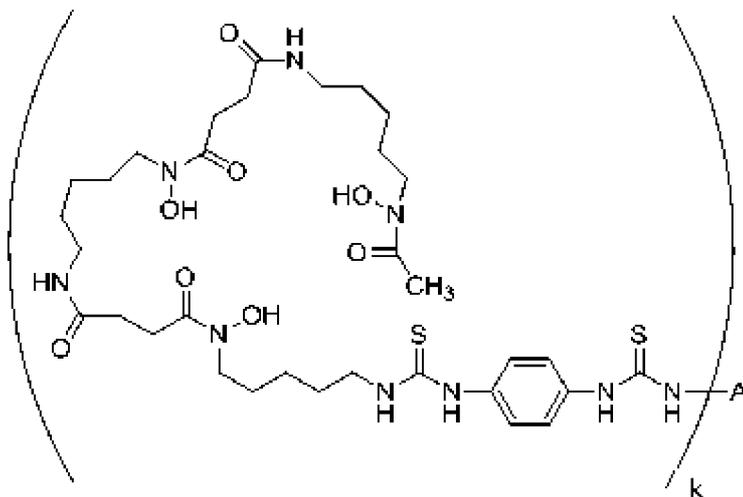


(III),

с ^{89}Zr , где A представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD8. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (III) синтезируют путем приведения в контакт антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связывают CD8, с p-SCN-Bn-DFO.

[0178] Данным документом также предусмотрен продукт реакции соединения формулы (III) с ^{89}Zr .

[0179] Данным документом предусмотрены соединения формулы (III):

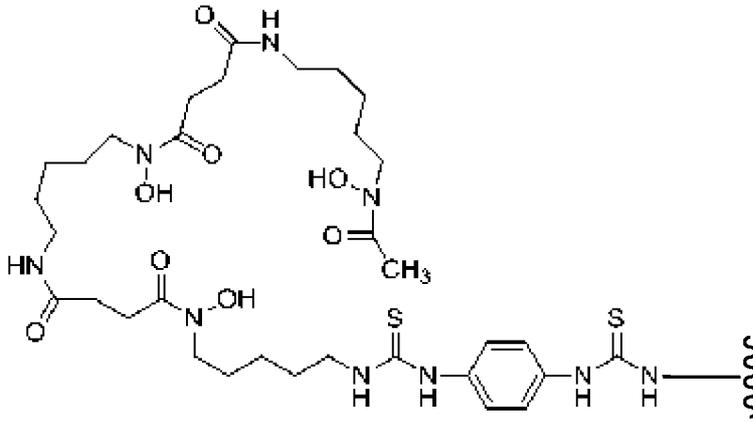


где A представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают CD8, и k представляет собой целое число от 1 до 30. В некоторых вариантах осуществления k равняется 1 или 2.

[0180] Данным документом предусмотрены конъюгаты на основе антитела,

содержащие (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают CD8, и (ii) один или более хелатообразующих фрагментов.

[0181] В некоторых вариантах осуществления хелатообразующий фрагмент содержит:



 представляет собой ковалентную связь с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

[0182] В некоторых аспектах конъюгат на основе антитела имеет соотношение хелатообразующего фрагмента к антителу, которое составляет от приблизительно 1,0 до приблизительно 2,0. В некоторых аспектах конъюгат на основе антитела имеет соотношение хелатообразующего фрагмента к антителу, которое составляет приблизительно 1,7.

[0183] В некоторых вариантах осуществления данным документом предусмотрены композиции, содержащие конъюгат, имеющий следующую структуру:



где A представляет собой белок, который связывает CD8, L представляет собой хелатообразующий фрагмент, и k представляет собой целое число от 1 до 30; конъюгат образует хелатное соединение с позитронным излучателем в количестве, достаточном для обеспечения специфической активности, подходящей для клинической ПЕТ-визуализации. В некоторых вариантах осуществления количество хелатированного позитронного излучателя представляет собой количество, достаточное для обеспечения удельной активности, составляющей от приблизительно 1 до

приблизительно 50 мКи на 1-50 мг белка, который связывает CD8.

[0184] В некоторых вариантах осуществления количество хелатированного позитронного излучателя представляет собой количество, достаточное для обеспечения удельной активности до 50 мКи, до 45 мКи, до 40 мКи, до 35 мКи, до 30 мКи, до 25 мКи или до 10 мКи на 1-50 мг белка, который связывает CD8, например, в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 50 мКи, от приблизительно 10 до приблизительно 40 мКи, от приблизительно 15 до приблизительно 30 мКи, от приблизительно 7 до приблизительно 25 мКи, от приблизительно 20 до приблизительно 50 мКи или от приблизительно 5 до приблизительно 10 мКи.

[0185] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с CD8 человека с равновесной константой диссоциации связывания (K_D), составляющей менее приблизительно $3,5 \times 10^{-8}$ М, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса.

[0186] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с CD8 α человека с K_D , составляющей менее приблизительно $3,5 \times 10^{-8}$ в анализе поверхностного плазмонного резонанса.

[0187] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с CD8 человека с K_D , составляющей менее приблизительно $3,3 \times 10^{-8}$ М, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса.

[0188] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурируют за связывание с CD8 человека с эталонным антителом, содержащим определяющие комплементарность области (CDR) HCVR, где HCVR имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и CDR LCVR, где LCVR имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 2/10.

[0189] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент подавляют связывание CD8 с MHC I класса. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент

подавляют продуцирование IFN γ в активированных CD8 Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибируют белок-активатор фактора транскрипции (AP-1) в активированных Т-клетках.

[0190] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат определяющие комплементарность области (CDR) HCVR, где HCVR имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и CDR LCVR, где LCVR имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10. В определенных вариантах осуществления выделенное антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 2/10.

[0191] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CD8 человека, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2.

[0192] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CD8 человека, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10.

[0193] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CD8 человека, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат (a) HCVR, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2; и (b) LCVR, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10.

[0194] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) под SEQ ID NO: 2; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи

(LCVR) под SEQ ID NO: 10.

[0195] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат комбинацию из шести аминокислотных последовательностей CDR под SEQ ID NO: 4/6/8/12/14/16.

[0196] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 2/10.

IV. Способы применения меченных радиоактивной меткой иммуноконъюгатов

[0197] В определенных аспектах настоящим изобретением предусмотрены диагностические и терапевтические способы применения меченных радиоактивной меткой конъюгатов антител по настоящему изобретению.

[0198] В соответствии с одним аспектом настоящим изобретением предусмотрены способы выявления CD8 в ткани, при этом способы предусматривают введение меченого радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8, предусмотренного данным документом, в ткань и визуальное наблюдение экспрессии CD8 с помощью визуализации с применением позитронно-эмиссионной томографии (PET). В определенных вариантах осуществления ткань содержит клетки или линии клеток. В определенных вариантах осуществления ткань наличует у субъекта, где субъект представляет собой млекопитающее. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой субъекта-человека. В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется заболевание или нарушение, выбранное из группы, состоящей из рака, инфекционного заболевания, аутоиммунного заболевания и воспалительного заболевания. В одном варианте осуществления у субъекта имеется рак. В определенных вариантах осуществления инфекционное заболевание представляет собой бактериальную инфекцию, вызванную, например, риккетсиальными бактериями, бациллами, клебсиеллой, менингококками и гонококками, протеусом, пневмококками, псевдомонадами, стрептококками, стафилококками, сепратиями, *Borriella*, *Bacillus anthracis*, *Chlamydia*, *Clostridium*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Legionella*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepromatosis*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae* и *Yersinia pestis*. В определенных вариантах

осуществления инфекционное заболевание представляет собой вирусную инфекцию, вызванную, например, вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусом гепатита С (HCV), вирусом гепатита В (HBV), вирусом герпеса (например, VZV, HSV-I, HAV-6, HSV-II, CMV и вирусом Эпштейна-Барр), вирусом папилломы человека (HPV), вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) и вирусом иммунодефицита обезьян (SIV). В определенных вариантах осуществления инфекционное заболевание представляет собой паразитарную инфекцию, вызванную, например, *Entamoeba spp.*, *Enterobius vermicularis*, *Leishmania spp.*, *Toxocara spp.*, *Plasmodium spp.*, *Schistosoma spp.*, *Taenia solium*, *Toxoplasma gondii* и *Trypanosoma cruzi*. В определенных вариантах осуществления инфекционное заболевание представляет собой грибковую инфекцию, вызванную, например, *Aspergillus (fumigatus, niger и др.)*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida (albicans, krusei, glabrata, tropicalis и др.)*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, представителями рода *Mucorales (mucor, absidia, rhizopus и др.)*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* и *Sporothrix schenkii*.

[0199] В соответствии с одним аспектом настоящим изобретением предусмотрены способы визуализации ткани, которая экспрессирует CD8, предусматривающие введение меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8 по настоящему изобретению в ткань; и визуальное наблюдение экспрессии CD8 с помощью визуализации с применением позитронно-эмиссионной томографии (PET). В одном варианте осуществления ткань содержится в опухоли. В одном варианте осуществления ткань содержится в культуре опухолевых клеток или линии опухолевых клеток. В одном варианте осуществления ткань содержится в очаге опухоли у субъекта. В одном варианте осуществления ткань представляет собой внутриопухолевые лимфоциты в ткани. В одном варианте осуществления ткань содержит экспрессирующие CD8 клетки.

[0200] В соответствии с одним аспектом настоящим изобретением предусмотрены способы измерения ответа на средство терапии, где ответ на средство терапии коррелирует с увеличением содержания CD8-положительных Т-клеток по сравнению с исходными уровнями. Способы, в соответствии с данным аспектом, предусматривают введение меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела, предусмотренного данным документом, нуждающемуся в этом субъекту и визуальное наблюдение экспрессии CD8 с помощью визуализации с применением

позитронно-эмиссионной томографии (PET). В определенных вариантах осуществления CD8-положительные Т-клетки присутствуют в опухоли у субъекта. В определенных вариантах осуществления повышение экспрессии CD8 коррелирует с увеличением воспаления в опухоли. В определенных вариантах осуществления в инфицированной ткани у субъекта присутствует воспаление. В определенных вариантах осуществления понижение экспрессии CD8 коррелирует с уменьшением воспаления в инфицированной ткани.

[0201] В соответствии с одним аспектом настоящим изобретением предусмотрены способы измерения ответа на средство терапии, при этом ответ на средство терапии коррелирует с увеличением содержания CD8-положительных Т-клеток по сравнению с исходными уровнями. Способы, в соответствии с данным аспектом, предусматривают (i) введение меченого радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела, предусмотренного данным документом, нуждающемуся в этом субъекту и визуальное наблюдение экспрессии CD8 с помощью визуализации с применением позитронно-эмиссионной томографии (PET) и (ii) повторение стадии (i) один или более раз после начала терапии. В определенных вариантах осуществления в ткани у субъекта присутствуют CD8-положительные Т-клетки. В определенных вариантах осуществления повышение экспрессии CD8 коррелирует с увеличением воспаления в ткани. В определенных вариантах осуществления понижение экспрессии CD8 коррелирует с уменьшением воспаления в ткани. В определенных вариантах осуществления экспрессию CD8, визуализированную на стадии (i), сравнивают с экспрессией CD8, визуализированной на стадии (ii).

[0202] Согласно одному аспекту настоящим изобретением предусмотрены способы прогнозирования ответа в отношении средства противоопухолевой терапии. Способ предусматривает введение меченого радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8 нуждающемуся в этом субъекту и определение того, что в солидной опухоли субъекта содержатся CD8-положительные Т-клетки. Если опухоли субъекта инфильтрированы CD8-положительными Т-клетками или являются иммунологически «горячими», субъект, скорее всего, будет отвечать на средство противоопухолевой терапии. Наличие CD8-положительных Т-клеток может быть прогностическим маркером ответа или прогностическим маркером выживаемости. Например, исходная инфильтрация опухоли CD8-положительными клетками является

прогностическим фактором выживаемости при раке молочной железы, головы/шеи и яичников. Кроме того, прогностическим маркером ответа на лечение является инфильтрация опухоли CD8-положительными клетками, выявленными во время терапии, направленной против PD-1 или против PDL-1.

[0203] Согласно одному аспекту, настоящим изобретением предусмотрены способы определения, подходит ли субъект, у которого имеется опухоль, для средства противоопухолевой терапии, при этом способы предусматривают введение меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела по настоящему изобретению и локализацию введенного меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в опухоли с помощью PET-визуализации, при этом наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в опухоли позволяет идентифицировать субъекта как подходящего для средства противоопухолевой терапии.

[0204] Согласно одному аспекту настоящим изобретением предусмотрены способы идентификации субъекта, у которого имеется опухоль, для средства противоопухолевой терапии, предусматривающего ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1, при этом способы предусматривают введение субъекту меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела по настоящему изобретению и локализацию введенного радиоактивно меченного конъюгата на основе антитела в опухоли с помощью PET-визуализации, где наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в опухоли позволяет идентифицировать субъекта как подходящего для средства противоопухолевой терапии. В некоторых вариантах осуществления субъекту дополнительно вводят меченный радиоактивной меткой конъюгат, нацеливающийся на PD-1, и введенный меченный радиоактивной меткой конъюгат, нацеливающийся на PD-1, локализуют в опухоли с помощью PET-визуализации, где наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в опухоли позволяет идентифицировать субъекта как подходящего для средства противоопухолевой терапии, предусматривающего ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1.

[0205] Другим аспектом настоящего изобретения предусмотрены способы отслеживания наличия и/или инфильтрации Т-клеток в опухоли в течение времени. В некоторых вариантах осуществления способ предусматривает (а) введение субъекту, у

которого имеется опухоль, меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8 в первый момент времени и определение наличия CD8-положительных Т-клеток в опухоли; (b) введение субъекту одной или более доз средства противоопухолевой терапии; и (c) введение субъекту меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8 во второй момент времени через 1-20 недель после введения средства противоопухолевой терапии и определение наличия CD8-положительных Т-клеток в опухоли. Наличие Т-клеток в опухоли указывает на положительный ответ в отношении средства противоопухолевой терапии. Стадию (c) можно повторять в ходе курса лечения с помощью средства противоопухолевой терапии. Первый момент времени может наступать до (b) или после (b).

[0206] Определение наличия Т-клеток в опухоли может предусматривать количественное определение уровней Т-клеток способами, известными специалисту в данной области. В некоторых аспектах исходные уровни CD8-положительных Т-клеток сравнивают с уровнями CD8-положительных Т-клеток, измеренными после или во время курса противоопухолевой терапии. Сохранение уровней CD8-положительных Т-клеток относительно исходного уровня или повышение содержания CD8-положительных Т-клеток с течением времени указывает на положительный ответ в отношении средства противоопухолевой терапии.

[0207] Определение наличия Т-клеток в опухоли может предусматривать простое определение, является ли опухоль положительной в отношении Т-клеток или опухоль является отрицательной в отношении Т-клеток.

[0208] Настоящим документом также предусмотрены способы прогнозирования ответа субъекта на средство противоопухолевой терапии, при этом способы предусматривают определение того, является ли опухоль CD8-положительной, при этом, если опухоль является CD8-положительной, т. е. в опухоли содержатся Т-клетки, это позволяет прогнозировать положительный ответ субъекта на средство противоопухолевой терапии. В определенных вариантах осуществления опухоль определяют как положительную путем введения меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8 по настоящему изобретению и локализации меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в опухоли с помощью PET-визуализации, где наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является CD8-положительной. В

некоторых вариантах осуществления средство противоопухолевой терапии представляет собой средство терапии, представляющее собой ингибитор контрольных точек. В некоторых вариантах осуществления средство противоопухолевой терапии выбрано из ингибитора PD-1 (например, REGN2810, BGB-A317, ниволумаба, пидилизумаба и пембролизумаба), ингибитора PD-L1 (например, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба, MDX-1105 и REGN3504, а также раскрытых в публикации патента № US 2015-0203580), ингибитора CTLA-4 (например, ипилимумаба), ингибитора TIM3, ингибитора BTLA, ингибитора TIGIT, ингибитора CD47, ингибитора GITR, ингибитора LAG3, антагониста другого Т-клеточного коингибитора или лиганда (например, антитела к CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 или VISTA), ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагониста фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [например, «VEGF-Трап», такого как афлиберцепт или другой ингибирующий VEGF слитый белок, как изложено в US 7087411, или антитела к VEGF или его антигенсвязывающего фрагмента (например, бевацизумаба или ранибизумаба), или низкомолекулярного ингибитора киназы рецептора VEGF (например, сунитиниба, сорафениба или пазопаниба)], ингибитора Ang2 (например, несвакумаба), ингибитора трансформирующего фактора роста бета (TGF β), ингибитора рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, эрлотиниба, цетуксимаба), ингибитора CD20 (например, антитела к CD20, такого как ритуксимаб), антитела к опухоль-специфическому антигену [например, CA9, CA125, ассоциированному с меланомой антигену 3 (MAGE3), карциноэмбриональному антигену (CEA), виментину, опухолевому M2-ПК, специфическому для предстательной железы антигену (PSA), муцину-1, MART-1 и CA19-9], вакцины (например, бацилл Кальмета-Герена, противораковой вакцины), адьюванта для повышения презентирования антигена (например, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора), биспецифического антитела (например, биспецифического антитела к CD3xCD20 или биспецифического антитела к PSMAxCD3), цитотоксина, химиотерапевтического средства (например, дакарбазина, темозоломида, циклофосфамида, доцетаксела, доксорубицина, даунорубицина, цисплатина, карбоплатина, гемцитабина, метотрексата, митоксантрона, оксалиплатина, паклитаксела и винкристина), циклофосфамида, средства лучевой терапии, ингибитора IL-6R (например, сарилумаба), ингибитора IL-4R (например,

дупилумаба), ингибитора IL-10, цитокина, такого как IL-2, IL-7, IL-21 и IL-15, конъюгата антитела и лекарственного средства (ADC) (*например*, ADC на основе антитела к CD19 и DM4 и ADC на основе антитела к DS6 и DM4).

[0209] Согласно одному аспекту настоящим изобретением предусмотрены способы прогнозирования ответа субъекта, у которого имеется солидная опухоль, на средство противоопухолевой терапии, при этом способы предусматривают определение того, является ли опухоль CD8-положительной, при этом прогнозируют положительный ответ субъекта, если опухоль является CD8-положительной. В определенных вариантах осуществления опухоль определяют как положительную путем введения меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела по настоящему изобретению и локализации меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в опухоли с помощью ПЕТ-визуализации, где наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является CD8-положительной.

[0210] Согласно одному аспекту настоящим изобретением предусмотрены способы выявления CD8-положительной опухоли у субъекта. Способы, согласно данному аспекту, предусматривают введение субъекту меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела по настоящему изобретению и определение локализации меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела с помощью ПЕТ-визуализации, где наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является CD8-положительной.

[0211] Данным документом предусмотрены способы прогнозирования положительного ответа в отношении средства противоопухолевой терапии, предусматривающие введение субъекту меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8 определения наличия CD8-положительных Т-клеток в солидной опухоли. Наличие CD8-положительных клеток обеспечивает прогнозирование положительного ответа в отношении средства противоопухолевой терапии.

[0212] Данным документом предусмотрены способы отслеживания положительного ответа в отношении средства противоопухолевой терапии у субъекта,

предусматривающие (а) введение субъекту одной или более доз средства противоопухолевой терапии и (b) введение субъекту меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8 через 1-20 недель после введения средства противоопухолевой терапии для определения наличия CD8-положительных клеток в солидной опухоли. Наличие CD8-положительных клеток указывает на положительный ответ в отношении средства противоопухолевой терапии.

[0213] Данным документом предусмотрены способы прогнозирования или отслеживания успеха или эффективности средства противоопухолевой терапии у субъекта, у которого имеется солидная опухоль, где способ предусматривает (а) определение уровня CD8-положительных клеток в опухоли и (b) соотнесение уровня CD8-положительных клеток и успешного средства противоопухолевой терапии. Повышенный уровень, превышающий определенное пороговое значение, является прогностическим фактором или свидетельствует об успешной противоопухолевой терапии.

[0214] Используемое в данном документе выражение «нуждающийся в этом субъект» означает человека или отличное от человека млекопитающее, у которого проявляется один или более симптомов или признаков рака, и/или у которого был диагностирован рак, в том числе солидная опухоль, и который нуждается в лечении этого. Во многих вариантах осуществления термин «субъект» можно взаимозаменяемо использовать с термином «пациент». Например, у человека-субъекта может быть диагностирована первичная или метастатическая опухоль и/или один или более симптомов или признаков, включая без ограничения необъяснимую потерю веса, общую слабость, постоянную усталость, потерю аппетита, лихорадку, ночную потливость, боль в костях, одышку, вздутие живота, боль/давление в груди, увеличение селезенки и повышение уровня связанного с раком биомаркера (*например*, CA125). Данное выражение включает субъектов с первичными или развившимися опухолями. В конкретных вариантах осуществления выражение включает людей-субъектов, у которых имеется солидная опухоль, *например*, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак легкого, рак предстательной железы, рак кожи, рак печени, рак кости, рак яичников, рак шейки матки, рак поджелудочной железы, рак головы и шеи и рак головного мозга, и/или которые нуждаются в ее лечении. Термин включает субъектов с первичными или метастатическими опухолями (злокачественными

новообразованиями на поздней стадии). В определенных вариантах осуществления выражение «нуждающийся в этом субъект» включает субъектов, у которых имеется солидная опухоль, которая является устойчивой или рефрактерной к предшествующей терапии или недостаточно контролируемой посредством ее (*например*, посредством лечения с помощью противоракового средства). Например, выражение включает субъектов, которых лечили одной или более линиями предшествующей терапии, такой как лечение химиотерапией (*например*, с помощью карбоплатина или доцетаксела). В определенных вариантах осуществления выражение «нуждающийся в этом субъект» включает субъекту которого имеется солидная опухоль, которые прошли лечение одной или несколькими линиями предшествующей терапии, но которые впоследствии рецидивировали или метастазировали. В определенных вариантах осуществления термин включает субъектов, у которых имеется воспалительное заболевание или нарушение, включая без ограничения рак, ревматоидный артрит, атеросклероз, периодонтит, сенную лихорадку, заболевание сердца, заболевание коронарной артерии, инфекционное заболевание, бронхит, дерматит, менингит, астму, туберкулез, язвенный колит, болезнь Крона, воспалительное заболевание кишечника, гепатит, синусит, псориаз, аллергию, фиброз, волчанку, васкулит, анкилозирующий спондилит, болезнь Грейвса, целиакию, фибромиалгию и отторжение трансплантата.

[0215] В определенных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению применяют у субъекта, у которого имеется солидная опухоль. Термины «опухоль», «рак» и «злокачественное новообразование» применяют в данном документе взаимозаменяемо. Применяемый в данном документе термин «солидная опухоль» относится к аномальной массе ткани, которая обычно не содержит кист или областей с жидкостью. Солидные опухоли могут быть доброкачественными (не рак) или злокачественными (рак). В целях настоящего изобретения термин «солидная опухоль» означает злокачественные солидные опухоли. Термин включает различные типы солидных опухолей, названные по типам клеток, которые их образуют, а именно саркомы, карциномы и лимфомы. В определенных вариантах осуществления термин «солидная опухоль» включает виды рака, включая без ограничения колоректальный рак, рак яичника, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак головного мозга, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак анального канала, рак матки, рак толстой кишки, рак печени, рак поджелудочной железы, рак легкого, эндометриальный

рак, рак кости, рак яичка, рак кожи, рак почки, рак желудка, рак пищевода, рак головы и шеи, рак слюнной железы и миелому.

[0216] Согласно одному аспекту настоящим изобретением предусмотрены способы лечения солидной опухоли у субъекта. Способы, согласно данному аспекту, предусматривают определение того, что опухоль является CD8-положительной, т. е. в опухоли содержатся CD8-положительные Т-клетки, и введение одной или более доз средства противоопухолевой терапии. Средство противоопухолевой терапии может представлять собой средство терапии, представляющее собой ингибитор контрольных точек. В определенных вариантах осуществления опухоль определяют как CD8-положительную путем введения субъекту меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела по настоящему изобретению и осуществления визуализации меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в опухоли с помощью PET-визуализации. Наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является CD8-положительной.

[0217] Меченное радиоактивной меткой антитело к CD8, раскрытое в данном документе, можно применять для оценки того, подходит ли субъект для средства терапии, представляющего собой ингибитор контрольных точек. В некоторых аспектах меченное радиоактивной меткой антитело к CD8 можно применять для отслеживания инфильтрации Т-клеток в опухоль, в том числе, например, отслеживание без необходимости проведения биопсии опухоли. В определенных вариантах осуществления достаточная инфильтрация Т-клеток указывает на то, что опухоль будет отвечать на средство терапии, представляющее собой ингибитор контрольных точек. Меченное радиоактивной меткой антитело к CD8, раскрытое в данном документе, также можно применять для отслеживания инфильтрации Т-клеток в ходе лечения ингибитором контрольных точек или после него, например, путем измерения изменения степени инфильтрации Т-клеток в моменты времени до и/или в ходе лечения.

[0218] Наличие CD8-положительных Т-клеток в опухоли указывает на то, что опухоль будет лучше отвечать на лечение, например, лечение с помощью средства терапии, представляющего собой ингибитор контрольных точек. Кроме того, наличие CD8-положительных Т-клеток в опухоли после лечения с помощью средства противоопухолевой терапии свидетельствует о том, что такое средство терапии

является работающим, и чем больше повышение содержания Т-клеток, тем более эффективным является лечение.

[0219] В дополнительном аспекте способы лечения могут дополнительно предусматривать введение одной или более доз ингибитора CTLA-4 (*например*, ипилиумаба), ингибитора TIM3, ингибитора BTLA, ингибитора TIGIT, ингибитора CD47, ингибитора GITR, антагониста другого Т-клеточного коингибитора или лиганда (*например*, антитела к CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 или VISTA), ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагониста фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [*например*, «VEGF-Трап», такого как афлиберцепт или другой ингибирующий VEGF слитый белок, изложенный в US 7087411, или антитело к VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент (*например*, бевацизумаб или ранибизумаб) или низкомолекулярный ингибитор киназы рецептора VEGF (*например*, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)], ингибитора Ang2 (*например*, несвакумаба), ингибитора трансформирующего фактора роста бета (TGF β), ингибитора рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (*например*, эрлотиниба, цетуксимаба), ингибитора CD20 (*например*, антитела к CD20, такого как ритуксимаб), антитела к опухоль-специфическому антигену [*например*, CA9, CA125, ассоциированному с меланомой антигену 3 (MAGE3), карциноэмбриональному антигену (CEA), виментину, опухолевому M2-ПК, специфическому для предстательной железы антигену (PSA), муцину-1, MART-1 и CA19-9], вакцины (*например*, бациллы Кальмета-Герена, противораковой вакцины), адьюванта для повышения презентирования антигена (*например*, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора), биспецифического антитела (*например*, биспецифического антитела к CD3xCD20 или биспецифического антитела к PSMAxCD3), цитотоксина, химиотерапевтического средства (*например*, дакарбазина, темозоломида, циклофосамида, доцетаксела, доксорубицина, даунорубицина, цисплатина, карбоплатина, гемцитабина, метотрексата, митоксантрона, оксалиплатина, паклитаксела и винкристина), циклофосамида, средства лучевой терапии, ингибитора IL-6R (*например*, сарилумаба), ингибитора IL-4R (*например*, дупилумаба), ингибитора IL-10, цитокина, такого как IL-2, IL-7, IL-21 и IL-15, конъюгата антитела и лекарственного средства (ADC) (*например*, ADC на основе антитела к CD19 и DM4 и ADC на основе антитела к DS6 и DM4), противовоспалительного лекарственного

средства (*например*, кортикостероидов и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств), биологически активной добавки, такой как антиоксиданты, или любого другого терапевтического средства ухода для лечения рака. В определенных вариантах осуществления средство противоопухолевой терапии можно применять в комбинации с противораковыми вакцинами, в том числе вакцинами на основе дендритных клеток, онколитическими вирусами, вакцинами на основе опухолевых клеток и т. д., для увеличения противоопухолевого ответа. Примеры противораковых вакцин, которые можно применять в комбинации с противоопухолевым средством терапии, включают вакцину MAGE3 для меланомы и рака мочевого пузыря, вакцину MUC1 для рака молочной железы, EGFRv3 (*например*, риндопепимут) для рака головного мозга (включая мультиформную глиобластому) или ALVAC-CEA (для CEA+ видов рака).

[0220] В определенных вариантах осуществления средство противоопухолевой терапии можно применять в комбинации со средством лучевой терапии в способах для получения долговременных стойких противоопухолевых ответов и/или увеличения выживаемости субъектов с раком. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 или PDL-1, например, антитело к PD-1, можно вводить субъекту с раком до, одновременно или после введения средства лучевой терапии. Например, средство лучевой терапии можно вводить в одной или более дозах в опухолевые очаги с последующим введением одной или более доз антител к PD-1. В некоторых вариантах осуществления средство лучевой терапии можно вводить локально в опухолевый очаг для усиления локальной иммуногенности опухоли субъекта (адъювинирующее облучение) и/или для уничтожения опухолевых клеток (аблятивное облучение) с последующим системным введением антитела к PD-1. Например, средство внутричерепного облучения можно вводить субъекту с раком головного мозга (*например*, мультиформной глиобластомой) в комбинации с системным введением антитела к PD-1. В определенных вариантах осуществления антитела к PD-1 можно вводить в комбинации со средством лучевой терапии и химиотерапевтическим средством (*например*, темозоломидом) или антагонистом VEGF (*например*, афлиберцептом).

[0221] В определенных вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту можно вводить противовирусные лекарственные средства для лечения

вирусной инфекции, вызванной, например, LCMV, HIV, HPV, HBV или HCV. Примеры противовирусных лекарственных средств включают без ограничения зидовудин, ламивудин, абакавир, рибавирин, лопинавир, эфавиренц, кобицистат, тенофовир, рилпивирин и кортикостероиды.

[0222] В определенных вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту можно вводить одно или более антибактериальных лекарственных средств для лечения бактериальной инфекции, вызванной, например, риккетсиальными бактериями, бациллами, клебсиеллой, менингококками и гонококками, протеусом, пневмококками, псевдомонадами, стрептококками, стафилококками, серратиями, *Borriella*, *Bacillus anthracis*, *Chlamydia*, *Clostridium*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Legionella*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepromatosis*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae* и *Yersinia pestis*. Примеры антибактериальных лекарственных средств включают без ограничения пенициллины, тетрациклины, цефалоспорины, хинолоны, линкомицины, макролиды, кетолиды, сульфонамиды, гликопептиды, аминогликозиды и карбапенемы.

[0223] В определенных вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту можно вводить одно или более противогрибковых лекарств для лечения грибковой инфекции, вызванной, например, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger* и др.), *Blastomyces dermatitidis*, *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* и др.), *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, представителями рода *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus* и др.), *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* и *Sporothrix schenckii*. Примеры противогрибковых лекарственных средств включают без ограничения амфотерицин В, флуконазол, вориксоназол, позаконазол, итраконазол, вориконазол, анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин и флуцитозин.

[0224] В определенных вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту можно вводить одно или более противопаразитарных лекарственных средств для лечения паразитарной инфекции, вызванной, например, *Entamoeba* spp., *Enterobius vermicularis*, *Leishmania* spp., *Toxocara* spp., *Plasmodium* spp., *Schistosoma* spp., *Taenia solium*, *Toxoplasma gondii* и *Trypanosoma cruzi*. Примеры противопаразитарных лекарственных средств включают без ограничения празиквантел, оксамнинин, метронидазол, тинидазол, нитазоксанид, дегидроэметин или хлорохин, дилоксанида фуоат, йодохинолин, хлорохин, паромомицин, пирантела памоат, албендазол,

нифуртимокс и бензнидазол.

[0225] Дополнительное(-ые) терапевтически активное(-ые) средство(-а)/компонент(-ы) можно вводить до, одновременно или после введения ингибитора CD8. В целях настоящего изобретения такие схемы введения считаются введением ингибитора CD8 «в комбинации со» вторым терапевтически активным компонентом.

[0226] В некоторых аспектах способы лечения предусматривают проведение отбора субъекта с бактериальной инфекцией, вирусной инфекцией, грибковой инфекцией или паразитарной инфекцией, определение того, что пораженная ткань у субъекта является CD8-положительной, и введение одной или более доз терапевтического средства, соответствующего инфекции. В определенных вариантах осуществления пораженную ткань определяют как CD8-положительную путем введения субъекту меченого радиоактивной меткой конъюгата, нацеливающегося на CD8, по настоящему изобретению и осуществления визуализации меченого радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела у субъекта с помощью ПЕТ-визуализации, где наличие меченого радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в ткани указывает на то, что ткань является CD8-положительной. В определенных вариантах осуществления стадии введения и визуализации выполняют один или более раз с целью отслеживания эффективности терапевтического средства в лечении инфекции.

[0227] В некоторых аспектах способы лечения предусматривают проведение отбора субъекта с солидной опухолью, определение того, что опухоль является CD8-положительной и PD-1-положительной, и введение одной или более доз ингибитора сигнальной оси PD-1/PD-L1 (*например*, антитела к PD-1 или антитела к PD-L1). В определенных вариантах осуществления опухоль определяют как CD8-положительную путем введения субъекту меченого радиоактивной меткой конъюгата, воздействующего на CD8, по настоящему изобретению и осуществления визуализации меченого радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в опухоли с помощью ПЕТ-визуализации, при этом наличие меченого радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является CD8-положительной. В определенных вариантах осуществления опухоль определяют как PD-1-положительную путем введения субъекту меченого радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к PD-1, по настоящему изобретению и осуществления

визуализации меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к PD-1, в опухоли с помощью PET-визуализации, где наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к PD-1, в опухоли указывает на то, что опухоль является PD-1-положительной.

[0228] К иллюстративным антителам к PD-1 относятся REGN2810, BGB-A317, ниволумаб, пидилизумаб и пембролизумаб.

[0229] К иллюстративным антителам к PD-L1 относятся атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, MDX-1105 и REGN3504, а также антитела, раскрытые в публикации патента № US 2015-0203580.

[0230] Применяемые в данном документе термины «лечить», «осуществлять лечение» или т. п. означают облегчение симптомов, устранение причин симптомов либо на временной, либо на постоянной основе, задержку или подавление роста опухоли, уменьшение загрузки опухолевых клеток или опухолевой нагрузки, способствование регрессии опухоли, вызывание уменьшения, некроза и/или исчезновения опухоли, предупреждение рецидива опухоли, предупреждение или подавление метастазирования, подавление роста метастазирующей опухоли и/или увеличение продолжительность выживания субъекта.

[0231] Согласно одному аспекту настоящим изобретением предусмотрены способы отслеживания эффективности средства противоопухолевой терапии у субъекта, где способы предусматривают проведение отбора субъекта с солидной опухолью, при этом субъекта подвергают лечению с помощью средства противоопухолевой терапии, введение субъекту меченного радиоактивной меткой конъюгата, воздействующего на CD8, по настоящему изобретению, осуществление визуализации локализации введенного меченного радиоактивной меткой конъюгата в опухоли с помощью PET-визуализации и определение роста опухоли, при этом уменьшение относительно исходного уровня сигнала радиоактивной метки указывает на эффективность средства противоопухолевой терапии. В определенных вариантах осуществления средство противоопухолевой терапии предусматривает ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 (*например*, антитело к PD-1 или антитело к PD-L1).

[0232] В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предусмотрены способы оценки изменений в воспалительном состоянии опухоли, при

этом способы предусматривают проведение отбора субъекта с солидной опухолью, где субъекта подвергают лечению с помощью средства противоопухолевой терапии, введение субъекту меченного радиоактивной меткой конъюгата, воздействующего на CD8, предусмотренного настоящим документом, и осуществление визуализации локализации введенного меченного радиоактивной меткой конъюгата в опухоли с помощью PET-визуализации, при этом увеличение относительно исходного уровня сигнала радиоактивной метки указывает на увеличение воспаления и эффективность средства противоопухолевой терапии. В определенных вариантах осуществления средство противоопухолевой терапии предусматривает ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 (*например*, антитело к PD-1 или антитело к PD-L1). В определенных вариантах осуществления средство противоопухолевой терапии предусматривает ингибитор PD-1 (*например*, REGN2810, BGB-A317, ниволумаб, пидилизумаб и пембролизумаб), ингибитор PD-L1 (*например*, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, MDX-1105 и REGN3504), ингибитор CTLA-4 (*например*, ипилимумаб), ингибитор TIM3, ингибитор BTLA, ингибитор TIGIT, ингибитор CD47, ингибитор GITR, антагонист другого T-клеточного коингибитора или лиганда (*например*, антитело к CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 или VISTA), ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагонист фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [*например*, «VEGF-Трап», такой как афлиберцепт или другой ингибирующий VEGF слитый белок, как изложено в US 7087411, или антитело к VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент (*например*, бевацизумаб или ранибизумаб) или низкомолекулярный ингибитор киназы рецептора VEGF (*например*, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)], ингибитор Ang2 (*например*, несвакумаб), ингибитор трансформирующего фактора роста бета (TGF β), ингибитор рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (*например*, эрлотиниб, цетуксимаб), ингибитор CD20 (*например*, антитело к CD20, такое как ритуксимаб), антитело к опухоль-специфическому антигену [*например*, CA9, CA125, ассоциированному с меланомой антигену 3 (MAGE3), карциноэмбриональному антигену (CEA), виментину, опухолевому M2-ПК, специфическому для предстательной железы антигену (PSA), муцину-1, MART-1 и CA19-9], вакцина (*например*, бациллы Кальметта-Герена, противораковая вакцина), адъювант для повышения презентирования антигена (*например*, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), биспецифическое антитело (*например*, биспецифическое антитело к CD3xCD20 или

биспецифическое антитело к PSMAxCD3), цитотоксин, химиотерапевтическое средство (*например*, дакарбазин, темозоломид, циклофосфамид, доцетаксел, доксорубицин, даунорубицин, цисплатин, карбоплатин, гемцитабин, метотрексат, митоксантрон, оксалиплатин, паклитаксел и винкристин), циклофосфамид, средство лучевой терапии, ингибитор IL-6R (*например*, сарилумаб), ингибитор IL-4R (*например*, дупилумаб), ингибитор IL-10, цитокин, такой как IL-2, IL-7, IL-21 и IL-15, конъюгат на основе антитела с лекарственным средством (ADC) (*например*, ADC на основе антитела к CD19 и DM4 и ADC на основе антитела к DS6 и DM4).

[0233] Используемый в данном документе термин «исходный уровень» в отношении экспрессии CD8 в опухоли означает числовое значение поглощения меченного радиоактивной меткой конъюгата у субъекта до или во время введения дозы средства противоопухолевой терапии. Поглощение меченного радиоактивной меткой конъюгата определяют с помощью способов, известных из уровня техники (см., *например*, Oosting et al 2015, J. Nucl. Med. 56: 63-69). В определенных вариантах осуществления средство противоопухолевой терапии предусматривает ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1.

[0234] Для определения того, есть ли эффективность у средства противоопухолевой терапии, поглощение меченного радиоактивной меткой конъюгата количественно определяют на исходном уровне и в один или более моментов времени после введения ингибитора CD8. *Например*, поглощение введенного меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела (*например*, меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8) можно измерять в день 2, день 3, день 4, день 5, день 6, день 7, день 8, день 9, день 10, день 11, день 12, день 14, день 15, день 22, день 25, день 29, день 36, день 43, день 50, день 57, день 64, день 71, день 85 или в конце недели 1, недели 2, недели 3, недели 4, недели 5, недели 6, недели 7, недели 8, недели 9, недели 10, недели 11, недели 12, недели 13, недели 14, недели 15, недели 16, недели 17, недели 18, недели 19, недели 20, недели 21, недели 22, недели 23, недели 24 или позже после первоначального лечения с помощью ингибитора сигнальной оси PD-1/PD-L1 (*например*, антитела к PD-1). Разницу между значением поглощения в конкретный момент времени после начала лечения и значением поглощения на исходном уровне применяют для определения того, является ли эффективным средство противоопухолевой терапии (регрессия или прогрессирование

опухоли).

[0235] В определенных вариантах осуществления меченный радиоактивной меткой конъюгат на основе антитела вводят субъекту внутривенно или подкожно. В определенных вариантах осуществления меченный радиоактивной меткой конъюгат на основе антитела вводят внутриопухолево. После введения меченный радиоактивной меткой конъюгат на основе антитела локализуют в опухоли. Локализованный меченный радиоактивной меткой конъюгат на основе антитела визуализируют с помощью ПЕТ-визуализации, а поглощение опухолью меченого радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела определяют посредством способов, известных из уровня техники. В определенных вариантах осуществления визуализацию проводят через 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней после введения меченого радиоактивной меткой конъюгата. В определенных вариантах осуществления визуализацию проводят в тот же день после введения меченого радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела.

[0236] В определенных вариантах осуществления меченный радиоактивной меткой конъюгат на основе антитеа к CD8 можно вводить в дозе от приблизительно 0,1 мг/кг массы тела до приблизительно 100 мг/кг массы тела субъекта, например, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг, или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг, или от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 1,0 мг/кг массы тела.

[0237] В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с CD8. В определенных вариантах осуществления антитело к CD8 содержит CDR HCVR, где HCVR имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и CDR LCVR, где LCVR имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10.

V. Пути диагностического применения антител

[0238] Антитело к CD8 по настоящему изобретению также можно применять для выявления и/или измерения CD8 или CD8-экспрессирующих клеток в образце, *например*, для диагностических целей. Например, антитело к CD8 или его фрагмент можно применять для диагностики состояния или заболевания, характеризующегося aberrантной экспрессией (*например*, чрезмерной экспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии *и т. д.*) CD8. Иллюстративные диагностические

анализы в случае CD8 могут предусматривать, *например*, приведение образца, полученного от субъекта, в контакт с антителом к CD8, где антитело мечено детектируемой меткой или репортерной молекулой. Альтернативно, немеченое антитело к CD8 можно применять в диагностических путях применения в комбинации со вторичным антителом, которое само по себе является меченым детектируемой меткой. Детектируемая метка или репортерная молекула могут представлять собой радиоизотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I , флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеин или родамин, или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. К конкретным иллюстративным анализам, которые можно применять для выявления или измерения CD8 в образце, относятся иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA), иммуно-ПЕТ (*например*, ^{89}Zr , ^{64}Cu и т. д.) и сортировка клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

[0239] К образцам, которые можно применять в диагностических анализах CD8 согласно настоящему изобретению, относится любой образец ткани или жидкости, получаемый от субъекта. Обычно для первоначального определения исходного или стандартного уровня CD8 будут измерять уровни CD8 в конкретном образце, полученном от здорового субъекта (*например*, субъекта, не пораженного заболеванием или состоянием, связанным с аномальными уровнями или активностью CD8). Этот исходный уровень CD8 затем можно сравнивать с уровнями CD8, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов с подозрением на наличие заболевания или состояния, связанного с CD8.

[0240] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD8 мечено радиоизотопом, флуоресцентным фрагментом, хемилюминесцентным фрагментом или ферментом. Радиоизотоп может быть выбран из группы, состоящей из ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I . Флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент может быть выбран из группы, состоящей из флуоресцеина или родамина. Фермент может быть выбран из группы, состоящей из щелочной фосфатазы, бета-галактозидазы, пероксидазы хрена или люциферазы.

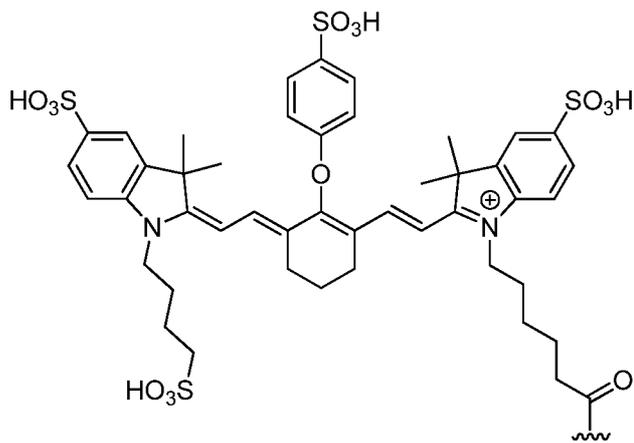
[0241] В некоторых вариантах осуществления анализ предусматривает антитело к CD8, описанное в данном документе, которое является меченым детектируемой меткой с применением флуоресцентного фрагмента или хемилюминесцентного

фрагмента.

[0242] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD8 конъюгировано с флуоресцентным красителем. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD8 конъюгировано с флуоресцентным красителем с поглощением в ближней IR-области спектра (NIR). Подходящие красители включают красители, которые обеспечивают высокую чувствительность в отношении мишеней с низкой экспрессией при применении флуоресцентной молекулярной томографии. В некоторых вариантах осуществления краситель представляет собой BODIPY-X630/650[®], VivoTag[®]645, Alexa Fluor[®]647, VivoTag680[®], AlexaFluor680[®], AlexaFluor750[®], IRDye800CW[®], DyLight800, CF[®]660C, CF[®]660R, CF[®]790 и CF[®]800. В некоторых вариантах осуществления краситель представляет собой IRDye 800CW. В некоторых вариантах осуществления краситель представляет собой Vivotag680XL. В некоторых вариантах осуществления краситель представляет собой IRDye 800CW, и DAR составляет 0,10-1,00. В некоторых вариантах осуществления краситель представляет собой Vivotag680XL, и DAR составляет 1-2. В некоторых вариантах осуществления краситель представляет собой IRDye 800CW или Vivotag680XL, и мономерная чистота составляет >90, 95, 96 или 97%, определенная посредством способов на основе SE-HPLC, которые описаны в примере 13.

[0243] Данным документом также предусмотрены соединения, характеризующиеся следующей формулой:

$Ab-[D]_n$, где Ab представляет собой описанное в данном документе антитело к CD8 или его антигенсвязывающий фрагмент, и D представляет собой флуоресцентный краситель, и n представляет собой целое число от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления n равняется 1-2. В некоторых вариантах осуществления n равняется 1. В некоторых вариантах осуществления D представляет собой:



или его фармацевтически приемлемую соль.

VI. Примеры

[0244] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения проиллюстрированы с помощью следующих неограничивающих примеров.

Пример 1. Получение человеческих антител к CD8

[0245] Для получения антител к CD8 можно применять иммуноген, содержащий ДНК CD8 α и/или ДНК CD8 β . Аналогично, для получения антител к CD8 можно применять иммуноген, содержащий белок CD8 α и/или белок CD8 β . В определенных вариантах осуществления антитела получают от мышей, иммунизированных полноразмерной ДНК CD8 α (например, SEQ ID NO: 17) и/или ДНК CD8 β (например, SEQ ID NO: 19), полноразмерным белком CD8 α (например, SEQ ID NO: 18) и/или белком CD8 β (например, SEQ ID NO: 20) или фрагментом белка CD8 α и/или белка CD8 β . В некоторых вариантах осуществления антитела получают от мышей, иммунизированных слитым пептидом, содержащим полноразмерные CD8 α и CD8 β , или слитым пептидом, содержащим фрагменты как CD8 α , так и CD8 β .

[0246] Иллюстративное антитело к CD8 получали путем инъектирования мыши VELOCIMMUNE® (т. е. сконструированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека) полноразмерной ДНК CD8 α (SEQ ID NO: 17) и полноразмерной ДНК CD8 β (SEQ ID NO: 19). Последовательности ДНК вызывают экспрессию белка CD8 у мыши и могут обеспечивать получение структурно более точных белковых мишеней *in vivo*, к которым вырабатываются антитела. Иммуный ответ антител отслеживали с помощью CD8-специфического иммуноанализа. После достижения требуемого иммунного

ответа собирали спленоциты и сливали их с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и формирования клеточных линий гибридом. Клеточные линии гибридом подвергали скринингу и отбирали для идентификации клеточных линий, которые продуцируют CD8-специфические антитела. С помощью такой методики получали химерное антитело к CD8 (т. е. антитело, обладающее переменными доменами человека и константными доменами мыши). Полностью человеческую версию антитела можно получить путем замещения константной области мыши константной областью человека. Последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности переменной области иллюстративного антитела представлены в приведенной выше таблице 1. Иллюстративное антитело к CD8, полученное в соответствии с описанными выше способами, представляло собой антитело, обозначенное «mAb1».

[0247] Биологические свойства иллюстративных антитела, полученных в соответствии со способами данного примера, подробно описаны в изложенных ниже примерах.

Пример 2. Связывание антитела с CD8, определенное с помощью поверхностного плазмонного резонанса

[0248] Равновесные константы диссоциации (значения K_D) для связывания hCD8 α .mmh с очищенными mAb к CD8 определяли с использованием биодатчика поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени с помощью высокопроизводительного аминного сенсора Sierra Sensors MASS-1, поверхность дериватизировали путем иммобилизации по аминокислотной группе поликлонального козьего антитела к Fc мыши (GE, № BR-1008-38) для захвата очищенных mAb к CD8. Исследования связывания SPR проводили в буфере, состоящем из 0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества P20 (подвижный буфер HBS-ET). Различные концентрации hCD8 α с С-концевой мус-мус-полигистидиновой меткой (hCD8 α .mmh, REGN3940), полученные в подвижном буфере HBS-ET (в диапазоне от 300 нМ до 3,7 нМ, 3-кратные разведения), впрыскивали на поверхность с захваченными mAb к CD8 со скоростью потока 50 мкл/минута. Ассоциацию hCD8 α .mmh с захваченным моноклональным антителом отслеживали в течение 4 минут, и диссоциацию hCD8 α .mmh в подвижном буфере HBS-ET отслеживали в течение 10 минут. Все эксперименты по кинетике связывания

проводили при 25°C. Константы кинетической скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем аппроксимирования сенсограмм, полученных в режиме реального времени, к модели связывания 1:1 с применением программного обеспечения для аппроксимирования кривых Scrubber 2.0c. Равновесные константы диссоциации связывания (K_D) и полупериоды диссоциации ($t_{1/2}$) рассчитывали исходя из констант кинетической скорости:

$$K_D = \frac{k_d}{k_a}, \text{ и } t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_d}$$

[0249] Параметры кинетики связывания в случае связывания hCD8 α .mmh с очищенным моноклональным антителом к CD8 при 25°C показаны в таблице 2.

Таблица 2. Характеристики связывания антител

REGN №/PID Ab №	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин.)
H2aM25428N	1,59E+05	5,19E-03	3,26E-08	2,2

Пример 3. Связывание клеток с применением анализа FACS

[0250] Проточную цитометрию осуществляли для оценки связывания антител к CD8 или антител изотипического контроля с первичными CD8-положительными Т-клетками человека и Т-клетками яванского макака.

Характеристика связывания антител к CD8 с Т-клетками человека и обезьяны.

[0251] РВМС выделяли из пакетов с лейкоцитами человека или цельной крови яванского макака. Впоследствии из РВМС человека и РВМС яванского макака выделяли CD8-положительные Т-клетки, выделяли Т-клетки, которые были либо CD4, либо CD8-положительными.

а) Выделение CD8-положительных Т-клеток человека из пакетов с лейкоцитами человека.

[0252] Для исследования связывания mAb1 CD8-положительные Т-клетки человека выделяли из лейкопака с периферической кровью от одного здорового донора. Пакеты с лейкоцитами человека получали из Нью-Йоркского центра крови. Выделение РВМС осуществляли центрифугированием в градиенте плотности с применением 50 мл пробирок SepMate™ и согласно протоколу, рекомендованному производителем. Вкратце, 15 мл Ficoll-Paque PLUS наслаивали в 50 мл пробирки

SepMate™ с последующим добавлением 30 мл лейкоцитов, разведенных 1:2 с помощью PBS. Последующие стадии проводили в соответствии с протоколом производителя SepMate™. После выделения PBMC CD8-положительные Т-клетки обогащали с применением наборов микрогранул с CD8 человека от Miltenyi Biotec в соответствии с протоколом производителя. CD8-положительные Т-клетки размножали путем инкубирования клеток с человеческим Т-активатором CD3/CD28 Dynabead® в среде для культивирования первичных клеток человека (среда X-Vivo 15 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 0,01 мМ бета-меркаптоэтанола). Через 72 часа после инкубации с микрочипами CD3/CD28 Dynabead в культуральную среду дополняли рекомбинантным человеческим IL-2 (50 МЕ/мл). После того, как клетки размножились до необходимого количества клеток для анализа проточной цитометрии, удаляли Dynabead с помощью магнитного разделения и клетки немедленно использовали для определения связывания антител к CD8 или изотипических контролей.

b) Выделение Т-клеток яванского макака

[0253] Для выделения Т-клеток макака для анализа связывания антител использовали цельную кровь яванского макака от BioreclamationIVT. PBMC выделяли с применением 15 пробирок SepMate™ и с помощью центрифугирования в градиенте плотности в соответствии с протоколом производителя. Затем Т-клетки обогащали с применением набора для выделения Т-клеток Pan для отличных от человека приматов (Miltenyi Biotec) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителями. Обоогащенные Т-клетки затем активировали и размножали с помощью набора для активации/размножения Т-клеток (Miltenyi Biotec) для отличных от человека приматов в среде для культивирования первичных клеток обезьяны (среда X-Vivo 15, дополненная 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 0,01 мМ бета-меркаптоэтанола). Через 72 часа среду для культивирования первичных клеток дополняли рекомбинантным человеческим IL-2 (100 МЕ/мл) и Т-клетки размножали в течение одной недели. Магнитные гранулы, применяемые для активации и размножения Т-клеток, удаляли с помощью магнитным путем непосредственно перед окрашиванием клеток с помощью антител к CD8 или изотипического контроля.

c) Анализ проточной цитометрии связывания антитела mAb1 с CD8-положительными клетками человека и Т-клетками яванского макака.

[0254] Антитела mAb1 и изотипического контроля 4-кратно серийно разводили в буфере для окрашивания (PBS, содержащем 2% FBS) либо при 8-точечном титровании в случае CD8-положительных Т-клеток человека, либо при 11-точечном титровании в случае Т-клеток яванского макака, начиная с концентрации 200 нМ. Также в качестве контроля включали образец без первичного антитела, только буфер для окрашивания. Титры антител высевали, 50 мкл/лунка, в микропланшеты с V-образным дном. Первичные Т-клетки человека и яванского макака окрашивали в течение 15 минут с помощью фиксируемого фиолетового красителя для мертвых клеток LIVE/DEAD™ (Invitrogen), разведенного при 1:1000 в PBS. Клетки дважды промывали и ресуспендировали в PBS, содержащем 2% FBS. Для выделения гейтированием CD4⁺ Т-клеток обезьяны антитело к CD4 от BD Biosciences, которое вступает в реакцию с CD4⁺ Т-клетками яванского макака, инкубировали с Т-клетками обезьяны в течение 30 мин. на льду, и впоследствии клетки один раз промывали буфером для окрашивания. CD8-положительные Т-клетки человека и Т-клетки обезьяны в буфере для окрашивания высевали таким образом, что в лунки 96-луночного микропланшета с V-образным дном, содержащего оттитрованные антитела, добавляли 50 мкл клеточной суспензии, содержащей примерно 150000 Т-клеток. Для этого антитела 2-кратно разводили, соответственно, конечные концентрации находились в диапазоне от 100 нМ до 24 пМ в случае антител, инкубированных с CD8-положительными Т-клетками человека, или от 100 нМ до 0,10 пМ в случае антител, инкубированных с Т-клетками обезьяны. Клетки инкубировали с первичным антителом в течение 30 минут на льду, дважды промывали буфером для окрашивания (PBS, дополненный 2% FBS) и во все лунки добавляли вторичное козье антитело к IgG мыши с аллофикоцианином (APC) в концентрации 2 мкг/мл и инкубировали на льду в течение 30 минут. Затем образцы один раз промывали буфером для окрашивания, а впоследствии фиксировали в BD Cytotfix, разведенном при 1:1 буфером для окрашивания. После удаления буфера для фиксации клетки ресуспендировали в буфере для окрашивания и фильтровали перед анализом на приборе для проточной цитометрии Beckman Coulter Cytotflex. Образцы анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo10 таким образом, что в отношении связывания антител оценивали только жизнеспособные CD8-положительные отдельные клетки. Определяли геометрическую MFI для APC и наносили ее на график в зависимости от

концентраций антител, и с помощью четырехпараметрического логистического уравнения в GraphPad Prism™ определяли значения EC50 по 8 точкам данных в случае CD8-положительных Т-клеток человека или по 12 точкам для Т-клеток обезьяны, начиная со 100 нМ.

Результаты.

Анализ проточной цитометрии связывания антитела mAb1 с CD8-положительными клетками человека и Т-клетками яванского макака.

[0255] Способность mAb1 связывать CD8 человека и обезьяны оценивали с помощью проточной цитометрии (фигура 1). В качестве отрицательного контроля в этих экспериментах применяли нерелевантное изотипическое антитело. Дозозависимое связывание mAb1 наблюдали на CD8-положительных Т-клетках как человека, так и обезьяны. mAb1 демонстрировало значение EC50, составляющее 0,37 нМ, в случае CD8-положительных Т-клеток человека с примерно 2778-кратным увеличением MFI по сравнению с антителом изотипического контроля в количестве 25 нМ. mAb1 связывалось с Т-клетками яванского макака со значением EC50, составляющим 0,33 нМ, и приблизительно 1475-кратным увеличением MFI по сравнению с изотипическим контролем при 25 нМ. См. таблицу 3. Изотипический контроль не демонстрировал дозозависимого связывания ни с Т-клетками человека, ни с Т-клетками обезьяны. Эти результаты свидетельствуют о том, что mAb1 перекрестно реагирует с CD8 человека и обезьяны и связывает CD8 обоих видов со схожими значениями EC50.

Кратность изменения =
$$\frac{\text{Геометрическая MFI при 25 нМ mAb1}}{\text{Геометрическая MFI при 25 нМ изотипического антитела}}$$

Таблица 3. Анализ с помощью проточной цитометрии связывания mAb1 с CD8-положительными Т-клетками человека и Т-клетками яванского макака.

	Связывание клеток mAb1	
	Человек	Обезьяна
EC50 [нМ]	0,37	0,33
Кратность изменения	2778	1475

Пример 4. Изменение продуцирования IFN γ активированными Т-клетками в присутствии mAb1

[0256] Т-клетки активируются, когда их Т-клеточный рецептор (TCR) специфически распознает чужеродный антиген, презентируемый молекулами МНС на клетках-мишенях. Это взаимодействие может быть усилено наличием таких корецепторов, как CD4 и CD8, на Т-клетках, которые связывают невариабельные области МНСII или МНСI соответственно на взаимодействующих клетках-мишенях. Кроме того, эти корецепторы играют непосредственную роль в модулировании активности Т-клеток посредством ассоциации их цитоплазматического домена с тирозиновой протеинкиназой Lck. Вмешательство во взаимодействие между корецепторами и молекулами МНС может влиять на активность Т-клеток. С целью определения, изменяют ли CD8-специфические антитела активность Т-клеток, использовали анализ на основе реакции смешанных лимфоцитов (MLR). Анализ MLR является физиологически соответствующим *in vitro* средством активации Т-клеток. В однофакторном MLR лейкоциты от одного индивидуума совместно культивируют с лейкоцитами с арестом пролиферации от другого, генетически отличного индивидуума. Несовместимость аллогенных детерминант приводит к активации Т-клеток, которую можно оценить по продуцированию цитокинов и/или по пролиферации. В качестве показаний активности CD4+ Т-клеток обычно используют показатели цитокинов IFN γ и IL-2, а также пролиферацию. Однако было обнаружено, что активность CD8-положительных эффекторных Т-клеток лучше всего отражается по продуцированию в них IFN γ , в то время как IL-2 и пролиферация могут быть результатом эффектов «свидетеля» и непосредственно не связаны с долей активированных CD8-положительных Т-клеток (Anthony *et al.* 2012 - Dissecting the T Cell Response: Proliferation Assays vs. Cytokine Signatures by ELISPOT - *Cells*, 1, 127-140).

MLR-анализ CD8-положительных Т-клеток человека.

[0257] PBMC выделяли из пакетов с лейкоцитами человека и впоследствии подвергали обработке с отрицательным выделением с получением нетронутых CD8-положительных Т-клеток. Осуществляли однофакторный анализ MLR с использованием CD8-положительных Т-клеток для оценки, влияет ли mAb1 на активность Т-клеток, отмеченную с помощью продуцирования IFN γ .

Выделение PBMC и CD8-положительных Т-клеток человека из пакетов с лейкоцитами человека.

[0258] PBMC человека выделяли из четырех лейкопаков периферической крови от здоровых доноров, полученных из Нью-Йоркского центра крови. Выделение PBMC осуществляли центрифугированием в градиенте плотности с применением 50 мл пробирок SepMate™ и согласно протоколу, рекомендованному производителем. Вкратце, 15 мл Ficoll-Paque PLUS наслаивали в 50 мл пробирки SepMate™ с последующим добавлением 30 мл лейкоцитов, разведенных 1:2 с помощью PBS. Последующие стадии проводили в соответствии с протоколом производителя SepMate™. Фракцию выделенных PBMC ($> 300 \times 10^6$) осаждали замораживанием в FBS, содержащем 10% DMSO, в концентрации 50 миллионов клеток на флакон. Для оставшейся части PBMC CD8-положительные Т-клетки обогащали с применением наборов для выделения CD8 Т-клеток человека от Miltenyi Biotec в соответствии с протоколом производителя. Выделенные CD8-положительные Т-клетки впоследствии осаждали замораживанием в FBS, содержащем 10% DMSO, в концентрации 50 миллионов клеток на флакон. PBMC и CD8-положительные Т-клетки оттаивали в день проведения анализа MLR в среде для культивирования первичных клеток (среда X-Vivo 15, дополненная 10% фетальной бычьей сыворотки и 0,01 мМ бета-меркаптоэтанола), содержащей нуклеазу, представляющую собой бензоназу, в концентрации 50 миллионов клеток на 10 мл среды для культивирования первичных клеток, содержащей 500 ед. нуклеазы, представляющей собой бензоназу.

Схема анализа MLR

[0259] Среда для культивирования первичных клеток (125 мкл/лунка) вносили в каждую лунку круглодонного микротитрационного планшета. Трехточечное 10-кратное серийное разведение mAb1 и антитела изотипического контроля проводили в средах для культивирования первичных клеток, начиная с концентрации 400 нМ. Из полученного 25 мкл антитела высевали в трех повторностях в лунки круглодонных микропланшетов. Антитело составляло $1/8^{10}$ от общего объема в каждой лунке, что обеспечивало конечные концентрации антител 50 нМ, 5 нМ и 0,5 нМ. Также в качестве контролей включали лунки без антитела, только со средой для культивирования первичных клеток. В анализе MLR применяли отрицательно выделенные CD8-положительные Т-клетки от 3 доноров и PBMC от этих же 3 доноров, а также от дополнительного донора. PBMC обрабатывали митомицином С, разведенным до 50 мкг/мл в среде для стимуляции первичных клеток в концентрации 12×10^6 клеток/мл.

После инкубации при 37°C/5% CO₂ в течение 1 часа PBMC собирали в 50 мл конические пробирки и промывали в общей сложности 3 раза средой для культивирования первичных клеток. Эти клетки ресуспендировали до конечной концентрации 12 x 10⁶ клеток/мл в средах для культивирования первичных клеток и добавляли 25 мкл в лунки круглодонного микротитрационного планшета, что обеспечивало конечную концентрацию 300000 PBMC на лунку. Кроме того, для определения, могут ли только Т-клетки продуцировать IFN γ , в качестве контроля также были включены лунки без PBMC, только со средой и Т-клетками. Получали Т-клетки в концентрации 7 x 10⁶ клеток/мл в средах для культивирования первичных клеток и высевали 25 мкл в лунки круглодонного микротитрационного планшета, таким образом, конечная концентрация Т-клеток в каждой лунке составляла 175000. Для проверки того, что только PBMC не обеспечивают продуцирование IFN γ , в качестве контроля также были включены лунки без Т-клеток, только со средой. На лунку включали только Т-клетки от одного донора и обработанные митомицином С PBMC от одного донора. Т-клетки каждого из трех доноров сочетали с PBMC своего же донора или PBMC от других доноров. Через 72 часа после инкубации при 37°C/5% CO₂ микротитровальные планшеты центрифугировали с осаждением клеток и собирали 20 мкл супернатанта среды. Из собранного супернатанта 5 мкл исследовали в анализе AlphaLISA IFN γ человека в соответствии с протоколом производителя. Результаты измерений получали на многофункциональном планшет-ридере Envision (PerkinElmer). Необработанные значения RLU отражали на графике в виде гистограммы в GraphPad Prism™ и сравнивали количество продуцированного IFN γ в лунках, содержащих антитело, с лунками, содержащими только PBMC и Т-клетки, и рассчитывали в виде процента подавления продуцирования IFN γ .

Результаты.

[0260] Способность mAb1 воздействовать на активность CD8 Т-клеток измеряли в отношении продуцирования IFN γ в однофакторном MLR (фигура 2). В качестве контроля в этих экспериментах применяли нерелевантное изотипически сходное антитело. Приведенные ниже результаты и репрезентативные изображения для двух разных пар Т-клеток/PBMC свидетельствуют о том, что mAb1 способно дозозависимо снижать продуцирование IFN γ . Степень этого подавления, по-видимому, зависит от донора, поскольку одна пара донор/PBMC (реакция 1 MLR) демонстрирует <10%

подавление IFN γ при обработке 5 нМ mAb1, тогда как другая пара донор/РВМС (реакция 2 MLR) демонстрирует >50% подавление IFN γ . В обеих реакциях изотипический контроль оказывал минимальное влияние при 5 нМ в отношении продуцирования IFN γ . См. таблицу 4.

Расчет % подавления IFN γ :

$$\text{Подавление IFN}\gamma = 1 - \left(\frac{\text{Сигнал RLU от смеси РВМС/Т-клетки, инкубированной с 5 нМ}}{\text{Сигнал RLU от смеси РВМС/Т-клетки без антитела}} \right) \times 100$$

Таблица 4. Процентная доля подавления продуцирования IFN γ

Концентрация антитела	Реакция 1 MLR		Реакция 2 MLR	
	mAb1	Изотипическое	mAb1	Изотипическое
0,5 нМ	-11,4	0,5	29,8	2,3
5 нМ	7,6	3,9	51,6	3,4
50 нМ	21,4	-6,6	74,1	25,4

Пример 5. Изменение активности Т-клеток в присутствии mAb1

[0261] Т-клетки активируются, когда их Т-клеточный рецептор (TCR) специфически распознает чужеродный антиген, презентируемый молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС), также известными как лейкоцитарные антигены человека (HLA), на антигенпрезентирующих клетках (APC). Это взаимодействие может быть усилено наличием таких корецепторов, как CD4 и CD8, на Т-клетках, которые связывают невариабельные области МНСII или МНСI соответственно на взаимодействующих APC. Кроме того, эти корецепторы играют непосредственную роль в модулировании активности Т-клеток посредством ассоциации их цитоплазматического домена с тирозиновой протеинкиназой Lck (Goldrath et al., Selecting and maintaining a diverse T cell repertoire, Nature 402: 255-262, 1999; Denkberg et al. Critical Role for CD8 in Binding of MHC Tetramers to TCR: CD8 Antibodies Block Specific Binding of Human Tumor-Specific MHC-Peptide Tetramers to TCR, The Journal of Immunology, 2001, 167: 270-276; Cantrell et al., T cell Antigen Receptor Signal Transduction, Immunology, 2002, 105.4: 369-374; и Wang et al. 2009).

[0262] Молекула CD8 существует в виде гомодимера (CD8 $\alpha\alpha$) или гетеродимера (CD8 $\alpha\beta$) на поверхности субпопуляций клеток иммунной системы. В TCR $\alpha\beta$ Т-клетках экспрессируется гетеромерная форма CD8 $\alpha\beta$. Вмешательство во взаимодействие между корецепторами и молекулами МНС может влиять на активность Т-клеток.

[0263] С целью определения, изменяют ли специфичные к CD8 антитела активность Т-клеток, применяли биоанализ на основе Т-клеток/APC.

Конструирование репортерных Т-клеток.

[0264] События передачи сигнала с участием TCR можно отслеживать с помощью репортерных генов, управляемых различными факторами транскрипции, такими как белок-активатор 1 (AP-1), ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) или ядерный фактор «каппа-би» (NFκB) (Shapiro *et al.*, Cutting Edge: Nuclear Factor of Activated T Cells and AP-1 Are Insufficient for IL-2 Promoter Activation: Requirement for CD28 Up-Regulation of RE/AP, The Journal of Immunology, 1998, 161 (12): 6455-6458).

[0265] Клон Т-клеток человека, JRT3.T3.5, был сконструирован для экспрессии репортерного гена люциферазы светлячка под контролем фактора транскрипции AP-1. Устойчивые к антибиотикам клетки дополнительно подвергали трансдукции с помощью CD28 человека (NP_006130.1), альфа- и бета-субъединицы TCR 1G4 (Chen *et al.* 2000) и альфа- и бета-субъединицы CD8 человека (для альфа - регистрационный № NP_001759.3, и для бета - регистрационный № NP_004922.1). Получали один клон (JRT3.T3/AP1-Luc/CD28/CD8AB/1G4AB клон 18) и применяли его в экспериментах биоанализа с применением Т-клеток/APC с репортером. Установившуюся репортерную линию Т-клеток поддерживали в RPMI + 10% FBS + пенициллин/стрептомицин/глутамин (P/S/G), дополненной 100 мкг/мл гигромицина + 500 мкг/мл G418 + 1 мкг/мл пурамицина.

Конструирование APC.

[0266] Конструировали клеточную линию фибробластов 3T3 мыши с обеспечением стабильной сверхэкспрессии аллеля HLA-A*02 (регистрационный № P01892-1) и β2-микроглобулина человека (hβ2M; регистрационный № NP_004039.1) вместе с NY-ESO-1 157-165, пептидом с рестрикцией по HLA-A2*02, полученным из антигена рака яичка NY-ESO-1 (регистрационный № NP_001318.1).

[0267] Установившуюся линию APC поддерживали в DME + 10% BCS + P/S/G, дополненной 100 мкг/мл гигромицина + 500 мкг/мл G418 + 1 мкг/мл пурамицина.

Стимуляция Т-клеток/APC.

[0268] В разработанном биоанализе HLA-A2/NYESO1 (157-165) комплекс МНСI/пептид на сконструированной APC связывает и стимулирует TCR 1G4 (Robbins *et al.*, Single and Dual Amino Acid Substitutions in TCR CDRs Can Enhance Antigen-Specific T Cell Functions, J. Immunol. 2008; 180(9): 6116–6131) и приводит к повышению транскрипционной активности AP-1 в сконструированной репортерной линии Т-клеток. AP-1, в свою очередь, активирует транскрипцию репортерного гена люциферазы, который применяют в качестве средства для получения данных анализа. В этом биоанализе тестировали моноклональные антитела к CD8 для оценки их блокирующей активности.

Схема люциферазного анализа.

[0269] В качестве аналитической среды для получения клеточных суспензий и разведений антител с целью проведения скрининга антител к CD8 в день эксперимента применяли RPMI1640, дополненную 10% FBS и P/S/G.

[0270] За день до эксперимента сконструированные репортерные Т-клетки культивировали в среде для отбора при 5×10^5 клеток/мл. Получали 10-точечное серийное разведение 1:3 моноклональных антител к CD8 и отрицательных контролей сходного изотипа. Разведение моноклональных антител находилось в диапазоне от 15 пМ до 100 нМ. Последняя точка разведения не содержала антитела. Культивированные в течение ночи репортерные Т-клетки и APC-клетки ресуспендировали в аналитической среде при 2×10^6 /мл и 4×10^5 /мл соответственно. Реагенты добавляли в 96-луночные белые плоскодонные планшеты в следующем порядке: серийные разведения моноклональных антител добавляли пипеткой в соответствующие лунки с последующим внесением APC-клеток при 1×10^4 клеток/лунка. Планшеты инкубировали в течение 15-30 минут при комнатной температуре. Затем 5×10^4 репортерных Т-клеток добавляли поверх APC и образцы инкубировали в течение еще 4-6 часов при $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ перед добавлением 100 мкл реагента ONE-Glo™ (Promega) для выявления AP1-Luc-активности. Испускаемый свет регистрировали в относительных световых единицах (RLU) на многофункциональном планшет-ридере Enviosion (PerkinElmer). Все серийные разведения исследовали в двух повторностях.

[0271] Значения EC_{50} моноклональных антител к CD8 определяли исходя из

четырёхпараметрического логистического уравнения по 10-точечной кривой зависимости дозы от ответа с применением программного обеспечения GraphPad Prism. Процент снижения Т-клеточного ответа в биоанализе рассчитывали, как показано ниже:

$$\% \text{ снижения} = 100\% - [\text{среднее значение RLU mAb при } 100 \text{ нМ} \times 100 / \text{среднее значение RLU при } 0 \text{ нМ}]$$

Результаты.

[0272] В таблице 5 и на фигуре 3 показано, что mAb1 и коммерчески доступный клон RPA-T8 обеспечивали снижение люциферазной активности в сконструированных Т-клетках с IC_{50} , составляющей 1,2 нМ и 161 пМ соответственно. Как ожидалось, изотип 1 и изотип 2 не демонстрировали дозозависимого подавления. При 100 нМ mAb1 обеспечивало снижение активности Т-клеток на около 89,7%, тогда как клон RPA-T8 обеспечивал блокирование на 97,9%. По сравнению с клоном RPA-T8, mAb1 слабее блокировало взаимодействие CD8/MHCI. Было показано, что оба антитела связываются с субъединицей CD8 α человека в экспериментах Вiasore и ELISA. **Таблица 5. IC_{50} и % подавления Т-клеточного ответа с помощью моноклональных антител к CD8 в люциферазном анализе CD8 Т-клеток/APC**

Антитело	IC_{50} [М]	Снижение Т-клеточного ответа при 100 нМ [%]
Изотип 1	-	7,4
Изотип 2	-	6,2
Клон RPA-T8	1,61E-10	97,9
mAb1	1,2E-09	89,7

Пример 6. Количественное определение CD8 с применением LC-MS в ксенотрансплантатах Raji/PBMC и клинических образцах

[0273] Замороженные образцы тканей (опухолей Raji/PBMC, селезенок мышей и ткани меланомы) лизировали в 1× буфера для лизиса RIPA с ингибиторами протеаз (Thermo Fisher Scientific). Ткани разрезали на маленькие кусочки и гомогенизировали с 1 мл буфера для лизиса в плотно подогнанном гомогенизаторе Даунса. Лизат инкубировали на льду в течение 30 мин. с обработкой ультразвуком в течение 30 сек. каждые 10 мин. до достижения полной экстракции белка. Лизат центрифугировали при

14000 g в течение 10 мин. Концентрацию белка измеряли с помощью анализа ВСА. Каждый образец разводили до 1 мг/мл, центрифугировали при 14000 g в течение 10 мин. и хранили в аликвотах при -80°C.

[0274] Сто мкл биотинилированного связывающего CD8 α белка (2 мкг/мл) добавляли в каждую лунку покрытого стрептавидином 96-луночного планшета (Thermo Fisher Scientific). Затем планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов с последующей промывкой 3 раза с помощью PBST (pH 7,4, 0,05% Tween-20). В качестве суррогатных матриц применяли лизат селезенки мыши для построения стандартной кривой для количественной оценки CD8. В каждые 100 мкг лизата селезенки мыши вносили рекомбинантный CD8 α .mmh в конечной концентрации в диапазоне от 0,39 до 100 нг/мг белка (серийное разведение 1:2). Сто мкл исследуемого образца вносили в каждую лунку и инкубировали при к. т. в течение 2 часов. Каждую лунку затем 3 раза промывали с помощью 200 мкл PBST и один раз с помощью 200 мкл ddH₂O. Захваченный CD8 элюировали с помощью 100 мкл буфера для элюирования (3% муравьиной кислоты в 50% ACN) и полностью высушивали после переноса в новый 96-луночный планшет.

[0275] Каждый образец денатурировали в 10 мкл 8 М буфера на основе мочевины/ТСЕР при 37°C в течение 1 ч. Избирательно отслеживали сигнатурный пептид (AAEGLDTQR) из CD8 α и в качестве внутреннего стандарта в каждый образец вносили соответствующий пептид, меченный тяжелым изотопом (та же AA-последовательность, что и у Arg-¹³C₆¹⁵N⁴/ Lys-¹³C₆¹⁵N₂). Стандарты и исследуемые образцы алкилировали с помощью 5 мкМ IAA при к. т. в течение 30 мин. и расщепляли с помощью Lys-C (1:100 вес/вес) в течение 4 часов, а затем с помощью трипсина (1:20 вес/вес) в течение ночи при 37°C. Расщепление гасили путем добавления в каждый образец 10% муравьиной кислоты.

[0276] Каждый обработанный образец (15 мкл) впрыскивали в предварительно уравновешенную колонку nano C18 trap и пептиды отделяли с помощью колонки easy nano C18 с последующим анализом параллельного отслеживания реакций (PRM) с помощью масс-спектрометра Q Exactive plus. Калибровочную кривую каждого белка получали путем построения графика зависимости отношения площади пика L/H от концентрации введенного пептида. По калибровочным кривым рассчитывали

содержание эндогенного CD8 α в каждом образце ткани. Наиболее низкая концентрация эталонного стандарта CD8 α .mmh (эквивалентная 0,96 нг/мг эндогенного CD8 α) находилась в динамическом диапазоне анализа, и ее определяли как LLOQ (нижний предел количественного определения) анализа.

Результаты.

[0277] Экспрессию CD8 α анализировали в 5 опухолях и селезенках от мышей, которым имплантировали PBMC/Raji, в 2 опухолях и селезенках мышей, которым имплантировали только Raji, 10 клинических образцах меланомы и 5 нормальных прилегающих к меланоме тканей (NAT). Значения массы ткани, количества белка, выход после экстракции и экспрессия CD8 приведены в таблице 6. Вmax рассчитывали исходя из следующего уравнения с оценкой плотности опухоли при 1 г/мл.

$$V_{\max} \text{ (нМ)} = \frac{\text{CD8 (нг/мг белка)} \times \text{общее количество белка (мг)} \times 10E6}{2,57 * 10E4 \times \text{масса опухоли (мг)}}$$

Таблица 6. Значения массы ткани, количества белка, выход после экстракции и экспрессия CD8

Тип ткани	Образец	Масса опухоли (мг)	Белок (мг)	Выход белка (%)	CD8 α (нг/мг белка)	CD8_Vmax (нМ)
Меланома	131778T2(5)	250	24,1	9,6	29,4	55,2
Меланома	13841T2(1)	220	20,1	9,1	37,2	66,1
Меланома	13765T2(2)	250	19,4	7,8	4,5	6,8
Меланома	13524T2(7)	200	13,0	6,5	36,9	46,6
Меланома	13547T2(1)	220	16,1	7,3	32,9	46,8
Меланома	131086T6(1)	180	9,3	5,2	11,1	11,2
Меланома	131719T2(3)	230	17,6	7,7	9,3	13,9
Меланома	131291T2(1)	240	17,4	7,3	30,5	43,1
Меланома	131815T2(3)	290	9,1	3,1	29,0	17,7
Меланома	131778T2(5)	180	9,2	5,1	2,5	2,5
NAT	131291T1(1)	270	8,9	3,3	1,6	1,1
NAT	131086T1(1)	280	5,9	2,1	1,5	0,6
NAT	131719T1(2)	250	4,1	1,6	2,3	0,7
NAT	13841T1(1)	250	6,6	2,6	1,9	1,0
NAT	13788T1(2)	170	10,9	6,4	1,9	2,4
Опухоль, только Raji	M6T	140	7,2	5,2	0,1	0,1
Опухоль, только Raji	M7T	290	13,1	4,5	0,1	0,1

Опухоль, Raji/PBMC	M13T	320	12,7	4,0	15,0	11,6
Опухоль, Raji/PBMC	M14T	310	14,4	4,7	10,6	9,6
Опухоль, Raji/PBMC	M19T	370	17,0	4,6	6,1	5,5
Селезенка, только Raji	M6S	31	2,1	6,7	0,0	0,0
Селезенка, только Raji	M7S	28	2,0	7,2	0,0	0,0
Селезенка Raji/PBMC	M13S	20	1,3	6,7	6,2	8,0
Селезенка Raji/PBMC	M14S	16	1,3	7,9	0,6	0,9
Селезенка Raji/PBMC	M19S	27	1,9	7,0	1,8	2,5
Селезенка Raji/PBMC	M21S	29	1,8	6,3	2,0	2,5

Пример 7. Конъюгирование антитела mAb1 к CD8 с p-SCN-Bn-DFO

[0278] Для модификации исходного антитела mAb1 к CD8 (содержащего пару последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 2/10) и антитела изотипического контроля, подходящего для исследований ImmunoPET с мечением радиоактивной меткой, к антителам присоединяли хелатор p-SCN-bn-дефероксамин (DFO; Macrocylics, кат. № B-705).

[0279] Для модификации mAb1 концентрировали до примерно 29 мг/мл в PBS + 5% глицерина с помощью центрифужного концентратора с MWCO 10K (агрегат, представляющий собой центрифужный фильтр, Amicon Ultra-15, EMD Millipore, кат. № UFC901024). Концентрацию определяли с помощью спектрометра Nanodrop 2000 UV/VIS (Thermo Scientific) с использованием коэффициента экстинкции на основе последовательности MacVector, составляющего $212400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, и молекулярного веса 145654 г/моль. Пять миллиграммов концентрированного антитела разводили до 10 мг/мл с помощью 100 мМ NaCO₃, pH 9,0 (подтверждено, что конечное значение pH составляло 9,0).

[0280] В отдельном флаконе получали DFO в чистом диметилсульфоксиде (DMSO) при концентрации DFO, составляющей 50 мМ. Этот раствор DFO добавляли к раствору антитела с приращениями $\frac{1}{4}$, в результате чего конечный состав раствора

представлял собой 10 мг/мл mAb1 в буфере для конъюгации, 2% DMSO с 3-кратным мольным избытком DFO. Данному раствору обеспечивали инкубирование на водяной бане при 37°C без дополнительного перемешивания. Через 30 минут при 37°C раствор быстро пропускали через колонку для обессоливания NAP-5 (GE Healthcare, кат. № 17-0853-02), предварительно уравновешенную буфером, содержащим 10 мМ гистидина при pH 5,5 (буферной смесью). Конечный раствор подвергали стерилизующей фильтрации через шприцевой фильтр (13 мм шприцевой фильтр Acrodisc, Pall Corporation, кат. № 4602).

[0281] Затем с помощью UV/VIS-спектроскопии измеряли концентрацию антитела и соотношение DFO и антитела (соотношение хелатообразующего фрагмента к антителу). См. фигуру 4. Для измерения поглощения конъюгированное с DFO антитело измеряли относительно буферной смеси при 252 нм (A_{252}), 280 нм (A_{280}) и 600 нм (A_{600}). Для расчета производили коррекцию относительно фона при каждом значении поглощения с применением уравнения:

$$A'_{\lambda} = A_{\lambda} - A_{600}$$

[0282] Концентрацию антител, концентрацию конъюгата и соотношение хелатообразующего фрагмента к антителу рассчитывали с помощью приведенных ниже уравнений:

Расчет концентрации антитела

$$\text{Конц. mAB (мг/мл)} = \frac{A'_{280}}{\epsilon_{280}} * MW$$

Расчет концентрации конъюгата

$$\text{Конц. конъюгата (мг/мл)} = \frac{A'_{280} - 1.53A'_{252}}{\epsilon_{252} - 1.53\epsilon_{280}} * MW$$

Расчет соотношения хелатообразующего фрагмента к антителу

$$\text{DAR} = \frac{\epsilon_{252}A'_{280} - \epsilon_{280}A'_{252}}{18800A'_{252} - 28700A'_{280}}$$

[0283] Конъюгат на основе антитела исследовали в отношении агрегирования с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC), при этом 25 мкг образца вводили в колонку Superdex 200 Increase 10/300 GL

(GE Healthcare, кат. № 28990944), отслеживали при 280 нм с подвижной фазой PBS (0,75 мл/мин.). См. фигуру 5. Целостность антитела оценивали с помощью электроферограмм микрогидродинамики GXII (Caliper, ID чипа: P099P-0563N-03), и устанавливали настройки в соответствии с инструкциями производителя. См. фигуру 6.

Результаты.

[0284] Успешно конъюгировали mAb1 посредством лизина с DFO, как было показано с помощью UV/VIS-спектроскопии. Рассчитанное отношение хелатообразующего фрагмента к антителу, составляющее 1,7, находилось в ожидаемом диапазоне от 1,0 до 2,0. Графики SEC демонстрируют 97,5% мономерного продукта без выявляемых низкомолекулярных частиц. Этот результат подтвержден с помощью электроферограмм как в восстановленном, так и невосстановленном состоянии.

Таблица 7. Коэффициенты экстинкции и молекулярный вес «голового» антитела.

Серия исходного mAb	MW (гмоль ⁻¹)	ϵ_{280} (M ⁻¹ см ⁻¹)	ϵ_{252} (M ⁻¹ см ⁻¹)
mAb1-L1	145654	212400	80493

Таблица 8. Соотношение хелатообразующего фрагмента к антителу, концентрация и мономерная чистота конъюгата.

Серия конъюгата	УФ, соотношение хелатообразующего фрагмента к антителу	Концентрация (мг/мл)	% мономерной формы
mAb1-L2	1,68	5,57	97,5%

Пример 8. Образование хелатного соединения с ⁸⁹Zr моноклональных антител, конъюгированных с DFO

[0285] Для применения в *in vivo* исследованиях ImmunoPET конъюгированное с DFO антитело к CD8, mAb1-L2, метили радиоактивной меткой с применением ⁸⁹Zr.

[0286] Растворы иммуноконъюгата DFO-Ab составляли перед образованием хелатного соединения идентичным образом в случае обоих исследований под номерами 1 и 2. Композиция составов приведена в таблице 9. Вкратце, иммуноконъюгат DFO-Ab (212 мкг) сначала довели до 1,06 мг/мл в 1 М HEPES, pH

7.2. Отдельно получали раствор ^{89}Zr с использованием композиций для каждого соответствующего исследования, как показано в таблице 10. В результате 3D-визуализации получали исходный раствор ^{89}Zr -щавелевая кислота. Конечную радиоактивность раствора сначала подтверждали с помощью калибратора дозы Capintec CRC-25R (Capintec № 502), затем немедленно объединяли с раствором иммуноконъюгата DFO-Ab, осторожно перемешивали (пипетированием вверх-вниз), а затем инкубировали в течение 45 минут при комнатной температуре. Общий реакционный объем составлял 1200 мкл.

[0287] После инкубации смеси переносили в колонки для обессоливания, PD-10 (GE Healthcare, кат. № 17-0851-01), предварительно уравновешенные с помощью 250 мМ ацетата натрия при pH 5,4, для обессоливания с подачей самотеком. Поток, полученный после вхождения содержимого реакционной смеси в слой колонки, отбрасывали. Продукт элюировали с помощью 250 мМ ацетата натрия при pH 5,4 (буферной смеси) и собирали элюат в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию продукта, который теперь называли радиоиммуноконъюгатом DFO-Ab, затем измеряли с помощью UV/VIS-спектроскопии и рассчитывали с применением соответствующего коэффициента экстинкции и поглощения на 280 нм с помощью уравнения:

Концентрация в мг/мл = поглощение при 280 нм ÷ коэффициент экстинкции при 280 нм

См. таблицу 11.

[0288] Конечная масса, измеренная в граммах, записана в таблице 12. Затем измеряли радиоактивность с использованием калибратора дозы (Capintec, CRC-25R) и указывали в таблице 12. Конечный материал (5 мкг) анализировали с использованием SEC-HPLC с детекторами УФ при 280 и радиоизотопов (гамма-излучения) при последовательном соединении (Agilent 1260 с детектором Lablogic радио-TLC/HPLC, SCAN-RAM) с применением колонки Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare, кат. № 28990944) с подвижной фазой PBS при скорости потока 0,75 мл/мин. Данные радиоактивной метки использовали для определения радиохимической чистоты (100% - процентное содержание немеченого ^{89}Zr) путем сравнения интегрированного пика общего белка (от ~10 до ~18 мин.) и немеченого пика ^{89}Zr (~25 мин.). Мономерную

чистоту в процентах определяли с помощью данных при УФ 280 путем сравнения интегрированного пика частиц с высоким молекулярным весом (HMW) (от ~10 мин. до ~15 мин.) с мономером (от ~15 до ~18 мин.).

[0289] Удельную активность и извлечение белка (%) для каждого радиоиммуноконъюгата DFO-Ab определяли с помощью следующих уравнений:

а. Масса конъюгата в мг = концентрация в мг/мл x масса раствора в граммах

б. Удельная активность в мКи/мг = активность флакона в мКи ÷ масса конъюгата в мг

с. Извлечение белка = исходная масса конъюгата (мг) ÷ масса конъюгата в мг

[0290] Наконец, отмечали внешний вид и записывали в таблице 12. Результаты объединены в таблице 12. Хроматограммы радио-SEC-HPLC, показанные на фигурах 7 и 8, подтверждают по меньшей мере 99,9% радиохимическую чистоту. Хроматограммы UV280-HPLC SEC, показанные на фигурах 9 и 10, подтверждают наличие высокомономерного продукта (>90%).

[0291] Данные демонстрируют, что в обоих исследованиях DFO-радиоиммуноконъюгат был успешно и стабильно меченным радиоактивной меткой с помощью ^{89}Zr .

Таблица 9. Получение конъюгата DFO-антитело для мечения радиоактивной меткой

№ мечения радиоактивной меткой	№ исследования	№ серии иммуноконъюгата DFO-Ab	Концентрация (мг/мл)	Соотношение хелатообразующего фрагмента к антителу	Масса конъюгата (мг)	Общий объем (мкл)	Конечная концентрация (мг/мл)
1 и 2	1 и 2	mAb1-L2	5,57	1,68	212	200	1,06

Таблица 10. Получение реакционного раствора ^{89}Zr для мечения радиоактивной меткой

Мечение радиоактивной меткой	№ исследования	^{89}Zr -оксалат (мкл)	1 M HEPES, pH 7,2 (мкл)	Конечный объем (мкл)	Конечная активность	Удельная активность (мКи/мкл)

					сть (мкКи)	
1	1	8,0	992,0	1000	5220	5,220
2	2	6,8	993,2	1000	1607	1,607

Таблица 11. Коэффициенты экстинкции для серий конъюгатов

Конъюгат DFO-Ab	ϵ_{280} (AU, мл мг ⁻¹ см ⁻¹)
mAb1-L2	1,68

Таблица 12. Сводная информация в отношении иммуноконъюгатов DFO-Ab, меченных ⁸⁹Zr, для исследований *in vivo* визуализации и биораспределения

Мечение радиоактивной меткой	№ исследования	Серии радиоиммуноконъюгатов	Внешний вид	Радиохимическая чистота* (%)	Мономерная чистота** (%)	Извлечение белка (%)	Конц. (мг/мл)	Удельная активность (мКи/мг)
1	1	mAb1-L2-111016	Прозрачный	>99,9	98,5	71	0,085	24,8
2	2	mAb1-L2-111516	Прозрачный	>99,9	98,6	72	0,087	7,19

* согласно радио-SEC-HPLC, ** согласно UV-SEC-HPLC

Пример 9. Иммунореактивность

[0292] Иммунореактивность (IR) меченного радиоактивной меткой антитела к CD8, полученного согласно примерам 7 и 8, определяли следующим образом. Все растворы буферов/промывочных растворов получали с PBS и 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Seradigm, кат. № 1500-500). В таблице 13 представлено количество клеток, использованное для каждого анализа IR. Для каждого анализа ~10⁷ клеток JRT3.T3/AP1-luc/hCD28/hCD8AB 1G4 доводили до конечного объема 0,5 мл. В этот раствор добавляли двадцать нг соответствующего радиоиммуноконъюгата DFO-Ab и инкубировали 45 минут при 37°C, 5% CO₂ в термостате (ThermoScientific, Forma Steri-Cycle CO₂) с непрерывным перемешиванием на встряхивателе пробирок. Затем клетки осаждали центрифугированием при 1500 об./мин. в течение 5 минут с получением «клеточного осадка А». Удаляли супернатант (~0,5 мл) и вносили его в другой осадок наивных клеток, называемый «клеточный осадок В», и обеспечивали инкубирование при 37°C, 5% CO₂ еще в течение 45 минут. Во время инкубирования клеточного осадка В клеточный осадок А три раза промывали 1 мл свежей среды с центрифугированием при 1500 об./мин в течение 5 минут. Раствор после каждой промывки собирали и

сохраняли для последующего анализа. Затем, после 45-минутного периода инкубации клеточного осадка В, его три раза промывали 1 мл свежей среды с центрифугированием при 1500 об./мин. в течение 5 минут. Снова раствор после каждой промывки собирали для анализа.

[0293] Радиоактивность клеточных осадков, всех промывочных растворов и супернатанта подсчитывали в автоматическом гамма-счетчике (2470 Wizard2, Perkin Elmer) для каждого иммунорадиоиммуноконъюгата. IR в процентах определяли с помощью уравнения 1 и записывали в таблицу 14.

IR (%)

$$= \frac{\text{Клеточный осадок A} + \text{Клеточный осадок B} [\text{CPM}]}{\text{Клеточный осадок A} + \text{Клеточный осадок B} + \text{Промывочный раствор 1} + \text{Промывочный раствор 2} + \text{Промывочный раствор 3} + \text{Супернатант} [\text{CPM}]}$$

[0294] Как видно из таблицы 14, радиоиммуноконъюгаты на основе антитела сохраняли по меньшей мере 55% иммунореактивности после конъюгации и мечения радиоактивной меткой.

Таблица 13. Количества клеток, использованные на осадок для каждой серии радиоиммуноконъюгата

№ серии радиоиммуноконъюгата	Количество клеток в осадке А	Количество клеток в осадке В
mAb1-L2-111016	2,25 *10 ⁷ клеток	2,25*10 ⁷ клеток
mAb1-L2-111516	1,5*10 ⁷ клеток	1,5*10 ⁷ клеток

Таблица 14. Иммунореактивность DFO-конъюгатов, образующих хелатное соединение с ⁸⁹Zr

Образцы	mAb1-L2-111016	mAb1-L2-111516
Иммунореактивность	57%	55%

Пример 10. Избирательная локализация меченного радиоактивной меткой антитела к CD8 in vivo у мышей, экспрессирующих hCD8

Введение дозы и PET/CT-визуализация ⁸⁹Zr-DFO-mAb1:

[0295] 16-недельным мышам, экспрессирующим hCD8, вводили ⁸⁹Zr-DFO-mAb1 при дозе белка 0,5 или 1,5 мг/кг. Мыши, которым вводили инъекцией дозу 0,5 мг/кг, получали 7 мкг меченного радиоактивной меткой mAb1-L2-20161115 (~48 мкКи) и

дополнительные 8 мкг не конъюгированного с DFO mAb1 (L1) в качестве добавки с получением конечной общей дозы введенного инъекцией белка. Мыши, которым вводили инъекцией дозу 1,5 мг/кг, получали 7 мкг меченного радиоактивной меткой mAb1-L2-20161115 (~48 мкКи) и дополнительные 38 мкг не конъюгированного с DFO mAb1 (L1) в качестве добавки с получением конечной общей дозы введенного инъекцией белка.

[0296] PET-визуализацию локализации антитела оценивали через 6 дней после введения ^{89}Zr -DFO-mAb1. Для получения PET/СТ-изображений применяли систему Sofie Biosciences G8 PET/СТ (Sofie Biosciences и Perkin Elmer). Перед получением изображений прибор предварительно калибровали для выявления ^{89}Zr . Канал регистрации излучения варьировался от 150 до 650 кэВ с восстановленным разрешением 1,4 мм в центре поля зрения. Мышей подвергали вводной анестезии с помощью изофлурана и держали при непрерывном потоке изофлурана в ходе визуализации. Статические 10-минутные изображения получали с применением программного обеспечения для получения изображений G8, а затем реконструировали с использованием предварительно заданных настроек. Данные изображений корректировали с учетом затухания и других параметров. Получали СТ-изображения после получения PET, а затем совместно регистрировали их с PET-изображениями. Изображения получали с применением программного обеспечения для постобработки VivoQuant (inviCRO Imaging Services).

Биораспределение ^{89}Zr -DFO-mAb1.

[0297] Для исследований биораспределения мышей подвергали эвтаназии в конечный момент времени (через 6 дней после введения ^{89}Zr -DFO-mAb1) и собирали кровь посредством пункции сердца. Вырезали ткани, помещали в пробирки для подсчета и взвешивали. Данные подсчета для ^{89}Zr в импульсах в минуту (CPM) получали с использованием автоматического гамма-счетчика (Wizard 2470, Perkin Elmer). Введенную инъекцией дозу на грамм в процентах (% ID/г) рассчитывали для каждого образца с применением стандартов, полученных из инъецированного материала.

Результаты.

[0298] С помощью этого эксперимента продемонстрирована способность ^{89}Zr -

DFO-mAb1 нацеливаться на CD8 человека, экспрессируемый на эндогенных Т-клетках в селезенке и лимфатических узлах мышей, экспрессирующих hCD8. Более низкая доза введенного белка, составляющая 0,5 мг/кг, демонстрировала более быстрый опосредованный антигеном клиренс из крови на 6-й день после инъекции радиоактивной метки ($3,57 \pm 1,50$ % ID/г) по сравнению с более высокой дозой введенного белка, составляющей 1,5 мг/кг ($10,32 \pm 1,54$ % ID/г). Этот более быстрый клиренс из крови у мышей, которым инъекцией вводили более низкую дозу введенного белка, можно объяснить более высоким поглощением во вторичных лимфоидных органах, чем у мышей, которым инъекцией вводили более высокую дозу введенного белка, что демонстрирует антиген-специфическое нацеливание на CD8, экспрессируемый в селезенке и лимфатических узлах. Значения % ID/г, полученные в результате экспериментов по биораспределению, на 6-й день после инъекции ^{89}Zr -DFO-mAb1 у мышей, экспрессирующих hCD8, показаны в таблице 15. Репрезентативные iPET-изображения для 0,5 и 1,5 мг/кг ^{89}Zr -DFO-mAb1 на 6-й день после инъекции у мышей, экспрессирующих hCD8, показаны на фигуре 11.

Таблица 15. Ex vivo биораспределение на 6-й день после введения ^{89}Zr -DFO-mAb1, инъецированного мышам, экспрессирующим hCD8, при дозах белка 0,5 или 1,5 мг/кг.

ОБРАЗЕЦ	0,5 мг/кг (n = 3)		1,5 мг/кг (n = 3)	
	Среднее % ID/г	STDEV % ID/г	Среднее % ID/г	STDEV % ID/г
Кровь	3,57	1,50	10,32	1,54
Пах. ЛУ	85,30	24,35	71,00	17,83
Брыж. ЛУ	103,56	7,00	65,71	12,13
Селезенка	105,51	18,60	37,07	4,80
Тимус	9,63	0,93	13,83	0,53
Сердце	1,28	0,23	2,81	0,46
Легкие	4,11	2,68	6,63	0,94
Желудок	0,64	0,17	0,70	0,20
Тонк. кишечник	6,28	2,42	4,78	1,06
Печень	5,05	1,92	3,97	0,44
Почки	10,00	0,96	6,44	0,69
Мышца	0,47	0,21	0,84	0,20
Кость	3,73	0,55	4,16	0,51

Соотношение брыж. ЛУ к крови	32,67	14,15	6,35	0,39
Соотношение селезенки и крови	31,93	8,72	3,6	0,14

Значения представлены в виде средних значений и стандартных отклонений введенной инъекцией дозы на грамм ткани в процентах (% ID/г) и соотношений ткани и крови ($n = 3$ для обеих доз белка, составляющих 0,5 и 1,5 мг/кг). Сокращения: пах. ЛУ – паховые лимфатические узлы; брыж. ЛУ – брыжеечные лимфатические узлы; тон. кишечник – тонкий кишечник.

Пример 11. Избирательная локализация меченного радиоактивной меткой антитела к CD8 в отношении опухолей Raji/PBMC у мышей

[0299] В этом примере описана *in vivo* визуализация и *ex vivo* биораспределение меченного цирконием⁸⁹ конъюгата DFO и антитела к CD8 у самок мышей NSG, которым совместно имплантировали клетки Raji и PBMC человека.

Имплантация опухолей и распределение по группам введения дозы.

[0300] Для демонстрации специфичности меченного радиоактивной меткой антитела в отношении нацеливания на CD8 2×10^6 клеток Raji имплантировали отдельно или совместно с 5×10^5 PBMC человека (серия 0160614, ReachBio Research Labs) в правый бок самок мышей NSG (возрастом 8–10 недель; NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ; Jackson Labs). Отслеживали рост опухоли и через 13-14 дней после имплантации опухоли мышей рандомизировали на группы по 4 для введения дозы ⁸⁹Zr-DFO-mAb1. При введении ⁸⁹Zr-DFO-mAb1 опухоли Raji и Raji/hPBMC были $\sim 335 \pm 68$ мм³ и $\sim 371 \pm 40$ мм³ соответственно.

Введение дозы и PET/CT-визуализация ⁸⁹Zr-DFO-mAb1.

[0301] Мышам, несущим подкожные опухоли Raji или Raji/hPBMC, инъекцией вводили дозу 0,1 мг/кг ⁸⁹Zr-DFO-mAb1 (~ 66 мкКи и 2,8 мкг белка).

[0302] PET-осуществление визуализации локализации антител оценивали через 6 дней после введения ⁸⁹Zr-DFO-mAb1. Для получения PET/CT-изображений применяли систему Sofie Biosciences G8 PET/CT (Sofie Biosciences и Perkin Elmer). Перед получением изображений прибор предварительно калибровали для выявления

^{89}Zr . Канал регистрации излучения варьировался от 150 до 650 кэВ с восстановленным разрешением 1,4 мм в центре поля зрения. Мышей подвергали вводной анестезии с помощью изофлурана и держали при непрерывном потоке изофлурана в ходе визуализации. Статические 10-минутные изображения получали с применением программного обеспечения для получения изображений G8, а затем реконструировали с использованием предварительно заданных настроек. Данные изображений корректировали с учетом затухания и других параметров. Получали СТ-изображения после получения PET, а затем совместно регистрировали их с PET-изображениями. Изображения получали с применением программного обеспечения для постобработки VivoQuant (inviCRO Imaging Services).

Биораспределение $^{89}\text{Zr-DFO-mAb1}$.

[0303] Для исследований биораспределения кровь собирали с помощью пункции сердца после конечного PET-сканирования через 6 дней после введения $^{89}\text{Zr-DFO-mAb1}$. Мышей умерщвляли, а затем опухоли Raji или Raji/hPBMC вместе с другими нормальными тканями вырезали, помещали в пробирки для подсчета и взвешивали. Данные подсчета для ^{89}Zr в импульсах в минуту (CPM) получали с использованием автоматического гамма-счетчика (Wizard 2470, Perkin Elmer). Введенную инъекцией дозу на грамм в процентах (% ID/г) рассчитывали для каждого образца с применением стандартов, полученных из инъецированного материала.

Результаты.

[0304] С помощью данного исследования была продемонстрировано антигенспецифическое нацеливание $^{89}\text{Zr-DFO-mAb1}$ на CD8, экспрессируемый на внутриопухолевых лимфоцитах человека в s.c. опухолях Raji/hPBMC ($31,11 \pm 8,82$ % ID/г), по сравнению с опухолями из только Raji ($6,39 \pm 0,93$ % ID/г), выращенными у мышей NSG. Соотношения показателей в опухоли и крови в случае опухолей Raji/hPBMC и только Raji составляли $3,32 \pm 0,11$ и $0,43 \pm 0,07$ соответственно. Более того, имело место повышенное поглощение в селезенках мышей, которым были совместно имплантированы опухоли Raji/hPBMC. Репрезентативные iPET-изображения (фигура 12) мышей, несущих опухоли Raji и Raji/hPBMC, через 6 дней после инъекции $^{89}\text{Zr-DFO-mAb1}$ демонстрируют более высокое нацеливание $^{89}\text{Zr-DFO-mAb1}$ на опухоль и селезенку у мышей, несущих опухоли Raji/hPBMC, по сравнению

с мышами, несущими только опухоль Raji. Значения % ID/г, полученные в результате экспериментов по биораспределению на 6-й день после инъекции ^{89}Zr -ДФО-mAb1 (таблица 16), подтверждали данные iPET-визуализации.

Таблица 16. Ex vivo биораспределение на 6-й день после введения ^{89}Zr -ДФО-mAb1, инъецированного при дозе белка, составляющей 0,1 мг/кг, мышам NSG, несущим опухоли Raji или Raji/hPBMC.

ОБРАЗЕЦ	Мыши, несущие опухоли Raji		Мыши, несущие опухоли Raji/hPBMC	
	Среднее значение % ID/г	STDEV % ID/г	Среднее значение % ID/г	STDEV % ID/г
Кровь	14,81	0,96	10,14	2,79
Опухоль	6,39	0,93	31,11	8,82
Селезенка	4,75	0,35	56,35	36,45
Тимус	6,56	1,70	3,96	0,76
Сердце	3,42	0,65	2,41	0,57
Легкие	11,22	1,76	9,02	0,40
Желудок	0,57	0,08	0,56	0,19
Тонк. кишечник	1,18	0,26	1,01	0,23
Печень	2,62	0,13	8,64	3,04
Почки	4,00	0,59	4,31	0,78
Мышца	1,08	0,17	0,84	0,20
Кость	2,81	0,55	5,36	1,29
Соотношение показателей в опухоли и крови	0,43	0,07	3,32	0,11

Значения представлены в виде среднего значения и стандартных отклонений введенной инъекцией дозы на грамм ткани в процентах (% ID/г) и соотношений показателей в опухоли и крови.

Пример 12. Обработка мышей слабым функциональным блокатором CD8 Mab1 не оказывает отрицательного влияния на клиренс острой инфекции LCMV у гуманизированных мышей.

[0305] Экспериментальные данные из этого примера основаны на ранее опубликованной модели: инфицирование мышей C57Bl/6 штаммом Armstrong вируса лимфоцитарного хориоменингита (штамм Armstrong вируса LCMV или LCMV Arm) вызывает острую инфекцию, разрешение которой зависит от выработки

функционального ответа CD8⁺ CTL (PNAS. Vol. 91, pp. 10854-10858; J Virol. 1987 Jun;61(6):1867-74). В этом примере генетически конструировали мышей с обеспечением экспрессии человеческих корцепторов TCR, HLA, CD4 и CD8, названных гуманизированными мышами. Гуманизированных мышей заражали LCMV Arm (2×10^5 БОЕ (бляшкообразующая единица), внутрибрюшинная инъекция (i.p.)) и наблюдали разрешение острой инфекции, сходное с таковым у контрольных мышей C57Bl/6, хотя и с немного отсроченной кинетикой (дни 12-21 после инфицирования по сравнению с днями 8-10 у контролей) (данные не показаны).

[0306] В этом примере применяли модель острой инфекции LCMV у гуманизированных мышей для оценки влияния антител к CD8 человека с дифференциальной блокирующей активностью в отношении устранения вируса. Группы состояли из мышей, которых обрабатывали А) снижающим количество CD8 Т-клеток антителом (ОКТ8), которое принимали за положительный контроль, В) сильным блокирующим активностью CD8 антителом, С) слабым блокирующим активностью CD8 антителом (Mab1) и D) не связывающимся с CD8 белковым контролем. Показатели блокирующей активности у В и С оценивали с помощью сконструированного биоанализа, описанного в примере 5.

[0307] Снижающее количество клеток антитело ОКТ8 вводили за 2 дня до, за 1 день до и через 1 после инфицирования при 100 мкг/доза i.p., тогда как при остальных условиях обработки вводили однократную дозу 0,5 мг/кг i.p. за один день до инфицирования. Мышей инфицировали LCMV Arm (2×10^5 БОЕ, i.p.), и в группах мышей собирали селезенки на день 5, 14 и 21 после инфицирования. Титры вируса оценивали в гомогенизированной ткани селезенки с помощью стандартных способов анализа бляшек.

[0308] На 5-й день после инфицирования, как показано на фигуре 13, все группы обработки имели высокие титры LCMV ($>1 \times 10^5$ БОЕ/мл), демонстрируя надлежащее развитие вирусной инфекции у генетически модифицированных мышей. Как и у мышей C57Bl/6, клиренс LCMV у гуманизированных мышей зависел от CD8, поскольку снижение количества CD8 Т-клеток с помощью антитела ОКТ8 к CD8 человека приводило к задержке клиренса инфекции LCMV в течение первого месяца после инфицирования. Мыши, обработанные снижающим количество CD8 клеток антителом ОКТ8, не могли обеспечить клиренс вируса, и у них сохранялись высокие

титры вируса ($>1 \times 10^5$ БОЕ/мл) как на 14-й день, так и на 21-й день после инфицирования, в то время как в контрольной группе постепенно происходил клиренс вируса до предела выявления (LOD 100 БОЕ/мл). Мыши, обработанные однократной дозой Mab1, слабого CD8-блокатора функции CD8 Т-клеток, демонстрировали клиренс вируса, схожий с таковым у несвязывающегося контроля, без статистического различия (n.s.). Обработка мышей однократной дозой антитела, которое сильно блокирует функцию CD8, демонстрировала промежуточный фенотип клиренса вируса, который статистически отличался от клиренса как у группы слабого блокатора, так и у контрольной группы несвязывающегося белка на 21-й день ($p < 0,05$). Все группы обработки на 21-й день статистически отличались от группы снижающего количество клеток ОКТ8 ($p < 0,01$). См. фигуру 13.

[0309] В совокупности данные демонстрируют, что более слабое блокирующее антитело к CD8 (mAb 1) в терапевтически релевантной дозе не нарушает способность у гуманизированных мышей обеспечивать клиренс инфекции LCMV, и, следовательно, функция Т-клеток не нарушена по сравнению как с положительным контролем (снижающим количество CD8 клеток антителом) и отрицательным контролем (несвязывающимся контрольным белком).

Пример 13. Конъюгирование mAb1 с флуоресцентными соединениями NIR

[0310] Примерно 10 мг антитела, mAb1, подвергали замене буфера с буфера для составления (на основе гистидина) на 50 мМ карбонат, pH 8,4, посредством предварительно настроенной колонки Nap-5 (GE Healthcare, кат. № 17085302) в соответствии с инструкциями производителя. Этот процесс проводили в четырех повторностях, каждый элюат (400 мкл) собирали и объединяли в общей сложности до 1600 мкл. С помощью UV/VIS-спектрометрии (UV/VIS-спектрометр Nanodrop 2000, Thermo Scientific, кат. № ND-2000c-US-CAN) определили, что концентрация объединенного элюата составляет 18,1 мг/мл.

[0311] В случае конъюгаций с IRDye 800CW (Li-Cor, кат. № 929-70020) 2, 4 или 6-кратный молярный избыток 10 мМ IRDye 800CW, сложный эфир NHS, в DMSO вводили в 7,2 мг (400 мкл) mAb1, подвергнутого замене буфера. После осторожного перемешивания с помощью пипетки обеспечивали протекание реакции в течение 2 часов при комнатной температуре в состоянии покоя в темноте.

[0312] Для конъюгации с цианиновым Vivotag680XL (Perkin-Elmer, кат. № NEV11120) 2-кратный молярный избыток 10 мМ VivoTag680XL в DMSO вводили в 7,2 мг (400 мкл) mAb1, подвергнутого замене буфера. После осторожного перемешивания с помощью пипетки обеспечивали протекание реакции в течение 2 часов при комнатной температуре в состоянии покоя в темноте.

[0313] При каждой реакции конъюгации осуществляли замену буфера с помощью колонки Nap-5, предварительно настроенной с помощью PBS плюс 5% глицерина, рН 7,4, для удаления прореагировавшего красителя. Вкратце, при каждой реакции конъюгации фракционировали общий элюат объемом 1000 мкл и каждую фракцию анализировали с помощью UV/VIS-спектрометра на наличие белка. Фракции с высоким содержанием белка объединяли. Конечную концентрацию белка и соотношение красителя и антитела (DAR) для каждой реакции определяли с помощью UV/VIS-спектрометрии согласно инструкциям производителя. Результаты подытожены в таблице 17.

[0314] Было определено, что при всех условиях конъюгирования мономерная чистота превышала или равнялась 95,0% согласно результатам анализа эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии, SE-HPLC, с отслеживанием при поглощении при 280 нм (колонка: Superdex 200 10/300 GL SEC Column, GE Lifesciences, кат. № 28990944). Результаты подытожены в таблице 17. Целостность антитела анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE, Novex 4 – 20% трис-глицериновый гель, ThermoFisher Scientific, кат. № EC6026BOX) как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях. По сравнению с неконъюгированным антителом фрагментации конъюгатов не наблюдали.

Таблица 17. DAR, концентрация и мономерная чистота конъюгатов с IR-красителем.

Краситель	Условие конъюгирования (соотношение красителя и антитела)	DAR	Конечная концентрация (мг/мл)	Мономерная чистота согласно SE-HPLC (%)
IRDye 800CW	2 к 1	0,16	12,7	97,4

IRDye 800CW	4 к 1	0,34	12,5	97,5
IRDye 800CW	6 к 1	0,57	11,1	95,0
VivoTag680 XL	2 к 1	1,51	14,6	96,3

[0315] Описанные выше варианты осуществления и примеры предназначены только для иллюстрации и не являются ограничивающими. Специалистам в данной области техники будут известны, или они смогут выяснить с помощью лишь стандартных экспериментов, многочисленные эквиваленты конкретных соединений, материалов и процедур. Все такие эквиваленты считаются находящимися в объеме и охвачены прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD8, где антитело или его фрагмент демонстрируют одну или более из следующих характеристик:

(a) представляют собой полностью человеческое моноклональное антитело;

(B) связываются с CD8 с K_D , равной $3,5 \times 10^{-8}$ М или меньше, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(c) связываются с CD8 α человека;

(d) подавляют продуцирование IFN γ в активированных CD8 Т-клетках;

(e) ингибируют белок-активатор фактора транскрипции (AP-1) в активированных Т-клетках и

(f) перекрестно реагируют с CD8 человека и обезьяны.

2. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD8, где антитело или его фрагмент содержат три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) под SEQ ID NO: 2; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи (LCVR) под SEQ ID NO: 10.

3. Выделенное антитело по п. 1 или п. 2, содержащее аминокислотную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 2.

4. Выделенное антитело по п. 1 или п. 2, содержащее аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 10.

5. Выделенное антитело по п. 1 или п. 2, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 2/10.

6. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество одного или более выделенных человеческих моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов по любому из пп. 1—5 вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

7. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая человеческое моноклональное антитело или его фрагмент, которые связываются с CD8, по любому из пп. 1—5.

8. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческое моноклональное антитело или его фрагмент, которые связываются с CD8, по п. 7.

9. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п. 8.

10. Меченный радиоактивной меткой конъюгат на основе антитела, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают CD8, и позитронный излучатель.

11. Меченный радиоактивной меткой конъюгат на основе антитела, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают CD8, хелатообразующий фрагмент и позитронный излучатель.

12. Конъюгат по п. 11, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно связаны с хелатообразующим фрагментом, L, формулы (A):

$$-L-M_z$$

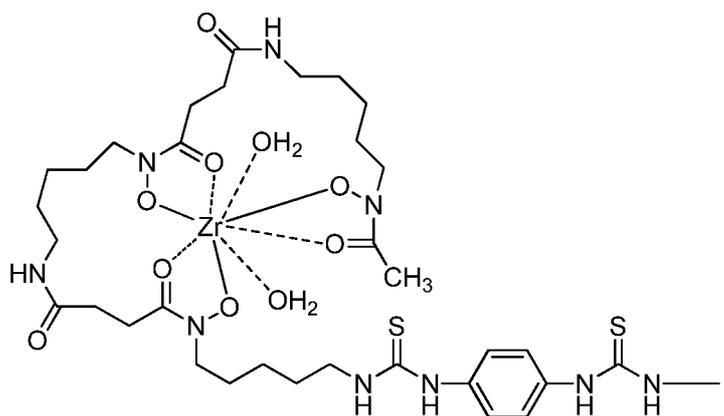
(A),

где M представляет собой позитронный излучатель; и z независимо в каждом случае равняется 0 или 1; и при этом по меньшей мере один из z равняется 1.

13. Конъюгат по п. 11 или п. 12, где хелатообразующий фрагмент предусматривает десферриоксамин.

14. Конъюгат по любому из пп. 10—12, где позитронный излучатель представляет собой ^{89}Zr .

15. Конъюгат по любому из пп. 12—14, где -L-M представляет собой:



16. Конъюгат по любому из пп. 10—15, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно связаны с одним, двумя или тремя фрагментами формулы (A).

17. Конъюгат по любому из пп. 10—16, где антитело содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10.

18. Конъюгат по любому из пп. 10—17, где антитело характеризуется одним или более свойствами, выбранными из группы, состоящей из следующего:

(a) связывается с CD8 человека с равновесной константой диссоциации (K_D), характеризующей связывание, составляющей менее приблизительно $3,5 \times 10^{-8}$ M, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(b) связывается с CD8 α человека;

(c) подавляет продуцирование IFN γ в активированных CD8 T-клетках;

(d) ингибирует белок-активатор фактора транскрипции (AP-1) в активированных T-клетках и

(e) перекрестно реагирует с CD8 человека и обезьяны.

19. Конъюгат по любому из пп. 10—18, где антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR под SEQ ID NO: 2/10.

20. Способ визуализации ткани, которая экспрессирует CD8, предусматривающий введение в ткань меченого радиоактивной меткой конъюгата на

основе антитела по любому из пп. 10—19 и визуальное наблюдение экспрессии CD8 посредством визуализации с применением позитронно-эмиссионной томографии (PET).

21. Способ лечения субъекта, у которого имеется солидная опухоль, с помощью средства терапии, представляющего собой ингибитор контрольных точек, предусматривающий

(a) определение, содержатся ли в солидной опухоли CD8-положительные Т-клетки; и

(b) если в опухоли содержатся CD8-положительные Т-клетки, введение субъекту одной или более доз средства терапии, представляющего собой ингибитор контрольных точек,

где наличие CD8-положительных Т-клеток в опухоли указывает на чувствительность опухоли к лечению с помощью средства терапии, представляющего собой ингибитор контрольных точек.

22. Способ по п. 21, где стадия (a) предусматривает

(i) введение субъекту меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела по любому из пп. 10—19 и

(ii) осуществление визуализации локализации меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в опухоли посредством визуализации с применением позитронно-эмиссионной томографии (PET), при этом наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в опухоли указывает на то, что в опухоли содержатся CD8-положительные клетки.

23. Способ по п. 22, где субъекту вводят 0,1-10 мг/кг меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела.

24. Способ по п. 22, где функция Т-клеток является ненарушенной вследствие введения меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела.

25. Способ по п. 22 или п. 24, где меченный радиоактивной меткой конъюгат на основе антитела вводят субъекту подкожно или внутривенно.

26. Способ по любому из пп. 22—25, где PET-визуализацию осуществляют через 2-7 дней после введения меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела.

27. Способ по любому из пп. 21—25, где стадию (а) осуществляют перед стадией (b).

28. Способ по любому из пп. 21—27, дополнительно предусматривающий

(с) повторное осуществление стадии (а) после лечения субъекта с помощью по меньшей мере одной дозы средства противоопухолевой терапии, и при этом увеличение относительно исходного уровня в области локализации меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела в опухоли указывает на эффективность средства противоопухолевой терапии.

29. Способ по п. 22, где субъекту вводят меченный радиоактивной меткой конъюгат на основе антитела через 1-20 недель после введения средства противоопухолевой терапии.

30. Способ по п. 21, дополнительно предусматривающий стадию определения того, что солидная опухоль является PD-1-положительной, путем введения нуждающемуся в этом субъекту меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к PD-1 и осуществления визуализации локализации меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к PD-1, в опухоли посредством PET-визуализации, где наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к PD-1 в опухоли указывает на то, что опухоль является PD-1-положительной.

31. Способ по любому из пп. 21—30, где средство противоопухолевой терапии выбрано из группы, состоящей из ингибитора сигнальной оси PD-1/PD-L1, ингибитора CTLA-4, ингибитора TIM3, ингибитора BTLA, ингибитора TIGIT, ингибитора CD47, ингибитора GITR, антагониста другого T-клеточного коингибитора или лиганда, ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагониста фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), ингибитора Ang2, ингибитора трансформирующего фактора роста бета (TGF β), ингибитора рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), ингибитора CD20, антитела к опухоль-специфическому антигену, противораковой вакцины, биспецифического антитела, цитотоксина, химиотерапевтического средства, циклофосфида, средства лучевой терапии, ингибитора IL-6R, ингибитора IL-4R,

ингибитора IL-10, IL-2, IL-7, IL-21, IL-15 и конъюгата антитела и лекарственного средства (ADC).

32. Способ по любому из пп. 21—30, где средство противоопухолевой терапии выбрано из группы, состоящей из REGN2810, BGB-A317, ниволумаба, пидилизумаба, пембролизумаба, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба, MDX-1105, REGN3504, ипилимумаба, антитела к CD-28, антитела к 2B4, антитела к LY108, антитела к LAIR1, антитела к ICOS, антитела к CD160, антитела к VISTA, афлиберцепта, бевацизумаба, ранибизумаба, сунитиниба, сорафениба, пазопаниба, несвакумаба, эрлотиниба, цетуксимаба, ритуксимаба, антитела к CA9, антитела к CA125, антитела к ассоциированному с меланомой антигену 3 (MAGE3), антитела к карциноэмбриональному антигену (CEA), антитела к виментину, антитела к опухолевому M2-ПК, антитела к специфическому для предстательной железы антигену (PSA), антитела к муцину-1, антитела к MART-1, антитела к CA19-9, бациллы Кальметта-Герена, биспецифического антитела к CD3xCD20, биспецифического антитела к PSMAxCD3, дакарбазина, темозоломида, циклофосфамида, доцетаксела, доксорубицина, даунорубицина, цисплатина, карбоплатина, гемцитабина, метотрексата, митоксантрона, оксалиплатина, паклитаксела, винкристина, циклофосфамида, средства лучевой терапии, сарилумаба, дупилумаба, ADC на основе антитела к CD19 и DM4 и ADC на основе антитела к DS6 и DM4.

33. Способ по любому из пп. 21—32, где средство противоопухолевой терапии выбрано из группы, состоящей из антитела к PD-1 и антитела к PD-L1.

34. Способ по п. 31, где ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 представляет собой антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

35. Способ по п. 34, где антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой REGN2810, ниволумаб или пембролизумаб.

36. Способ по п. 34, где антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой REGN2810.

37. Способ по п. 31, где ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 представляет собой антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

38. Способ по п. 37, где антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой атезолизумаб, авелумаб или дурвалумаб.

39. Способ по любому из пп. 21—38, где опухоль выбрана из группы, состоящей из гемобластоза, рака головного мозга, почечно-клеточного рака, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака молочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака кости, рака толстой кишки, немелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, колоректального рака, мезотелиомы, В-клеточной лимфомы и меланомы.

40. Способ прогнозирования положительного ответа в отношении средства противоопухолевой терапии у субъекта, у которого имеется солидная опухоль, где способ предусматривает

введение субъекту меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8 с определением наличия CD8-положительных клеток в солидной опухоли;

при этом наличие CD8-положительных клеток позволяет прогнозировать положительный ответ в отношении средства противоопухолевой терапии.

41. Способ отслеживания ответа опухоли на средство противоопухолевой терапии у субъекта, предусматривающий

(a) введение субъекту одной или более доз средства противоопухолевой терапии и

(b) введение субъекту по меньшей мере одной дозы меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8 через 1-20 недель после введения средства противоопухолевой терапии с определением наличия CD8-положительных клеток в солидной опухоли;

при этом наличие CD8-положительных клеток указывает на положительный ответ в отношении средства противоопухолевой терапии.

42. Способ прогнозирования или отслеживания эффективности средства противоопухолевой терапии у субъекта с опухолью, при этом способ предусматривает

(a) определение уровня CD8-положительных Т-клеток в опухоли и

(b) соотношение уровня CD8-положительных Т-клеток с успешностью средства противоопухолевой терапии;

при этом повышенный уровень, превышающий определенное пороговое значение, позволяет прогнозировать или указывает на успешность средства противоопухолевой терапии.

43. Способ отслеживания наличия Т-клеток в опухоли с течением времени, предусматривающий

(a) введение субъекту, у которого имеется опухоль, меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8 в первый момент времени и определение наличия CD8-положительных Т-клеток в опухоли;

(b) введение субъекту одной или более доз средства противоопухолевой терапии и

(c) введение субъекту меченного радиоактивной меткой конъюгата на основе антитела к CD8 во второй момент времени через 1-20 недель после введения средства противоопухолевой терапии и определение наличия CD8-положительных Т-клеток в опухоли;

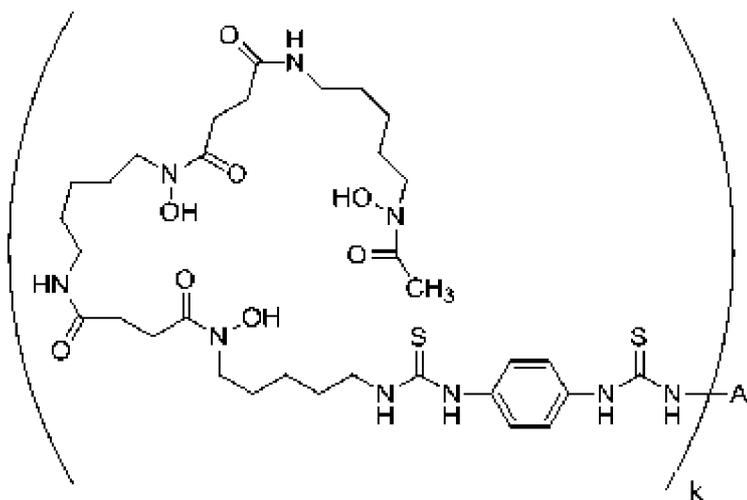
при этом наличие Т-клеток в опухоли указывает на положительный ответ в отношении средства противоопухолевой терапии.

44. Способ по п. 43, где стадию (c) повторяют в течение курса лечения с помощью средства противоопухолевой терапии.

45. Способ по п. 43, где первый момент времени наступает до (b).

46. Способ по п. 43, где содержание CD8-положительных Т-клеток в соответствии с (a) сравнивают относительно содержания CD8-положительных Т-клеток в соответствии с (c), и увеличение содержания CD8-положительных Т-клеток с течением времени указывает на положительный ответ в отношении средства противоопухолевой терапии.

47. Соединение формулы (III):

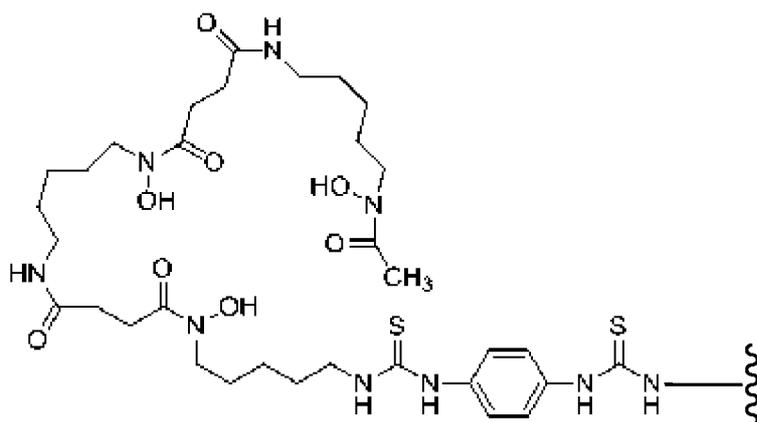


где A представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают CD8, и k представляет собой целое число от 1 до 30.

48. Соединение по п. 47, где k равняется 1 или 2.

49. Конъюгат на основе антитела, содержащий (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают CD8, и (ii) один или более хелатообразующих фрагментов.

50. Конъюгат на основе антитела по п. 49, где хелатообразующий фрагмент представляет собой:



где  представляет собой ковалентную связь с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

51. Конъюгат на основе антитела по п. 49, где указанный конъюгат характеризуется соотношением лекарственного средства к антителу (DAR), составляющим от 1,0 до 2,0.

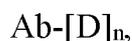
52. Конъюгат на основе антитела по п. 49, где соотношение хелатообразующего фрагмента к антителу составляет приблизительно 1,7.

53. Конъюгат на основе антитела, содержащий (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают CD8, и (ii) флуоресцентный краситель.

54. Конъюгат на основе антитела по п. 53, где флуоресцентный краситель представляет собой краситель, поглощающий свет в ближней инфракрасной области спектра.

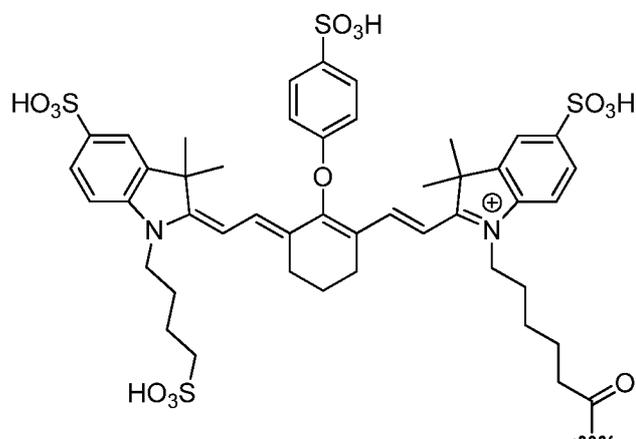
55. Конъюгат на основе антитела по п. 54, где краситель представляет собой IRDye800CW или VivoTag680XL.

56. Конъюгат на основе антитела по п. 53, где конъюгат на основе антитела имеет следующую структуру:



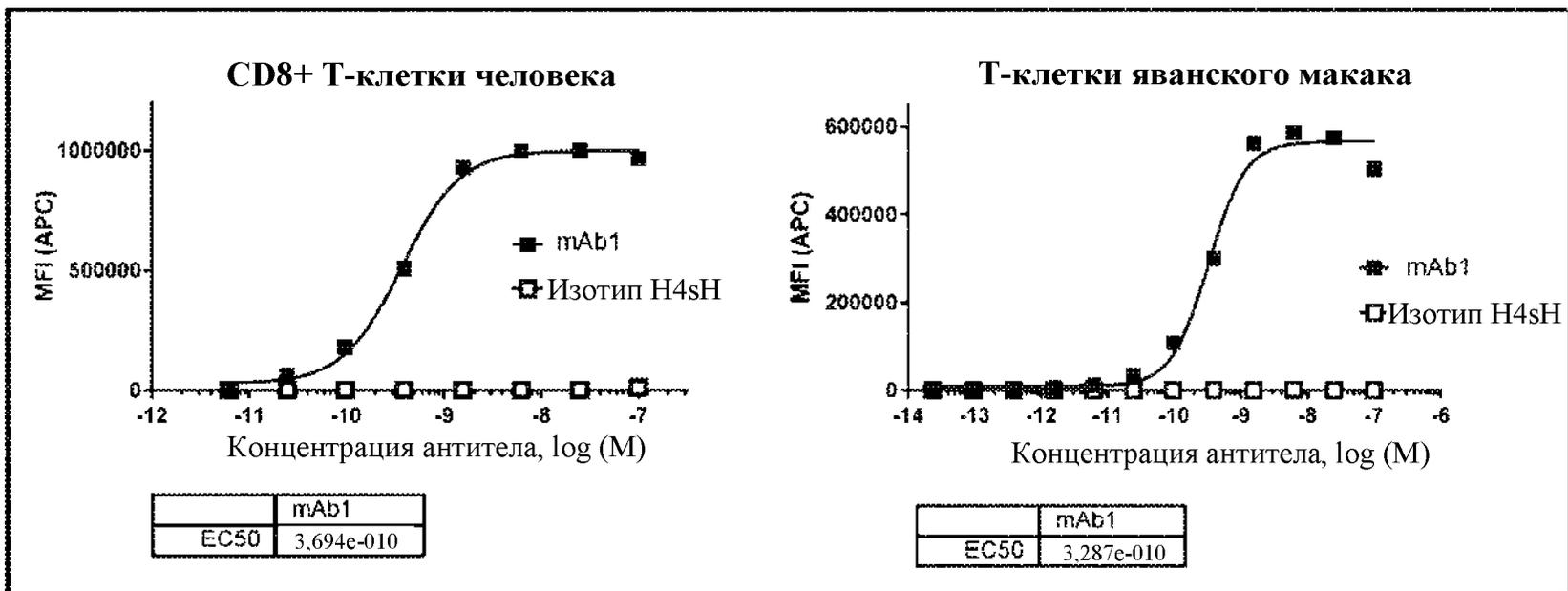
где Ab представляет собой антитело к CD8 или его антигенсвязывающий фрагмент, D представляет собой флуоресцентный краситель, и n представляет собой целое число от 1 до 4.

57. Конъюгат на основе антитела по п. 56, где D представляет собой:

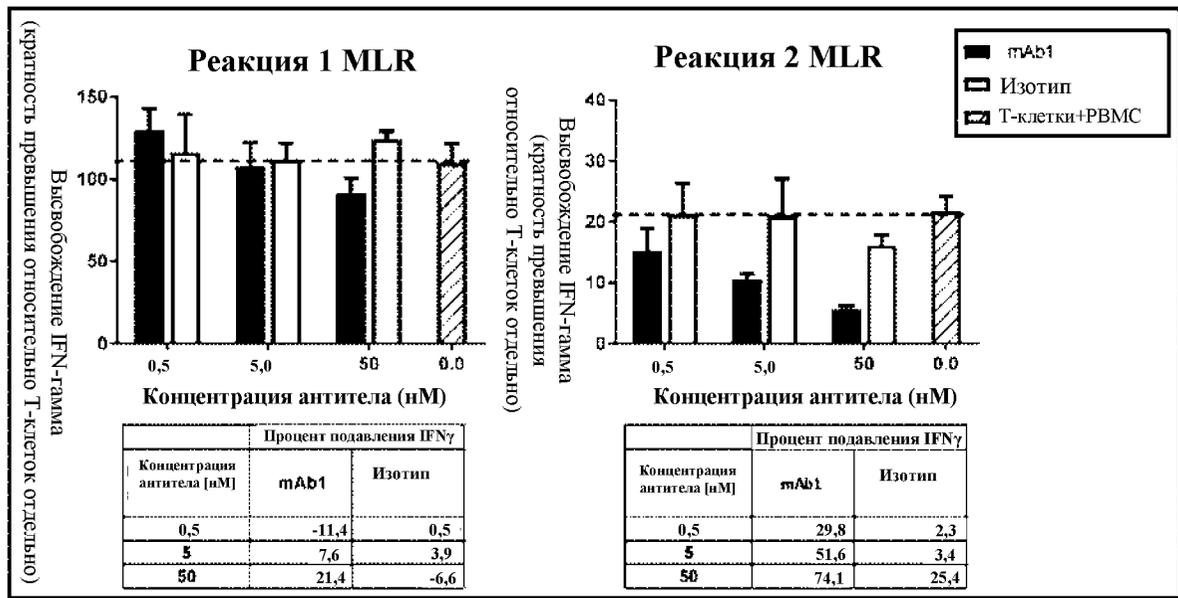


или его фармацевтически приемлемую соль.

58. Способ визуализации ткани, которая экспрессирует CD8, при этом способ предусматривает (a) приведение конъюгата на основе антитела, содержащего (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD8, и (ii) флуоресцентный краситель, в контакт с тканью и (b) визуальное наблюдение экспрессии CD8 посредством визуализации ткани с применением флуоресцентной визуализации.

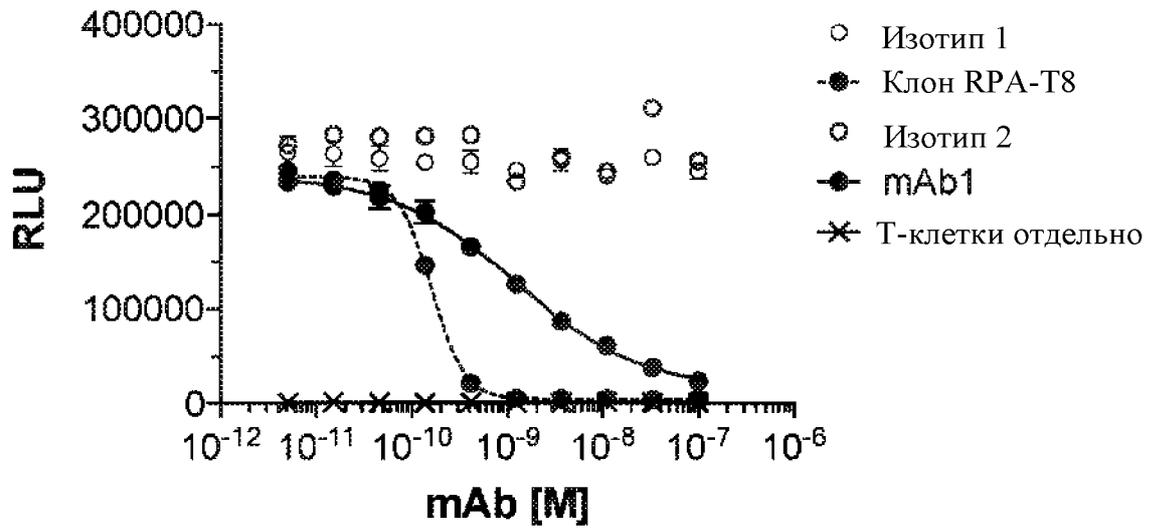


Фигура 1



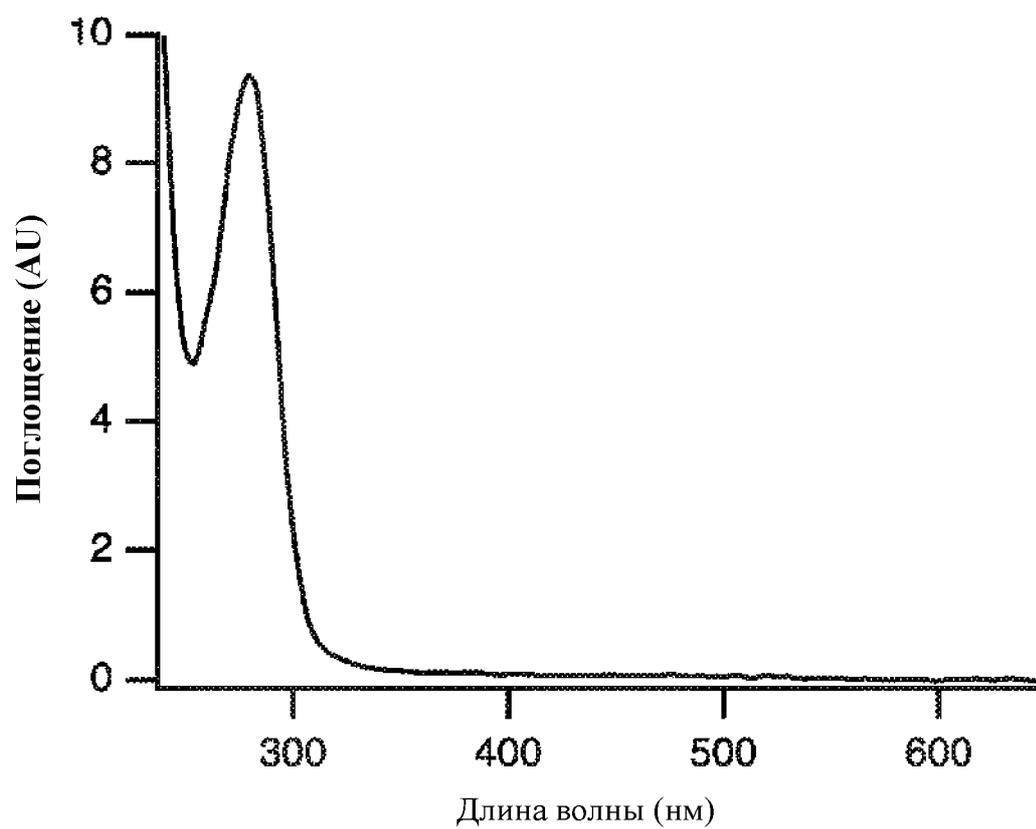
Фигура 2

Анализ Т-клеток/репортера APC

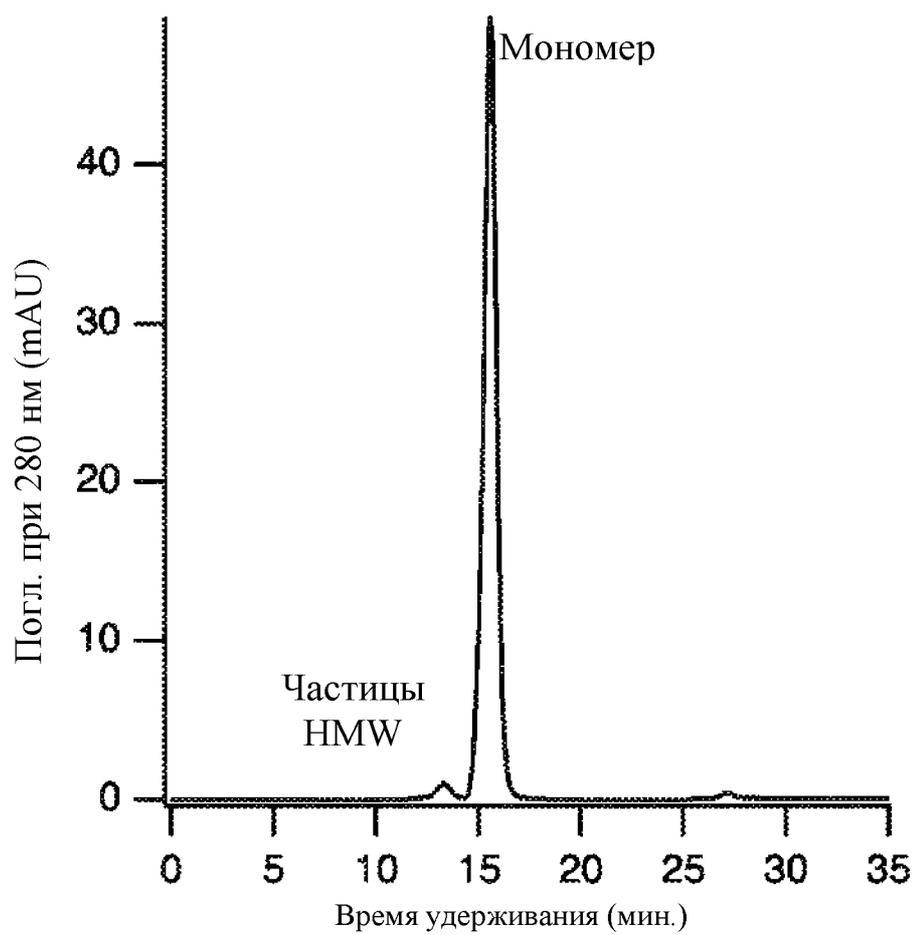


	EC50
Клон RPA-T8	1,601e-010
mAb1	1,234e-009

Фигура 3

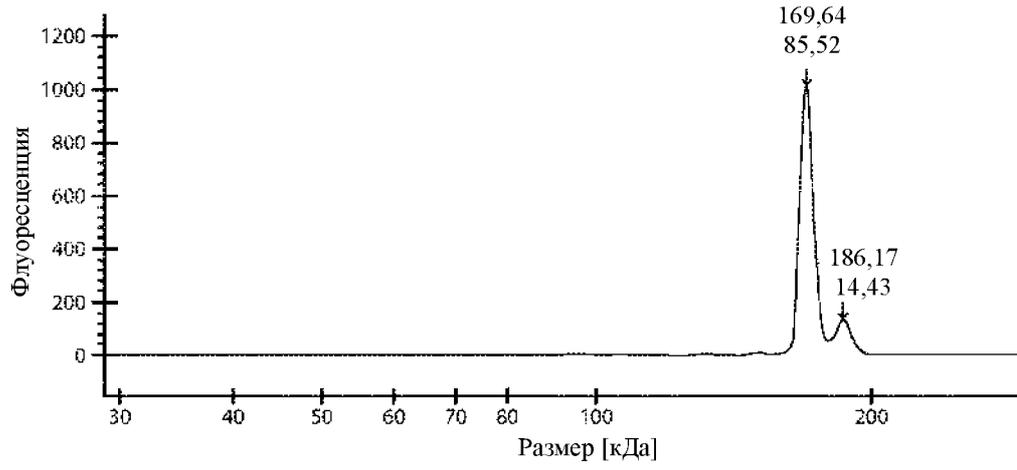


Фигура 4

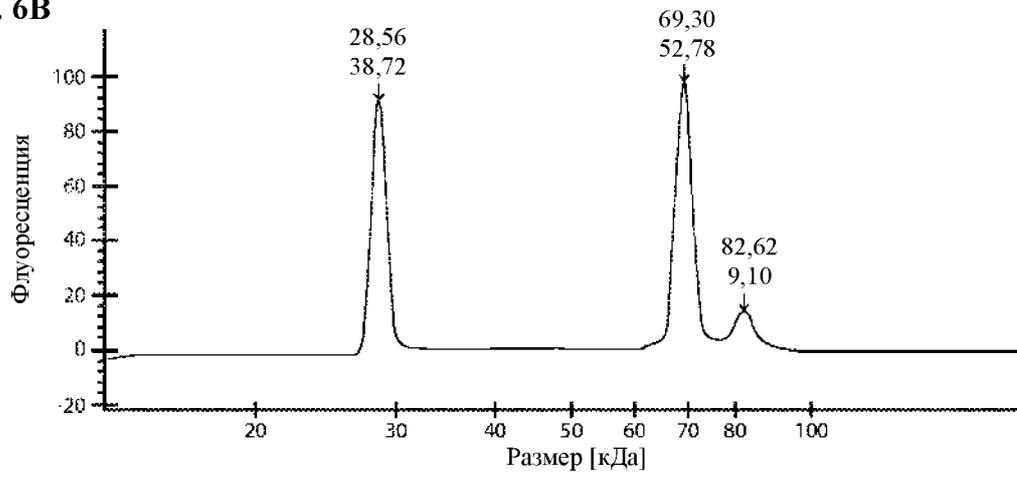


Фигура 5

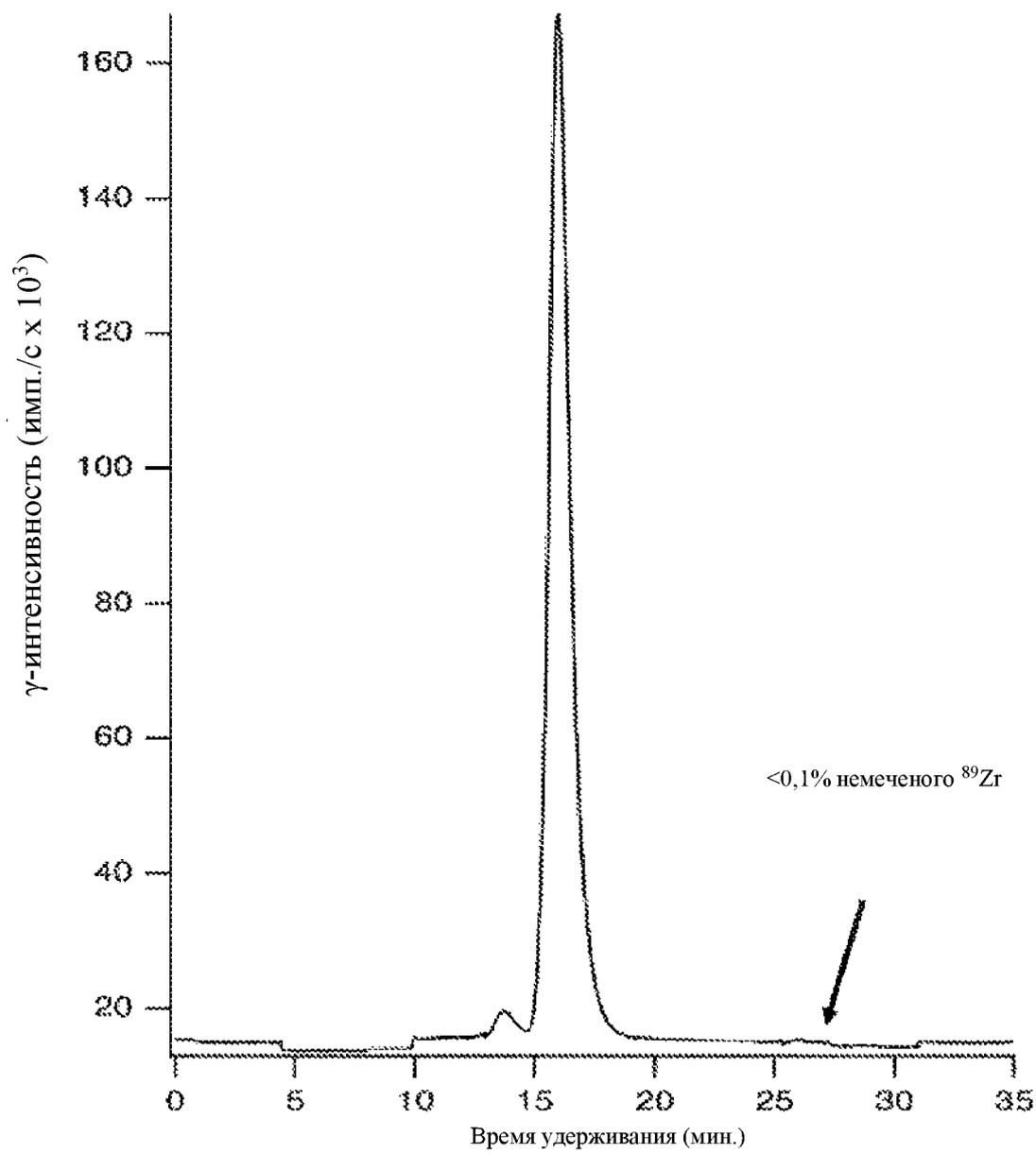
Фиг. 6А



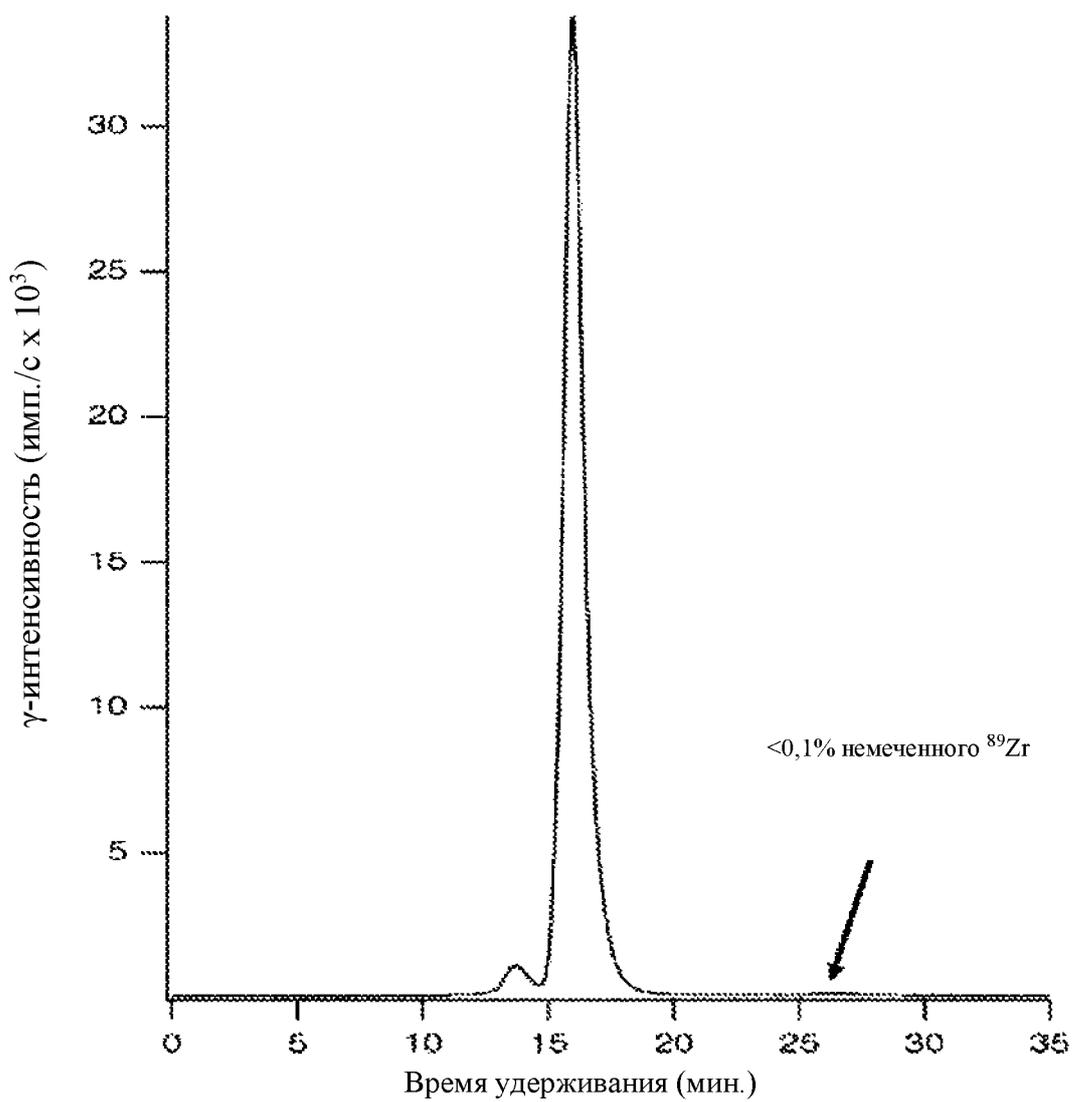
Фиг. 6В



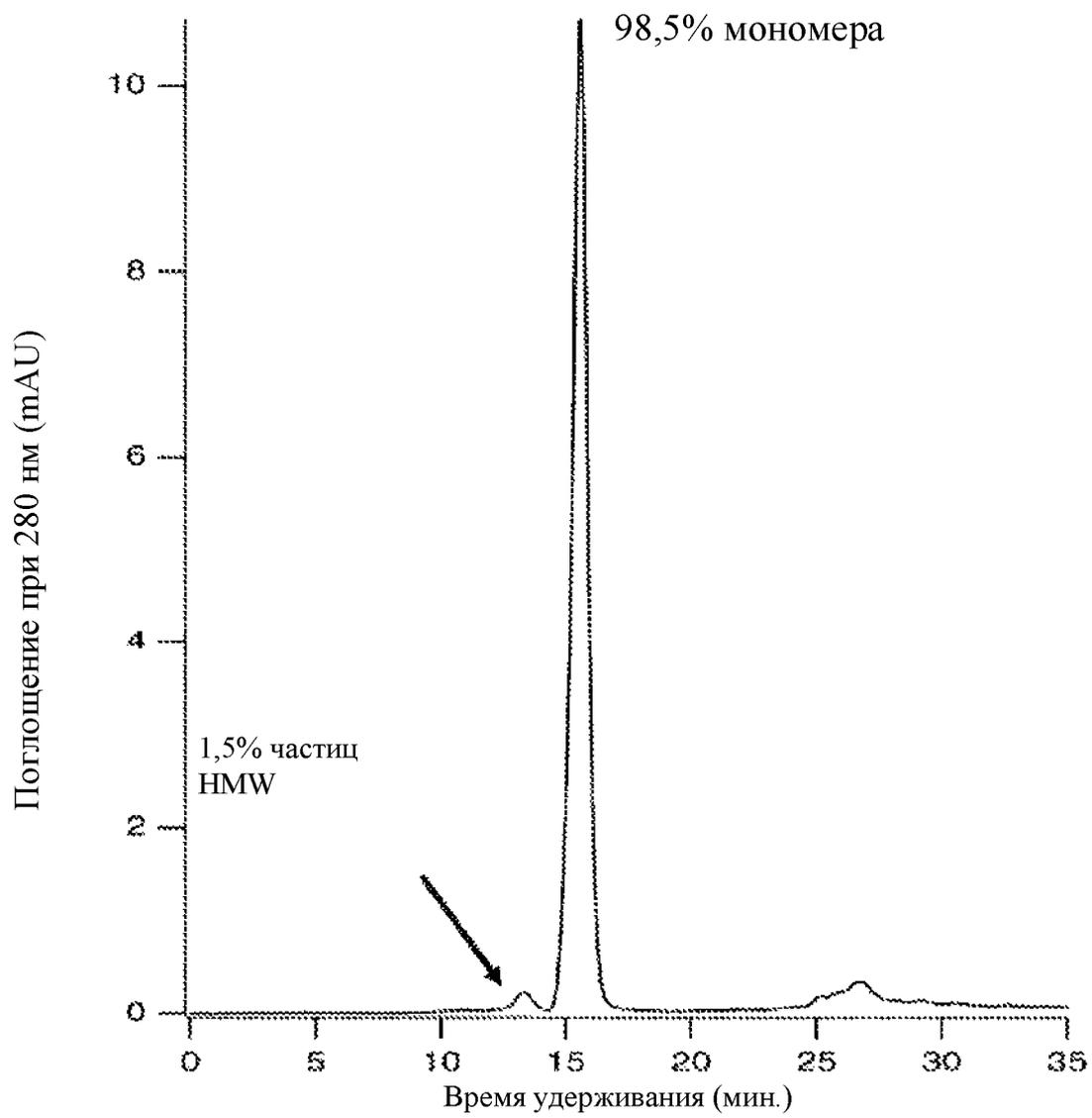
Фигура 6



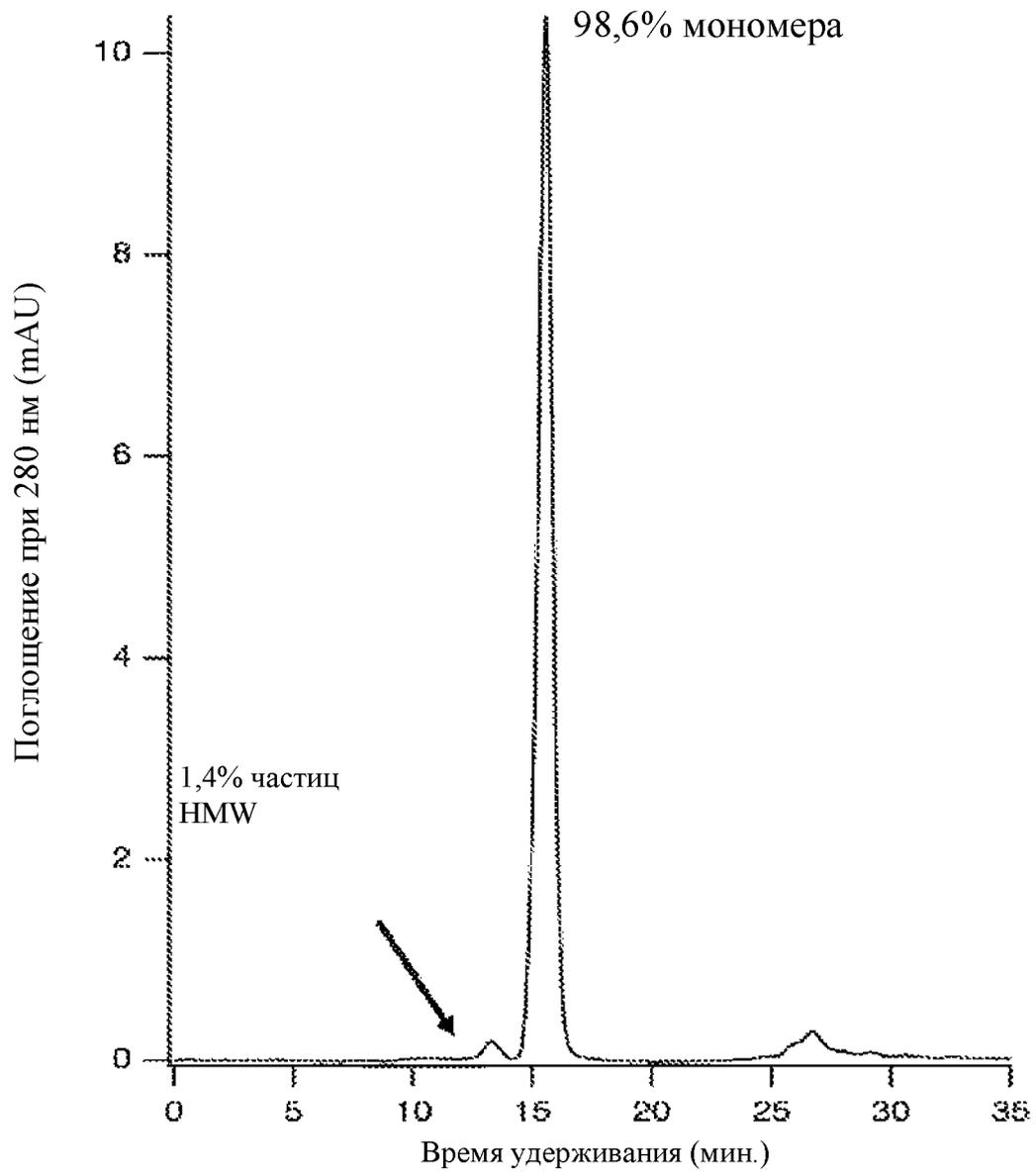
Фигура 7



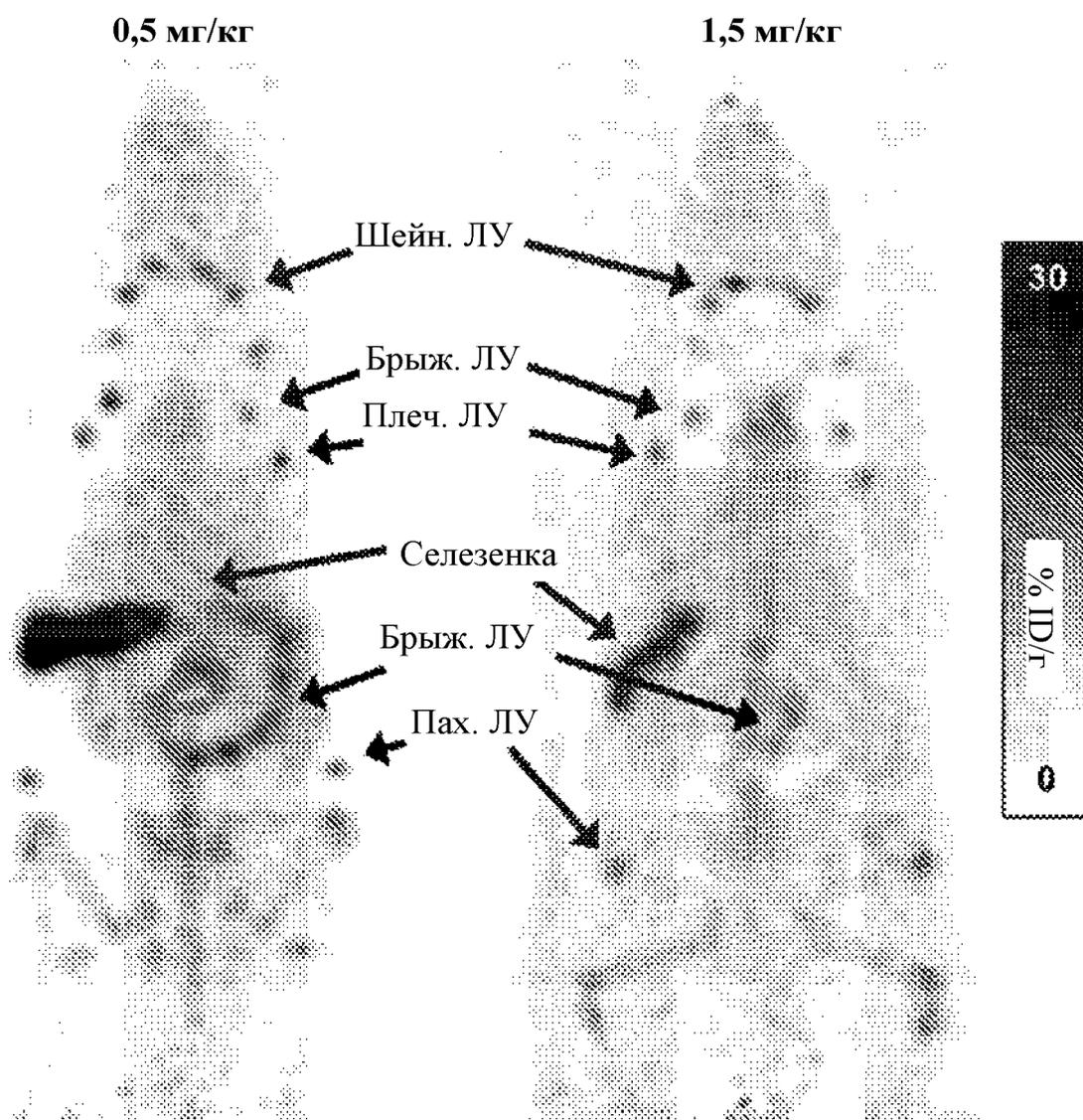
Фигура 8



Фигура 9



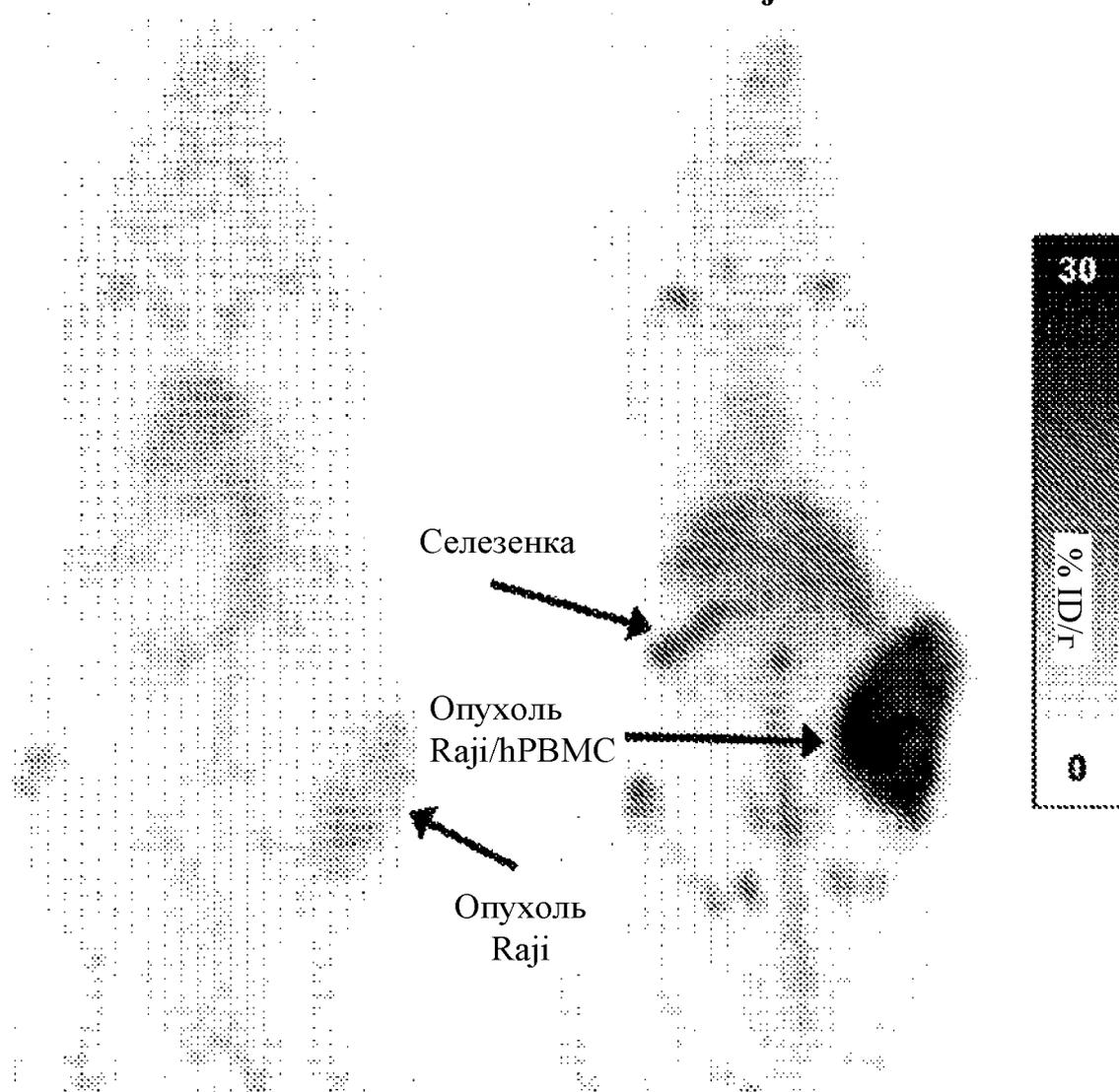
Фигура 10



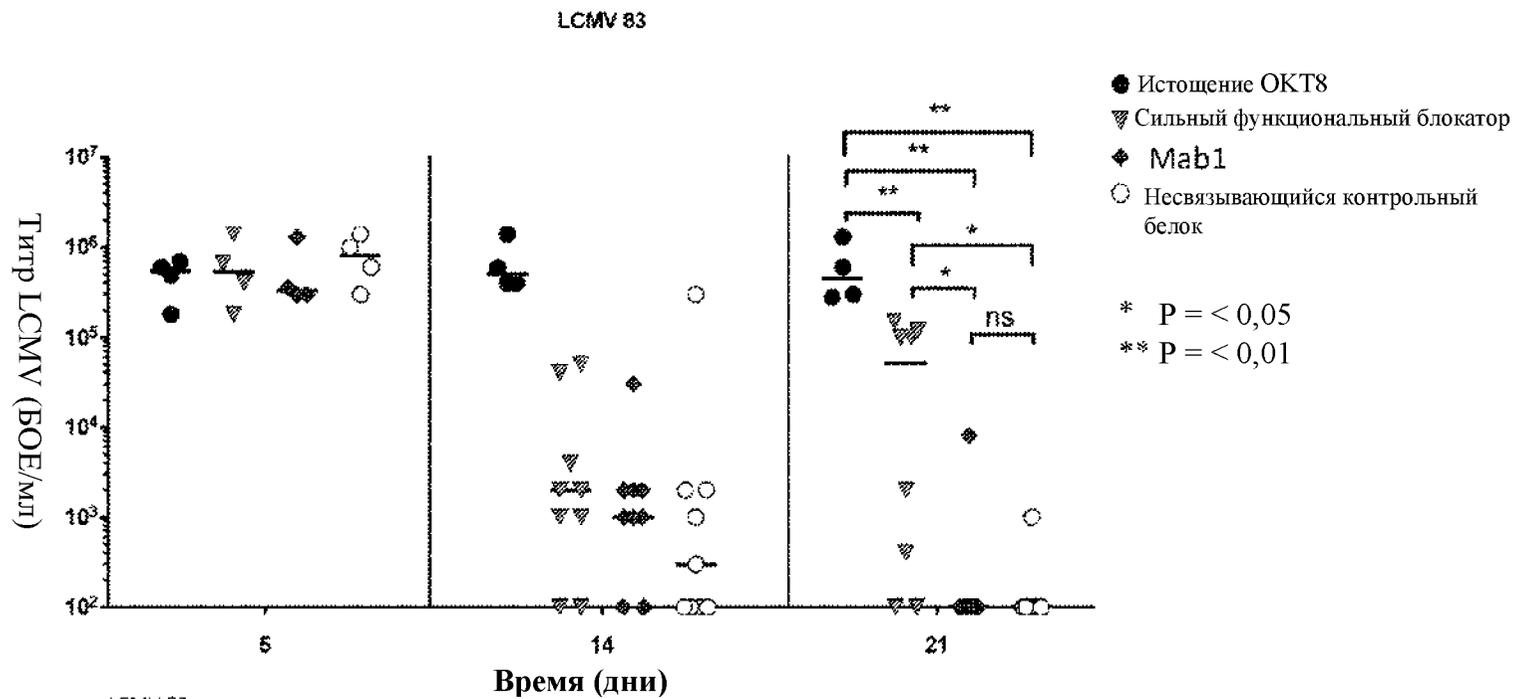
Фигура 11

**Мышь с
опухолью Raji**

**Мышь с опухолью
Raji/hPВМС**



Фигура 12



LCMV 83

Обработка	Клиренс LCMV в D21		
	Всего мышей	Колич. мышей <= LOD (100 БОЕ/мл)	Процент мышей <= LOD
ОКТ8 (истощение CD8)	4	0	0%
Сильный блокатор CD8, 0,5 мг/кг	8	2	25%
Mab1 0,5 мг/кг	8	7	88%
Несвязывающийся белк. контроль, 0,5 мг/кг	8	7	88%

Фигура 13