

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037397**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.03.24**

**(21)** Номер заявки  
**201890447**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.08.10**

**(51)** Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)

---

**(54) ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА К РЕЦЕПТОРУ CCR7**

---

**(31)** 15180415.0

**(32)** 2015.08.10

**(33)** EP

**(43)** 2018.11.30

**(86)** PCT/EP2016/069055

**(87)** WO 2017/025569 2017.02.16

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ПЕПМАБ Б.В. (NL)**

**(72)** Изобретатель:  
**Бак Яп Виллем, Босхейзен Роналд,  
Пейк Ваутер Корнелис, Тюркстра  
Йохан (NL), Швамборн Клаус  
Хайнрих (FR)**

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

**(56)** WO-A2-2014151834  
WO-A1-2013184200  
WO-A2-2009139853

---

**(57)** Изобретение относится к гуманизированным анти-CCR7-антителам и композициям, содержащим такие антитела. Антитела и композиции пригодны для лечения злокачественного новообразования, опухолевые клетки которого экспрессируют рецептор CCR7, в лечении воспалительных состояний, состояний или осложнений, возникающих в результате трансплантации тканей или органов, и состояний или осложнений, возникающих в результате или связанных с фиброзом. Получены детальные экспериментальные данные для нескольких антител, полученных из мышинных антител. Мышиное антитело с внутренним названием mAb729 [имеющее в качестве CDR VH1:GLTFRDFA; VH2:ISSGGFYT; VH3:VRRAYRYDGTGDYSALDY; VL1rQDIGPS; VL2:ATS; VL3:LQYASSPLT] дополнительно гуманизировано (внутреннее название mAb 650\_H 1L1). Указанное антитело ингибирует интернализацию рецептора CDR, как показано экспериментальными данными.

---

**B1**

**037397**

**037397**

**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится, в общем, к областям медицины и фармации, в частности, к области биофармацевтических препаратов для применения в онкологии. Более конкретно, изобретение относится к антителам к рецептору CCR7, которые являются пригодными в лечении злокачественных новообразований, опухолевые клетки которых экспрессируют рецептор CCR7.

### Уровень техники

СС-мотив рецептора человека 7 (далее по тексту относится к "CCR7") представляет собой рецептор из семи трансмембранных доменов, сопряженный с G-белком (GPCR), который, как было первоначально установлено, экспрессируется избирательно лимфоцитами при EBV-инфекции (Birkenbach et al., 1993, *J.Virol.*, 67: 2209-2220). Позднее было установлено, что CCR7 является селективным хемокиновым рецептором для CCL19 и CCL21. В физиологических условиях экспрессия CCR7 ограничивается наивными Т- и В-лимфоцитами и зрелыми дендритными клетками и играет роль в регулировании их миграции, организации и активации.

Активность CCR7 вовлечена в развитие различных болезненных состояний, включая хронические воспалительные заболевания (Moschovakis et al., 2012, *Eur. J. Immunol.*, 42: 1949-55), атеросклероз (Luchtefeld et al., 2010, *Circulation*, 122: 1621-28), ВИЧ-инфекцию (Evans et al., 2012, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 23: 151-57) и рак (Ben-Baruch, 2009, *Cell Adhesion Migration*, 3: 328-33).

Результаты различных исследований показали, что CCR7 экспрессируется в широком ряду опухолевых клеток, включая, например, лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), фолликулярную лимфому, крупноклеточную В-клеточную лимфому, СПИД-ассоциированную лимфому, лимфоплазмочитарную лимфому, лимфому Беркитта, В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, болезнь Ходжкина, Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых, фунгоидный микоз, бластный криз при хронических миелолифферативных синдромах, бластный криз при миелодиспластических синдромах, рак, такой как рак молочной железы, немелкоклеточный рак легкого, меланома, рак желудка или плоскоклеточная карцинома головы и шеи, и карцинома толстой кишки (международная заявка WO 2007/003426). Позднее стало ясным, что CCR7 играет роль в метастазировании различных злокачественных опухолей в лимфатические узлы (Viola and Luster, 2008, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 48: 171-97).

Эталонное мышинное моноклональное антитело к CCR7 человека (MAB197, клон # 150503) является коммерчески доступным от R&D Systems ([www.RnDSystems.com](http://www.RnDSystems.com)).

В международной заявке WO 2007/003426 раскрывается применение антитела, которое связывается с CCR7, для лечения злокачественного новообразования, опухолевые клетки которого экспрессируют CCR7. Раскрывается связывание антитела с опухолевыми клетками, экспрессирующими CCR7, для ингибирования миграции опухолевых клеток и/или индукцией гибели опухолевых клеток посредством одного или более из комплементзависимой цитотоксичности (CDC), антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) и индукции апоптоза.

В международной заявке WO 2012/043533 описаны 8 различных мышинных моноклональных антител к CCR7 человека, которые применимы для лечения фиброза или рака. Однако ни одно из этих антител не имеет значение IC<sub>50</sub> ниже 7,4 нМ для ингибирования трансдукции Ca<sup>2+</sup> внутриклеточного сигнала.

В международной заявке WO 2014/151834 описаны три различных антитела к CCR7 человека, полученных в *Xenopus*<sup>TM</sup>, иммунизированных клетками человека, экспрессирующими CCR7, а также мышинное антитело к CCR7 человека, и их химеризация и гуманизация. Человеческие анти-CCR7-антитела связываются с другим эпитопом на CCR7 человека, чем эталонное мышинное моноклональное антитело MAB197. Раскрываются антитела, пригодные для лечения воспалительных состояний, онкологических заболеваний, а также состояний и осложнений, возникающих в результате трансплантации тканей или органов. В международной заявке WO 2014/151834 дополнительно раскрывается выделение мышинных антител против человеческого CCR7, среди которых находится блокирующее антитело MAb 22, которое было химеризировано заменой его константных областей тяжелой цепи их человеческими аналогами. Это химеризованное антитело сохраняло способность связываться с CCR7 человека. Легкую цепь этого химеризованного антитела дополнительно модифицировали с получением ряда вариантов MAb 22 с химеризованными тяжелыми цепями и гуманизированными легкими цепями. В международной заявке WO 2014/151834 не раскрывается, какие из этих вариантов MAb 22 с гуманизированными легкими цепями, если таковые вообще имеются, сохраняли способность связываться с CCR7 человека.

Однако в данной области все еще существует необходимость в дополнительных и улучшенных антителах к CCR7, которые пригодны в терапии человека.

### Сущность изобретения

В первом аспекте изобретение относится к гуманизированному анти-CCR7-антителу, содержащему гипервариабельные участки HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, где HVR-H1 содержит последовательность: G-F/L-T/A/P-F-S/T/R-N/D/S-Y/F-A; HVR-H2 H1 содержит последовательность: I-S-S/D-G-R-G-S/T/F-Y/H/F-T/P; HVR-H3 H1 содержит последовательность: A/T/V/G-R-R/A-A/E/T-Y/G/T-R/V-Y/V-D/\*-GTG/\*-E/V/D/A/G/\*-N/S/D/T-A/S/D-M/L/F-Y/S; HVR-L1 H1 содержит последовательность: Q/S-D/S-I/L/V-G/S/L-D/S/P/G/N-S/N-VY/DGKTY; HVR-L2 H1 содержит последовательность: A/S/T-T/I/V-S; и HVR-L3 H1 содержит последовательность: L/W/Q-Q-Y/F/G/W-A/T/S-S/N/H-

S/F/N-P-L/P/Q-T, где "\*" указывает на то, что в данном положении не может присутствовать никакая аминокислота. Антитело по изобретению предпочтительно обладает по меньшей мере одним: а) минимальной аффинностью для синтетического антигена SYM1899 с последовательностью SEQ ID NO: 76, определяемой  $K_d$ , которая не более чем в 10 раз выше, чем  $K_d$  мышинового анти-CCR7-антитела, аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи которого представляет SEQ ID NO: 1, и аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи которого представляет SEQ ID NO: 2; и б)  $IC_{50}$  не выше 100 нМ для ингибирования по меньшей мере одного из CCR7-зависимой внутриклеточной передачи сигнала и интернализации рецептора CCR7, индуцированной по меньшей мере одним CCR7-лигандом, выбранным из CCL19 и CCL21.

В предпочтительном варианте осуществления антитело по изобретению представляет гуманизованное анти-CCR7-антитело, где HVR-H1 содержит одну из последовательностей SEQ ID NO: 3-10; HVR-H2 содержит одну из последовательностей SEQ ID NO: 11-16; HVR-H3 содержит одну из последовательностей SEQ ID NO: 17-23; HVR-L1 содержит одну из последовательностей SEQ ID NO: 24-30; HVR-L2 содержит одну из последовательностей SEQ ID NO: 31-33; и HVR-L3 содержит одну из последовательностей SEQ ID NO: 34-39. Более предпочтительно гуманизованное анти-CCR7-антитело по изобретению включает HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, где каждый в следующем порядке содержит: (i) SEQ ID NO: 3, 11, 17, 24, 32 и 34; (ii) SEQ ID NO: 4, 12, 18, 25 31 и 35; (iii) SEQ ID NO: 5, 12, 18, 26, 31 и 35; (iv) SEQ ID NO: 6, 13, 19, 27, 31 и 36; (v) SEQ ID NO: 7, 14, 20, 24, 31 и 35; (vi) SEQ ID NO: 8, 15, 21, 28, 31 и 37; (vii) SEQ ID NO: 9, 16, 22, 29, 33 и 38; или (viii) SEQ ID NO: 10, 14, 23, 30, 31 и 39.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления антитело по изобретению представляет гуманизованное анти-CCR7-антитело, где варибельная область тяжелой цепи антитела содержит 4 каркасные области тяжелой цепи HFR1 - HFR4 и 3 гиперварибельных участка HVR-H1 - HVR-H3, которые операбельно связаны в следующем порядке HFR1, HVR-H1, HFR2, HVR-H2, HFR3, HVR-H3 и HFR4, где варибельная область легкой цепи антитела содержит 4 каркасные области легкой цепи LFR1 - LFR4 и 3 гиперварибельных участка HVR-L1 - HVR-L3, которые операбельно связаны в следующем порядке LFR1, HVR-L1, LFR2, HVR-L2, LFR3, HVR-L3 и LFR4, где каркасные области тяжелой цепи HFR1 - HFR4 имеют аминокислотные последовательности: i) SEQ ID NO: 40, 43, 45 и 48 соответственно (= FR из VH1); ii) SEQ ID NO: 41, 44, 46 и 49 соответственно (= FR из VH2); или, iii) SEQ ID NO: 42, 44, 47 и 49 соответственно (=FR из VH3), и где каркасные области легкой цепи LFR1 - LFR4 имеют аминокислотные последовательности: iv) SEQ ID NO: 50, 52, 55 и 58 соответственно (= FR из VL1); или v) SEQ ID NO: 51, 53, 56 и 59 соответственно (=FR из VL2).

В еще одном дополнительном предпочтительном варианте осуществления антитело по изобретению представляет гуманизованное анти-CCR7-антитело, где варибельная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере с 95% идентичностью последовательности по меньшей мере с одной из последовательностей SEQ ID NO: 61, 62 и 63 (VH1, 2 или 3), и где варибельная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере с 95% идентичностью последовательности по меньшей мере с одной из последовательностей SEQ ID NO: 64 и 65 (VK1 или 2), где предпочтительно варибельная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, и предпочтительно варибельная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64.

Гуманизованное анти-CCR7-антитело по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения предпочтительно содержит константную область тяжелой цепи, которая представляет область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Гуманизованное анти-CCR7-антитело по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения предпочтительно содержит функциональную Fc-область, обладающую по меньшей мере одной эффекторной функцией, выбранной из группы, состоящей из связывания C1q, комплементзависимой цитотоксичности; связывания с Fc-рецептором, антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности и фагоцитоза.

Во втором аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей гуманизованное анти-CCR7-антитело по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения.

В третьем аспекте изобретение относится к: а) гуманизованному анти-CCR7-антителу по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения; или б) фармацевтической композиции, содержащей такое антитело, для применения в качестве лекарственного средства.

В четвертом аспекте изобретение относится к: а) гуманизованному анти-CCR7-антителу по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения; или б) фармацевтической композиции, содержащей такое антитело, для применения в лечении рака, воспалительного заболевания, состояния или осложнения, возникших в результате трансплантации тканей или органов, или состояния или осложнения, возникших в результате или связанных с фиброзом. Предпочтительно, в лечении рак представляет злокачественное новообразование, опухолевые клетки которого экспрессируют рецептор CCR7, предпочтительно рак выбран из группы, состоящей из хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), лимфомы из клеток мантийной зоны (MCL), фолликулярной лимфомы, крупноклеточной В-клеточной лимфо-

мы, СПИД-ассоциированной лимфомы, лимфоплазмоцитарной лимфомы, лимфомы Беркитта, В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, болезни Ходжкина, Т-клеточного лейкоза/лимфомы взрослых, фунгоидного микоза, бластного криза при хронических миелопролиферативных синдромах, бластного криза при миелодиспластических синдромах, рака молочной железы, немелкоклеточного рака легкого, меланомы, рака желудка или плоскоклеточной карциномы головы и шеи, и карциномы толстой кишки. Предпочтительно, в лечении воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, астмы, аллергического воспаления дыхательных путей, гиперплазии гладкой мускулатуры дыхательных путей, фиброзных заболеваний легких, ревматоидного артрита, рассеянного склероза, псориаза, атеросклероза, ВИЧ-инфекции и СПИДа, или где трансплантация тканей или органов представляет одну или более из трансплантаций почек, сердца, кожи и легких. Предпочтительно, в лечении фиброз выбран из группы, состоящей из фиброза и цирроза печени, фиброза почек, фиброза легких, фиброза кожи, фиброза органов сердечнососудистой системы, фиброза органов желудочно-кишечного тракта.

В пятом аспекте изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую гуманизованное анти-CCR7-антитело, по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере одно из вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи антитела, и где предпочтительно кодирующая нуклеотидная последовательность операбельно связана с регуляторными последовательностями для экспрессии кодирующей нуклеотидной последовательности в клетке-хозяине.

В шестом аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты согласно пятому аспекту.

### **Описание изобретения Определения**

Термин "антитело" используется в самом широком смысле и конкретно охватывает, например, отдельные моноклональные анти-CCR7-антитела, включая антагонистические, нейтрализующие антитела, полноразмерные или интактные моноклональные антитела, композиции анти-CCR7-антител с полиэпитопной специфичностью, поликлональные антитела, мультивалентные антитела, одноцепочечные анти-CCR7-антитела и фрагменты анти-CCR7-антител (см. ниже), включая фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv, диатела, однодоменные антитела (sdAbs), при условии, что они проявляют требуемую биологическую и/или иммунологическую активность. Термин "иммуноглобулин" (Ig) используется здесь взаимозаменяемо с антителом. Антитело может быть человеческим и/или гуманизованным.

Термин "анти-CCR7-антитело" или "антитело, которое связывается с CCR7" относится к антителу, которое способно связываться с CCR7 с достаточной аффинностью таким образом, что антитело является пригодным в качестве диагностического и/или терапевтического агента при нацеливании на CCR7. Предпочтительно степень связывания анти-CCR7-антитела с неродственным белком, отличным от CCR7, составляет примерно менее 10% от связывания антитела с CCR7, как измерено, например, с помощью радиоиммуноанализа (RIA) или ELISA. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с CCR7, имеет константу диссоциации ( $K_d$ )  $\leq 1$  мМ,  $\leq 100$  нМ,  $\leq 10$  нМ,  $\leq 1$  нМ или  $\leq 0,1$  нМ. В некоторых вариантах осуществления анти-CCR7-антитело связывается с эпитопом CCR7, который консервативен среди CCR7 различных видов животных.

"Выделенное антитело" представляет антитело, которое было идентифицировано и выделено и/или отделено от компонентов его природной среды. Загрязняющими компонентами его природной среды являются вещества, которые будут мешать терапевтическим применениям антитела, и они могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления антитело очищают: (1) до более чем 95 мас.% антитела, как определено методом Лоури, и наиболее предпочтительно до более чем 99 мас.%; (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающейся чашей или (3) до гомогенности, определенной электрофорезом SDS-PAGE в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием окрашивания Кумасси бриллиантовым синим или, предпочтительно, серебром. Выделенное антитело включает антитело *in situ* внутри рекомбинантных клеток, поскольку в этом случае отсутствует по меньшей мере один компонент природной среды антитела. Однако, как правило, выделенное антитело получают по меньшей мере одной стадией очистки.

Основная 4-цепочечная структурная единица представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей (IgM антитело состоит из 5 основных гетеротетрамерных единиц наряду с дополнительным полипептидом, называемым J-цепью, и, следовательно, содержит 10 антигенсвязывающих сайтов, тогда как секретированные IgA антитела могут полимеризоваться с образованием поливалентных сборных структур, содержащих 2-5 основных 4-цепочечных структурных единиц наряду с J-цепью). В случае IgG 4-цепочечная структурная единица обычно имеет молекулярную массу 150000 Да. Каждая L-цепь связана с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две H-цепи связаны друг с другом одной или более дисульфид-

ными связями в зависимости от изоформа Н-цепи. Каждая Н- и L-цепь имеет также регулярно расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая Н-цепь имеет на N-конце переменную область ( $V_H$ ), за которой следуют три константных области ( $C_H$ ), для каждой из  $\alpha$  и  $\gamma$  цепей и четыре области  $C_H$  для  $\mu$  и  $\epsilon$  изоформ. Каждая L-цепь имеет на N-конце переменную область ( $V_L$ ), за которой следует константная область ( $C_L$ ) на другом конце.  $V_L$  выравнивается с  $V_H$ , и  $C_L$  выравнивается с первой константной областью тяжелой цепи ( $C_{H1}$ ). Полагают, что определенные аминокислотные остатки образуют область контакта между переменными областями легкой цепи и тяжелой цепи. В результате спаривания  $V_H$  и  $V_L$  образуется один антигенсвязывающий сайт. Информацию о структуре и свойствах антител различных классов см., например, в монографии Basic and Clinical Immunology. 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6.

L-цепь любого вида позвоночных можно отнести к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа и ламбда, основываясь на аминокислотных последовательностях их константных областей. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей ( $C_H$ ) иммуноглобулины можно отнести к различным классам или изоформам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющие тяжелые цепи, обозначенные  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  и  $\mu$  соответственно. Классы  $\gamma$  и  $\alpha$  дополнительно подразделяются на подклассы на основе относительно минорных различий в последовательности и функции  $C_H$ , например, в организме человека экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

"Переменная область" или "переменный домен" антитела относится к аминоконцевым областям тяжелой или легкой цепи антитела. Переменную область тяжелой цепи можно отнести к " $V_H$ ". Переменную область легкой цепи можно отнести к " $V_L$ ". Эти области обычно являются наиболее переменными участками антитела и содержат антигенсвязывающие сайты.

Термин "переменный" относится к тому факту, что некоторые сегменты переменных областей очень сильно различаются по последовательности среди антител. V-область опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела для его конкретного антигена. Однако переменность неравномерно распределяется на участке переменных областей длиной 110 аминокислот. Напротив, V-области состоят из сравнительно консервативных участков, называемых каркасными областями (FR) из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими участками с очень высокой переменностью, называемыми "гиперпеременными участками" (HVR), каждый из которых имеет длину 9-12 аминокислот. Каждая переменная область нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR, в основном принимающих конфигурацию  $\beta$ -складок, связанных тремя гиперпеременными участками, которые образуют петли, соединяющие, и в некоторых случаях являющиеся частью  $\beta$ -складчатой структуры. Гиперпеременные участки в каждой цепи удерживаются в непосредственной близости посредством FR, и вместе с гиперпеременными участками другой цепи участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Константные области не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

"Интактное" антитело представляет антитело, которое содержит антигенсвязывающий сайт, а также  $C_L$  и, по меньшей мере, константные области тяжелой цепи  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$ . Константные области могут представлять константные области с нативной последовательностью (например, константные области с человеческой нативной последовательностью) или варианты их аминокислотной последовательности. Предпочтительно, интактное антитело имеет одну или более эффекторных функций.

"Голое антитело" для целей настоящего изобретения представляет антитело, которое не конъюгировано с цитотоксическим фрагментом или радиоактивной меткой.

"Фрагменты антитела" содержат участок интактного антитела, предпочтительно, антигенсвязывающую или переменную область интактного антитела. Примеры фрагментов антитела включают фрагменты Fab, Fab',  $F(ab')_2$  и Fv; диатела; линейные антитела (см. патент США № 5641870, пример 2; Zapata et al., Protein Eng., 8(10): 1057-1062 (1995)); молекулы одноцепочечных антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В одном варианте осуществления фрагмент антитела содержит антигенсвязывающий сайт интактного антитела и, таким образом, сохраняет способность связывать антиген.

Расщепление антител папаином дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых "Fab"-фрагментами, и остаточный "Fc"-фрагмент, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Фрагмент Fab состоит из полной L-цепи, а также переменной области Н-цепи ( $V_H$ ) и первой константной области одной тяжелой цепи ( $C_{H1}$ ). Каждый фрагмент Fab является моновалентным в отношении связывания антигена, т. е. он имеет один антигенсвязывающий сайт. Обработка антитела пепсином дает один большой фрагмент  $F(ab')_2$ , который ориентировочно соответствует двум связанным дисульфидной связью фрагментам Fab, обладающий двухвалентной антигенсвязывающей активностью и все еще способный к перекрестному связыванию антигена. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-

фрагментов наличием нескольких дополнительных остатков на карбоксиконце домена C<sub>H1</sub>, включая один или более остатков цистеина из шарнирной области антитела. Fab'-SH представляет здесь обозначение Fab', в котором цистеиновый остаток(остатки) константной области несет свободную тиольную группу. Первоначально фрагменты F(ab')<sub>2</sub> антитела получали в виде пары фрагментов Fab', между которыми находились шарнирные цистеиновые остатки. Известны также другие примеры связывания фрагментов антитела химической связью.

Фрагмент Fc содержит карбоксиконцевые участки обеих H-цепей, связанные дисульфидной связью. Эффекторные функции антител определяются последовательностями в Fc-области, где эта область представляет собой также участок, распознаваемый Fc-рецепторами (FcR), имеющимися в клетках некоторых типов.

"Fv" представляет минимальный фрагмент антитела, который содержит полный антигенраспознающий и антигенсвязывающий участок. Данный фрагмент состоит из димера, состоящего из одной вариабельной области тяжелой цепи и одной вариабельной области легкой цепи, прочно связанных ковалентной связью. В одноцепочечном типе Fv (scFv) вариабельная область одной тяжелой и одной легкой цепи может быть ковалентно связана гибким пептидным линкером таким образом, что легкая и тяжелая цепи могут ассоциироваться в "димерную" структуру, аналогичную той, что имеет место в двухцепочечном типе Fv. В результате фолдинга этих двух областей образуется шесть гипервариабельных петель (по 3 петли из каждой H- и L-цепи), которые предоставляют аминокислотные остатки для связывания антигена и придают антителу антигенсвязывающую специфичность. Однако даже одна вариабельная область (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичных к антигену) способна распознавать и связываться с антигеном, однако с более низкой аффинностью, чем целый сайт связывания.

"Одноцепочечный Fv", также сокращенно обозначаемый как "sFv" или "scFv", представляет фрагменты антитела, которые содержат области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> антитела, связанные в одну полипептидную цепь. Предпочтительно, полипептид sFv дополнительно содержит полипептидный линкер между областями V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, который способствует образованию фрагментом sFv структуры, необходимой для связывания антигена. Обзор по sFv см. в монографии Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies* vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp.269-315 (1994); Borrebaeck 1995.

Как здесь используется, термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются по существу идентичными, за исключением вариантов, которые могут появиться в результате возможных природных мутаций, и которые могут присутствовать в минорных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, направленными против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. Помимо их специфичности моноклональные антитела преимущественны тем, что они могут быть синтезированы, незагрязненные другими антителами. Определение "моноклональное" не должно истолковываться как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, используемые в настоящем изобретении, могут быть получены с помощью гибридомной методологии, впервые описанной Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), или могут быть получены с использованием методов рекомбинантной ДНК в бактериальных клетках, клетках эукариотических организмов или растительных клетках (см., например, патент США № 4816567). "Моноклональные антитела" также могут быть выделены из фаговых библиотек антител, используя методы, описанные в публикации Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), например.

Моноклональные антитела здесь включают "химерные" антитела, в которых участок тяжелой и/или легкой цепи идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям в антителах, полученных из определенного вида или относящихся к определенному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи(цепей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из другого вида или относящихся к другому классу или подклассу антител, а также к фрагментам таких антител, если они проявляют требуемую биологическую активность (см. патент США № 4816567 и Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Химерные антитела, представляющие здесь интерес, включают "приматизированные" антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности вариабельной области, полученные от приматов, отличных от человека (например, мартышки, человекообразной обезьяны и т. д.), и последовательности константной области человека.

"Гуманизированные" формы антител, отличные от человеческих антител (например, грызуна), представляют химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из "нечеловеческого" антитела. По большей части, гуманизированные антитела представляют человеческие иммуноглобулины (реципиентное антитело), в которых остатки из гипервариабельного участка реципиента заменены на остатки из гипервариабельного участка вида, отличного от человека (донорное антитело), такого как мышь, крыса, кролик или примат, имеющие требуемую специфичность, аффинность и эффективность антитела. В некоторых случаях некоторые остатки каркасной области (FR) человеческого иммуноглобулина заменены на соответствующие "нечеловеческие" остатки. Кроме того, гуманизирован-

ные антитела могут содержать остатки, которые не найдены в реципиентном антителе или в донорном антителе. Такие модификации выполняют для дополнительного усовершенствования свойств антитела. Обычно "гуманизованное" антитело содержит, как правило, две переменные области, в которых все или практически все гипервариабельные петли соответствуют этим элементам иммуноглобулина, отличного от человеческого, и все или практически все FR представляют области из последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизованное антитело, необязательно, содержит, по меньшей мере, участок константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина. Более подробные сведения представлены в публикациях Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmair et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992). Также см. следующие обзорные статьи и ссылки, цитируемые там: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma and Immunol.*, 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions*, 23:1035-1038 (1995); Hurler and Gross, *Curr. Op. Biotech.*, 5:428-433 (1994).

Как здесь используется, термин "гипервариабельный участок", "HVR", относится к областям переменной области антитела, которые являются гипервариабельными по последовательности и/или образуют структурно определенные петли, которые ответственны за связывание антигена. Как правило, антитела содержат шесть гипервариабельных участков; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). Ряд определенных границ гипервариабельного участка используются и охватываются здесь. Обычно гипервариабельные участки содержат аминокислотные остатки из "области, определяющей комплементарность" или "CDR" (в частности, примерно остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в VL, и, примерно остатки 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в VH, согласно системе нумерации по Kabat; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)), и/или такие остатки из "гипервариабельной петли" (например, остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в VL и 26-32 (H1), 52-56 (H2) и 95-101 (H3) в VH, согласно системе нумерации по Chothia; Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)); и/или такие остатки из "гипервариабельной петли"/CDR (например, остатки 27-38 (L1), 56-65 (L2) и 105-120 (L3) в VL и 27-38 (H1), 56-65 (H2) и 105-120 (H3) в VH, согласно системе нумерации IMGT, Lefranc, M.P. et al., *Nucl. Acids Res.*, 27: 209-212 (1999), Ruiz, M. et al. *Nucl. Acids Res.*, 28: 219-221 (2000)). Необязательно антитело имеет симметричные инсерции в одном или нескольких из следующих положений 28, 36 (L1), 63, 74-75 (L2) и 123 (L3) в VL и 28, 36 (H1), 63, 74-75 (H2) и 123 (H3) в VH, согласно нумерации по Honneger, A. and Plunkthun, *AJ (Mol. Biol.)*, 309: 657-670 (2001)). Гипервариабельные области/CDR антител по изобретению предпочтительно определяются и нумеруются согласно системе нумерации IMGT.

Остатки "каркасной области" или "FR" представляют остатки переменной области, отличные от остатков гипервариабельных участков, описанных здесь.

"Блокирующее" антитело или "антагонистическое" антитело представляет антитело, которое ингибирует или снижает биологическую активность антигена, с которым оно связывается. Предпочтительные блокирующие антитела или антагонистические антитела по существу или полностью ингибируют биологическую активность антигена.

Как здесь используется, "агонистическое антитело" представляет антитело, которое имитирует по меньшей мере одну из функциональных активностей полипептида, представляющего интерес.

"Видозависимое антитело", например, антитело млекопитающего против IgE человека, представляет антитело, которое имеет более высокую аффинность связывания для антигена от первого вида млекопитающих, чем оно имеет для гомолога этого антигена от второго вида млекопитающих. Обычно видозависимое антитело "специфично связывается" с человеческим антигеном (т.е. имеет значение аффинности связывания ( $K_d$ ) не выше примерно  $1 \times 10^{-7}$  М, предпочтительно не выше примерно  $1 \times 10^{-8}$  М и наиболее предпочтительно не выше примерно  $1 \times 10^{-9}$  М), но имеет аффинность связывания для гомолога антигена от второго вида млекопитающего, отличного от человека, которая, по меньшей мере, примерно в 50 раз или, по меньшей мере, примерно в 500 раз или, по меньшей мере, примерно в 1000 раз, слабее, чем его аффинность связывания с человеческим антигеном. Видозависимое антитело может представлять любое из различных типов антител, как определено выше, но предпочтительно представляет гуманизованное или человеческое антитело.

"Аффинность связывания" обычно относится к силе совокупных нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, то "аффинность связывания" относится к характерной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X для ее партнера Y обычно можно представить константой диссоциации ( $K_d$ ). Аффинность можно измерять обычными методами, известными в данной области техники, включая методы, описанные здесь. Низкоаффинные антитела обычно медленно связываются с антигеном и имеют тенденцию легко диссоциировать, тогда как высокоаффинные антитела обычно быстрее связывают антиген и имеют тенденцию дольше оставаться в связанном состоянии. В данной области техники известны различные методы измерения аффинности связывания, любой из этих методов можно использовать для целей настоящего изобретения. Конкретные иллюстративные варианты осуще-

ствления описаны ниже.

" $K_d$ " или "значение  $K_d$ " по данному изобретению измеряют методами поверхностного плазмонного резонанса с использованием прибора BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C, используя чипы с иммобилизованным антигеном CM5 при ~10 единицах отклика (RU). Вкратце, биосенсорные чипы с карбоксиметилированным декстраном (CM5, BIAcore Inc.) активируются гидрхлоридом N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями изготовителя. Антиген разводят 10 мМ раствором ацетата натрия, pH 4,8, до концентрации 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед инъекцией со скоростью потока 5 мкл/мин до достижения, примерно 10 единиц отклика (RU) связанного белка. После инъекции антигена вводят 1 М раствор этаноламина для блокирования непрореагировавших групп. Для кинетических измерений двукратные серийные разведения антитела или Fab (от 0,78 нМ до 500 нМ) инжестируют в PBS с 0,05% твина 20 (PBST) при 25°C со скоростью потока, примерно, 25 мкл/мин. Величины скорости ассоциации ( $k_{on}$ ) и скорости диссоциации ( $k_{off}$ ) рассчитывают, применяя простую модель Ленгмюра для связывания один-плюс-один (BIAcore Evaluation Software версия 3.2), с помощью одновременного получения сенсограммы ассоциации и диссоциации. Константу равновесной диссоциации ( $K_d$ ) рассчитывают как отношение  $k_{off}/k_{on}$ . См., например, Chen, Y., et al. (1999) J. Mol. Biol., 293: 865-881. Если по данным вышеуказанного метода поверхностного плазмонного резонанса скорость ассоциации превышает  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ , то тогда ее можно определить методом тушения флуоресценции, в котором измеряется увеличение или уменьшение интенсивности флуоресцентной эмиссии (волна возбуждения=295 нм; волна эмиссии=340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25°C раствора антитела против антигена (Fab форма) с концентрацией 20 нМ в PBS, pH 7,2, в присутствии возрастающих концентраций антигена, измеряемых на спектрометре, таком как спектрофотометр остановленного потока (Aviv Instruments) или спектрофотометр SLM-Aminco (ThermoSpectronic) серии 8000 с кюветой с перемешиванием.

"Скорость ассоциации" ("on-rate") или " $k_{on}$ " по данному изобретению можно также определить тем же самым вышеописанным методом поверхностного плазмонного резонанса на приборе BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ), как описано выше.

Антитело, "которое связывает" представляющий интерес антиген, например, ассоциированный с опухолью полипептидный антиген-мишень CCR7, представляет антитело, которое связывает антиген с достаточной аффинностью таким образом, что антитело становится пригодным в качестве терапевтического агента в нацеливании на клетку или ткань, экспрессирующие антиген, и незначительно реагирует перекрестно с другими белками. В таких вариантах осуществления степень связывания антитела с белком, который не является мишенью, будет составлять менее примерно 10% от связывания антитела с его определенным белком-мишенью, как определено анализом сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) или радиоиммунопреципитацией (RIA). В отношении связывания антитела с молекулой-мишенью, то термин "специфическое связывание" или "специфически связывается с" или "специфический для" определенного полипептида или эпитопа на определенной полипептидной мишени, означает связывание, которое измеримо отличается от неспецифического взаимодействия. Специфическое связывание можно измерить количественно, например, определением связывания молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы, которая обычно представляет молекулу аналогичной структуры, но которая не обладает связывающей активностью. Например, специфическое связывание можно определить по конкуренции с контрольной молекулой, которая сходна с мишенью, например, по избытку меченой мишени. В этом случае специфическое связывание определяется тогда, когда связывание меченой мишени с зондом конкурентно подавляется избытком немеченой мишени. В данном описании термин "специфическое связывание" или "специфически связывается с" или "специфический для" определенного полипептида или эпитопа на определенном полипептиде-мишени можно представить, например, молекулой, имеющей  $K_d$  для мишени (которую можно определить, как описано выше), равной, по меньшей мере, примерно  $10^{-4}$  М, альтернативно, по меньшей мере, примерно  $10^{-5}$  М, альтернативно, по меньшей мере, примерно  $10^{-6}$  М, альтернативно, по меньшей мере, примерно  $10^{-7}$  М, альтернативно, по меньшей мере, примерно  $10^{-8}$  М, альтернативно, по меньшей мере, примерно  $10^{-9}$  М, альтернативно, по меньшей мере, примерно  $10^{-10}$  М, альтернативно, по меньшей мере, примерно  $10^{-11}$  М, альтернативно, по меньшей мере, примерно  $10^{-12}$  М или более. В одном варианте осуществления термин "специфическое связывание" относится к связыванию, когда молекула связывается с определенным полипептидом или эпитопом на определенном полипептиде без существенного связывания с любым другим полипептидом или эпитопом полипептида.

Термин "эпитоп" представляет собой участок молекулы, который связывается антигенсвязывающим белком, например, антителом. Термин включает любую детерминанту, способную специфически связываться с антигенсвязывающим белком, таким как антитело, или с рецептором Т-клеток. Эпитоп может быть непрерывным и прерывистым (например, в полипептиде аминокислотные остатки, которые не являются смежными друг с другом в полипептидной последовательности, но в контексте молекулы связаны антигенсвязывающим белком). В некоторых вариантах осуществления эпитопы могут имитироваться тем, что они содержат трехмерную структуру, которая сходна с эпитопом, использованным для

получения антигенсвязывающего белка, но не содержат ни одного или только некоторые из аминокислотных остатков, обнаруженных в этом эпитопе, использованном для получения антигенсвязывающего белка. Чаще всего эпитопы находятся на белках, но в некоторых случаях они могут находиться на других видах молекул, таких как нуклеиновые кислоты. Эпитопные детерминанты включают химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, сахарные боковые цепи, фосфорильные, сульфонильные или сульфатные группы, и обладают специфическими характеристиками трехмерной структуры и/или специфическими зарядными характеристиками. Как правило, антитела, специфичные для определенного антигена-мишени, будут предпочтительно распознавать эпитоп на антигене-мишени в сложной смеси белков и/или макромолекул.

"Эффекторные функции" антитела относятся к биологическим активностям, присущим Fc-области (Fc-области с нативной последовательностью или Fc-области с вариантной аминокислотной последовательностью) антитела, и варьируют в зависимости от изоформа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность; связывание с Fc-рецептором; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора); и активацию В-клеток.

Термин "Fc-область" используется здесь для определения С-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая Fc-области с нативной последовательностью и варианты Fc-области. Несмотря на то, что границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG обычно определяется как область, простирающаяся от аминокислотного остатка в положении Cys226 или Pro230 до ее карбоксильного конца. С-концевой лизин (остаток 447 согласно системе нумерации ЕС) Fc-области может быть удален, например, во время получения или очистки антитела или рекомбинантно конструированием нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Соответственно, композиция интактных антител может содержать популяции антител с удаленными остатками K447, популяции антител без удаленных остатков K447 и популяции антител, имеющих смесь антител с остатком K447 и без него.

"Функциональная Fc-область" обладает "эффекторной функцией" Fc-области с нативной последовательностью. Типичные "эффекторные функции" включают связывание C1q; CDC; связывание с Fc-рецептором; ADCC; фагоцитоз; понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора, BCR) и т. д. Для проявления таких эффекторных функций обычно требуется, чтобы Fc-область была объединена со связывающим доменом (например, вариabельным доменом антитела), и они могут быть оценены с использованием различных методов анализа, как описано, например, здесь в разделе "Определения".

"Fc-область с нативной последовательностью" содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-области, встречающейся в природе. Fc-области с нативными последовательностями человека включают Fc-области с нативной последовательностью человеческого IgG1 (не-A и A-аллотипы); Fc-области с нативной последовательностью человеческого IgG2; Fc-области с нативной последовательностью и человеческого IgG3; и Fc-области с нативной последовательностью человеческого IgG4, а также их встречающиеся в природе варианты.

"Вариантная Fc-область" содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от Fc-области с нативной последовательностью, в результате по меньшей мере одной аминокислотной модификации, предпочтительно одной или нескольких аминокислотных замен. Предпочтительно, вариантная Fc-область имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с Fc-областью с нативной последовательностью или Fc-областью исходного полипептида, например, примерно от одной до примерно десяти аминокислотных замен и предпочтительно примерно от одной до пяти аминокислотных замен в Fc-области с нативной последовательностью или Fc-области исходного полипептида. Вариантная Fc-область здесь предпочтительно должна обладать, по меньшей мере, примерно 80% гомологией с Fc-областью с нативной последовательностью и/или Fc-областью исходного полипептида, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, примерно 90% гомологией с ними, более предпочтительно, по меньшей мере, примерно 95% гомологией с ними.

Выражение "антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" или "ADCC" относится к форме цитотоксичности, при которой секретированный Ig, связанный с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на некоторых цитотоксических клетках (например, натуральных клетках-киллерах (NK), нейтрофилах и макрофагах), способствует связыванию этих цитотоксических эффекторных клеток с несущей антиген клеткой-мишенью, и затем вызывает гибель клетки-мишени под действием цитотоксинов. Антитела "вооружают" цитотоксические клетки и абсолютно необходимы для такого киллинга. Первичные клетки для опосредования ADCC, NK клетки, экспрессируют только FcγRIII, в то время как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Данные по экспрессии FcR на гемопоэтических клетках обобщены в таблице 3 на стр.464 обзора Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9: 457-92 (1991). Для оценки ADCC активностей молекулы, представляющей интерес, можно провести анализ ADCC *in vitro*, такой как тесты, описанные в патентах США № 5500362 или 5821337. Подходящие для таких анализов эффекторные клетки включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и натуральные

клетки-киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно ADCC активность молекулы, представляющей интерес, можно определить *in vivo*, например, на животной модели, такой как животная модель, раскрытая в публикации Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 652-656 (1998).

Термин "Fc-рецептор" или "FcR" описывает рецептор, который связывается с Fc-областью антитела. Предпочтительный FcR представляет FcR с нативной последовательностью человека. Более того, предпочтительный FcR представляет FcR, который связывается с IgG антителом (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, в том числе аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. FcγRII рецепторы включают FcγRIIA ("активирующий рецептор") и FcγRIIB ("ингибирующий рецептор"), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, в основном различающиеся по их цитоплазматическим доменам. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит иммунорецепторный тирозинсодержащий активационный мотив (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит иммунорецепторный тирозинсодержащий ингибиторный мотив (ITIM) в своем цитоплазматическом домене (см. обзор M. Daeron, Annu. Rev. Immunol., 15: 203-234 (1997)). Обзор по FcR см. в публикации Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9: 457-492 (1991); Capel et al., Immunomethods, 4: 25-34 (1994); и de Haas et al., J. Lab. Clin. Med., 126: 330-41 (1995). Другие FcR, включая FcR, которые будут идентифицированы в будущем, охватываются здесь термином "FcR". Данный термин также включает неонатальный рецептор, FcRn, ответственный за перенос материнских IgG через плаценту в плод (Guyer et al., J. Immunol., 117: 587 (1976) и Kim et al., J. Immunol., 24: 249 (1994)).

Связывание с человеческим FcRn *in vivo* и период полураспада в сыворотке крови полипептидов, связывающих с высокой аффинностью FcRn человека, можно анализировать, например, на трансгенных мышцах или трансфицированных клеточных линиях человека, экспрессирующих человеческий FcRn, или на приматах, которым вводят полипептиды с вариантной Fc-областью. В международной заявке WO 2000/42072 (Presta) описаны варианты антител с улучшенным или пониженным связыванием с FcR. См. также, например, Shields et al. J. Biol. Chem., 9 (2) : 6591-6604 (2001).

"Человеческие эффекторные клетки" представляют лейкоциты, которые экспрессируют один или более FcR и осуществляют эффекторные функции. Предпочтительно, клетки экспрессируют, по меньшей мере, FcγRIII и осуществляют эффекторную функцию ADCC. Примеры человеческих лейкоцитов, которые опосредуют ADCC, включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), натуральные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы; предпочтительными являются PBMC и NK клетки. Эффекторные клетки можно выделить из нативного источника, например, крови.

Термин "комплементзависимая цитотоксичность" или "CDC" относится к лизису клетки-мишени в присутствии комплемента. Активация классического пути комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего подкласса), которые связываются со "своим" антигеном. Для оценки активации комплемента можно провести анализ CDC, например, описанный в публикации Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202: 163 (1996). Варианты антител с измененными аминокислотными последовательностями Fc-области (антитела с вариантной Fc-областью) и повышенной или пониженной способностью связываться с C1q описаны, например, в патенте США № 6195551 B1 и международной заявке WO 1999/51642. См. также, например, Idusogie et al., J. Immunol., 164: 4178-4184 (2000). Одна такая замена, которая усиливает связывание с C1q и, тем самым увеличивает активность CDC, представляет собой замену E333A, которая может преимущественно использоваться в антителах по изобретению.

Термин "антитело, содержащее Fc-область" относится к антителу, которое содержит Fc-область. С-концевой лизин (остаток 447 согласно системе нумерации ЕС) Fc-области может быть удален, например, во время очистки антитела или рекомбинантно конструированием нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело. Следовательно, композиция, содержащая антитело, имеющее Fc-область согласно настоящему изобретению, может содержать антитело с K447, со всеми удаленными K447 или смесь антител с остатком K447 и без него.

"Идентичность последовательностей" и "сходство последовательностей" можно определить выравниванием двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритмов глобального или локального выравнивания в зависимости от длины двух последовательностей. Последовательности одинаковой длины предпочтительно выравниваются с использованием алгоритмов глобального выравнивания (например, Needleman и Wunsch), которые оптимально выравнивают последовательности по всей длине, тогда как последовательности по существу различной длины предпочтительно выравниваются с использованием алгоритма локального выравнивания (например, Smith Waterman). Затем последовательности можно отнести к "по существу идентичным" или "по существу сходным", когда они (при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием параметров по умолчанию) имеют, по меньшей мере, определенный минимальный процент идентичности последовательностей (как определено ниже). В GAP используется алгоритм глобального выравнивания Needleman и Wunsch для выравнивания двух последовательностей по всей их длине (полной длине), с максимизацией числа совпадений и минимизацией числа гэпов. Глобальное выравнивание целесообразно использовать для определения идентичности последовательно-

стей, когда две последовательности имеют сходные длины. В общем, в программе GAP используются параметры по умолчанию, со штрафом за создание гэпа в последовательности=50 (нуклеотиды)/8 (белки) и штрафом за расширение гэпа=3 (нуклеотиды)/2 (белки). Для нуклеотидов используемая оценочная матрица по умолчанию представляет nwsgapdna, и для белков оценочная матрица по умолчанию представляет Blossum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Выравнивание последовательностей и балльные оценки для процентной идентичности последовательностей можно определить с использованием компьютерных программ, таких как пакет GCG Wisconsin Package, версия 10.3, доступный от Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 USA или с использованием программного обеспечения с открытым исходным кодом, такого как программа "needle" (с использованием алгоритма глобального выравнивания Needleman Wunsch) или "water" (с использованием алгоритма локального выравнивания Smith Waterman) в EmbossWIN версии 2.10.0, используя такие же параметры, что и для GAP, указанной выше, или используя настройки по умолчанию (как для "needle", так и для "water", и как выравнивания белка, так и ДНК, штраф за открытие гэпа по умолчанию равен 10,0, и штраф за расширение гэпа по умолчанию равен 0,5; оценочные матрицы по умолчанию - Blossum62 для белков и DNAMFull для ДНК). Когда последовательности имеют существенно различные общие длины, то предпочтительными являются локальные выравнивания, такие как алгоритмы Smith Waterman. Альтернативно, процентное сходство или идентичность могут быть определены поиском в публичных базах данных, с использованием таких алгоритмов, как FASTA, BLAST и т.д.

После того, как две аминокислотные последовательности выровнены с использованием любой из вышеуказанных программ выравнивания, рассчитывается % идентичности аминокислотных последовательностей, данной аминокислотной последовательности А к, с, или против данной аминокислотной последовательности В (что иначе можно выразить фразой: данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или включает некоторый % идентичности аминокислотной последовательности к, с или против данной аминокислотной последовательности В) следующим образом:  $100 \times \frac{X}{Y}$ , где X представляет количество аминокислотных остатков, оцененных как идентичные совпадения с помощью программы выравнивания последовательностей в программе выравнивания данных последовательностей А и В, и где Y представляет общее количество аминокислотных остатков в В. С учетом того, что длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, то % идентичность аминокислотной последовательности А с аминокислотной последовательностью В не будет равна % идентичности аминокислотной последовательности В с А.

Как здесь используется, "нуклеиновокислотная конструкция" или "нуклеиновокислотный вектор" понимается как искусственная молекула нуклеиновой кислоты, полученная в результате использования технологии рекомбинантной ДНК. Таким образом, термин "нуклеиновокислотная конструкция" не включает встречающиеся в природе молекулы нуклеиновых кислот, хотя нуклеиновокислотная конструкция может содержать (фрагменты) природных молекул нуклеиновой кислоты. Термины "экспрессионный вектор" или "экспрессионная конструкция" относятся к нуклеотидным последовательностям, которые способны осуществлять экспрессию гена в клетках-хозяевах или организмах-хозяевах, совместимых с такими последовательностями. Такие экспрессионные векторы обычно включают, по меньшей мере, подходящие регуляторные последовательности транскрипции и, необязательно, 3'-сигналы терминирования транскрипции. Также могут присутствовать дополнительные факторы, необходимые или пригодные в осуществлении экспрессии, такие как энхансерные элементы экспрессии. Экспрессионный вектор вводится в подходящую клетку-хозяина и осуществляет экспрессию кодирующей последовательности в клеточной культуре *in vitro* клетки-хозяина. Экспрессионный вектор должен быть подходящим для репликации в клетке-хозяине или в организме по изобретению.

Как здесь используется, термин "промотор" или "регуляторная последовательность транскрипции" относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, который функционирует для контроля транскрипции одной или более кодирующих последовательностей, и который расположен апстрим относительно направления транскрипции от сайта инициации транскрипции кодирующей последовательности, и структурно идентифицируется наличием сайта связывания ДНК-зависимой РНК-полимеразы, сайтов инициации транскрипции и любых других последовательностей ДНК, включая, не ограничиваясь этим, сайты связывания фактора транскрипции, сайты связывания репрессора и активатора, и любые другие последовательности нуклеотидов, известные специалисту в данной области, которые функционируют прямо или опосредованно для регуляции уровня транскрипции с промотором. "Конститутивный" промотор представляет промотор, который активен в большинстве тканей в большинстве физиологических условий и условий развития. "Индукцибельный" промотор представляет собой промотор, который регулируется физиологически или стадией развития, например, путем применения химического индуктора.

Как здесь используется, термин "оперательно связанный" относится к связи полинуклеотидных элементов в функциональной связи. Нуклеиновая кислота "оперательно связана", когда она помещается в функциональную связь с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, регуляторная последовательность транскрипции оперательно связана с кодирующей последовательностью, если она оказывает влияние на транскрипцию кодирующей последовательности. Оперательно связанная означает, что связанные последовательности ДНК, как правило, являются смежными и, при необходимости, со-

единены с двумя областями, кодирующими белок, смежными и в рамке считывания.

### Подробное описание изобретения

#### Анти-CCR7-антитела по изобретению

В первом аспекте изобретение обеспечивает антигенсвязывающие белки, которые связываются с CCR7. Антигенсвязывающий белок по изобретению, который связывается с CCR7, предпочтительно представляет собой анти-CCR7-антитело в самом широком смысле, как здесь определено выше, включая, например, анти-CCR7-антитела, фрагменты антител, производные антител, мутеины антител и варианты антител. Анти-CCR7-антитело по изобретению предпочтительно представляет собой выделенное антитело. Предпочтительно анти-CCR7-антитело по изобретению связывается с CCR7 приматов, более предпочтительно с CCR7 человека. Аминокислотная последовательность человеческого CCR7 доступна в GenBank: EAW60669.1 (SEQ ID NO: 75). Аминокислоты с 1 по 24 данной последовательности содержат сигнальный пептид транслокации через мембрану, который отщепляется во время экспрессии. Аминокислоты с 25 по 59 человеческого CCR7 составляют N-концевой внеклеточный домен, где домен содержит сульфатированные остатки тирозина в положениях Y32 и Y41. Для CCR7 человека известны различные аллельные варианты с одной или несколькими аминокислотными заменами относительно последовательности в GenBank: EAW60669.1. "CCR7 человека" в настоящем изобретении включает, по меньшей мере, эти аллельные варианты, при условии, что варианты имеют внеклеточный домен и обладают функцией CCR7.

Анти-CCR7-антитело по изобретению предпочтительно специфически связывается с N-концевым внеклеточным доменом CCR7, предпочтительно CCR7 человека. Антитело по изобретению предпочтительно специфически связывается с эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности "ZxLFE", где Z представляет собой сульфатированный тирозин, и x может быть любой аминокислотой, и F может быть заменен гидрофобной аминокислотой. Таким образом, антитело по изобретению предпочтительно специфически связывается с эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности "ZTLFE" в положениях 41-45 в N-концевом внеклеточном домене человеческого CCR7. Антитело предпочтительно является специфичным для CCR7 человека.

Анти-CCR7-антитело по изобретению предпочтительно обладает минимальной аффинностью для человеческого CCR7 или синтетического антигена, содержащего эпитоп "ZTLFE", предпочтительно для синтетического антигена SYM1899, как описано в приведенных здесь примерах. Следовательно, предпочтительно анти-CCR7-антитело по изобретению имеет  $K_d$   $1 \times 10^{-8}$  М,  $5 \times 10^{-9}$  М,  $2 \times 10^{-9}$  М,  $1,8 \times 10^{-9}$  М,  $1 \times 10^{-9}$  М,  $1 \times 10^{-10}$  М или  $1 \times 10^{-11}$  М или ниже. Альтернативно, минимальную аффинность антитела определяют относительно  $K_d$  эталонного анти-CCR7-антитела при тестировании в том же анализе. Таким образом, предпочтительно анти-CCR7-антитело по изобретению имеет  $K_d$  для CCR7 человека или для синтетического антигена, содержащего эпитоп ZTLFE (предпочтительно синтетического антигена SYM1899, как описано здесь в примерах), которая не более чем в 10; 5; 2; 1,5; 1,2; 1,1 или 1,05 раз выше, чем  $K_d$  эталонного анти-CCR7-антитела для антигена, где эталонное анти-CCR7-антитело представляет собой мышинное анти-CCR7-антитело, аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи которого представляет SEQ ID NO: 1, и аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи которого представляет SEQ ID NO: 2. Очевидно, понятно, что антитело с  $K_d$ , которая не более чем в 10 раз выше, чем  $K_d$  эталонного антитела, представляет собой антитело, которое имеет аффинность, которая не менее чем в 10 раз ниже, чем аффинность эталонного антитела. Таким образом, если эталонное антитело имеет  $K_d$   $1 \times 10^{-9}$  М, то данное антитело имеет  $K_d$   $1 \times 10^{-8}$  М или ниже.

Анти-CCR7-антитело по изобретению предпочтительно связывается с человеческим CCR7 или с синтетическим антигеном, содержащим эпитоп "ZTLFE" (предпочтительно синтетическим антигеном SYM1899, как здесь описано в примерах, SEQ ID NO: 76) с максимальной константой скорости диссоциации  $k_{off}$ . Следовательно, предпочтительно анти-CCR7-антитело по изобретению имеет константу скорости диссоциации  $k_{off}$ , которая составляет  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$  или  $1 \times 10^{-5}$  с<sup>-1</sup> или ниже. Альтернативно, максимальная константа скорости диссоциации  $k_{off}$  антитела определяется относительно константы скорости диссоциации  $k_{off}$  эталонного анти-CCR7-антитела при тестировании в том же анализе. Таким образом, предпочтительно анти-CCR7-антитело по изобретению связывается с человеческим CCR7 или с синтетическим антигеном, содержащим эпитоп "ZTLFE" (предпочтительно синтетическим антигеном SYM1899, как здесь описано в примерах), в 10; 5; 2; 1,5; 1,2; 1,1 или 1,05 раз выше, чем константа скорости диссоциации  $k_{off}$  эталонного анти-CCR7-антитела для антигена, где эталонное анти-CCR7-антитело представляет собой мышинное анти-CCR7-антитело, аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи которого представляет SEQ ID NO: 1, и аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи которого представляет SEQ ID NO: 2.

Анти-CCR7-антитело по изобретению предпочтительно представляет нейтрализующее антитело, которое ингибирует CCR7-зависимую внутриклеточную передачу сигнала и/или интернализацию рецептора CCR7, индуцированную по меньшей мере одним лигандом CCR7, выбранным из CCL19 и CCL21. Анти-CCR7-антитело предпочтительно имеет IC<sub>50</sub>, которая не превышает 150, 100, 80, 50, 30, 25, 20, 15, 10, 5 или 3 нМ для ингибирования CCR7-зависимой внутриклеточной передачи сигнала и/или интерна-

лизации рецептора CCR7, индуцированной по меньшей мере одним лигандом CCR7, выбранным из CCL19 и CCL21, что можно, например, определить в анализе, описанном здесь в примерах. Альтернативно, максимальное значение  $IC_{50}$  антитела определяется относительно  $IC_{50}$  эталонного анти-CCR7-антитела при тестировании в том же анализе. Таким образом, предпочтительно анти-CCR7-антитело по изобретению имеет  $IC_{50}$ , которая не более чем в 10; 5; 2; 1,5; 1,2; 1,1 или 1,05 раз выше, чем  $IC_{50}$  эталонного анти-CCR7-антитела, где эталонное анти-CCR7-антитело представляет собой мышинное анти-CCR7-антитело, аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи которого представляет SEQ ID NO: 1, и аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи которого представляет SEQ ID NO: 2.

Анти-CCR7-антитело по изобретению предпочтительно ингибирует CCR7-зависимую внутриклеточную передачу сигнала CCR7, как описано выше, без существенных агонистических эффектов, более предпочтительно без детектируемых агонистических эффектов, что можно, например, определить в анализе, описанном здесь в примерах.

Анти-CCR7-антитело по изобретению предпочтительно содержит гипервариабельные участки HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, где

HVR-H1 содержит последовательность: G-F/L-T/A/P-F-S/T/R-N/D/S-Y/F-A;

HVR-H2 H1 содержит последовательность: I-S-S/D-G/R-G-S/T/F-Y/H/F-T/P;

HVR-H3 H1 содержит последовательность: A/T/V/G-R-R/A-A/E/T-Y/G/T-R/V-Y/V-D/\*-GTG/\*-E/V/D/A/G/\*-N/S/D/T-A/S/D-M/L/F-Y/S;

HVR-L1 H1 содержит последовательность: Q/S-D/S-I/L/V-G/S/L-D/S/P/G/N-S/N-VY/DGKTY;

HVR-L2 H1 содержит последовательность: A/S/T-T/I/V-S; и

HVR-L3 H1 содержит последовательность: L/W/Q-Q-Y/F/G/W-A/T/S-S/N/H-S/F/N-P-L/P/Q-T, где "\*" указывает, что в данном положении не может присутствовать никакая аминокислота.

Более предпочтительно анти-CCR7-антитело по изобретению представляет антитело, где

HVR-H1 содержит одну из последовательностей SEQ ID NO: 3-10; HVR-H2 содержит одну из последовательностей SEQ ID NO: 11-16; HVR-H3 содержит одну из последовательностей SEQ ID NO: 17-23; HVR-L1 содержит одну из последовательностей SEQ ID NO: 24-30; HVR-L2 содержит одну из последовательностей SEQ ID NO: 31-33; и HVR-L3 содержит одну из последовательностей SEQ ID NO: 34-39.

Наиболее предпочтительно анти-CCR7-антитело по изобретению содержит HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, где каждый в следующем порядке содержит: (i) SEQ ID NO: 3, 11, 17, 24, 32 и 34; (ii) SEQ ID NO: 4, 12, 18, 25 31 и 35 (iii) SEQ ID NO: 5, 12, 18, 26, 31 и 35; (iv) SEQ ID NO: 6, 13, 19, 27, 31 и 36; (v) SEQ ID NO: 7, 14, 20, 24, 31 и 35; (vi) SEQ ID NO: 8, 15, 21, 28, 31 и 37; (vii) SEQ ID NO: 9, 16, 22, 29, 33 и 38; или (viii) SEQ ID NO: 10, 14, 23, 30, 31 и 39.

Анти-CCR7-антитело по изобретению может представлять мышинное антитело или химерное, например, мышинное-человеческое антитело. Однако предпочтительно антитело представляет гуманизованное антитело. Гуманизованное антитело по изобретению предпочтительно индуцирует слабый иммуногенный ответ или он вовсе отсутствует против антитела у субъекта, которому антитело вводится. Например, гуманизованное антитело по изобретению индуцирует и/или, как ожидается, индуцирует ответ человеческих против мышинных антител (НАМА) по существу на низком уровне по сравнению с исходным мышинным антителом, например, содержащим последовательность SEQ ID NO: 1 и 2, у субъекта-хозяина. Предпочтительно гуманизованное антитело индуцирует и/или, как ожидается, индуцирует минимальный ответ человеческих против мышинных антител (НАМА), или он отсутствует вовсе. Наиболее предпочтительно антитело по изобретению вызывает реакцию против мышинного антитела, которая находится на клинически приемлемом уровне или ниже.

В данной области известны различные способы гуманизации "нечеловеческих" антител. Например, гуманизованное антитело может иметь один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из источника, который не является человеком. Эти "нечеловеческие" аминокислотные остатки часто упоминаются как "импортные" остатки, которые обычно взяты из "импортной" варибельной области. Гуманизация может быть, главным образом, выполнена по способу Винтера и соавторов (Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)) путем замены последовательностей гипервариабельного участка грызуна соответствующими последовательностями человеческого антитела. Следовательно, подобные "гуманизованные" антитела являются химерными антителами (патент США № 4816567), в которых значительно меньшая часть, чем целая варибельная область человека, замещена соответствующей последовательностью от вида, отличного от человека. На практике, гуманизованные антитела обычно являются человеческими антителами, в которых некоторые остатки гипервариабельного участка и возможно некоторые остатки FR замещены остатками из аналогичных участков в антителах грызунов.

Выбор человеческих варибельных областей, как легкой цепи, так и тяжелой цепи, для применения в создании гуманизованных антител, очень важен для снижения антигенности. Согласно так называемому методу "наилучшего соответствия" последовательность варибельной области антитела грызуна подвергают скринингу против полной библиотеки известных последовательностей варибельных областей человека. Затем человеческую последовательность, которая наиболее близка к последовательности

грызунов, принимается в качестве человеческой каркасной области для гуманизованного антитела (Sims et al. , 1993, J. Immunol., 151: 2296; Chothia et al. , 1987, J. Mol. Biol., 196: 901). В другом методе используется конкретная каркасная область, полученная из консенсусной последовательности всех человеческих антител конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Одну и ту же каркасную область можно использовать для нескольких различных гуманизованных антител (Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285; Presta et al. (1993) J. Immunol., 151: 2623).

Кроме того, важно, чтобы антитела были гуманизованы с сохранением высокой аффинности к антигену и других положительных биологических свойств. Для достижения этой цели, согласно одному способу, гуманизованные антитела получают с помощью процесса анализа исходных последовательностей и различных предполагаемых гуманизованных продуктов с использованием трехмерных моделей исходных и гуманизованных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов являются широко доступными и известными специалистам в данной области. Имеются компьютерные программы, которые иллюстрируют и экспонируют возможные трехмерные конформационные структуры выбранных последовательностей иммуноглобулинов-кандидатов. Исследование этих экспонированных данных позволяет проводить анализ возможной роли остатков в функционировании последовательностей иммуноглобулинов-кандидатов, т.е. проводится анализ остатков, которые влияют на способность иммуноглобулина-кандидата связываться со своим антигеном. Таким образом, можно отобрать и комбинировать остатки FR из реципиентной и импортной последовательностей так, чтобы достичь требуемых свойств антитела, таких как повышенная аффинность к антигену(ам)-мишени. Как правило, остатки гипервариабельных участков непосредственно и наиболее существенно вовлечены в связывание антигена.

Для выбора предпочтительных константных областей варибельной области человека, как легкой, так и тяжелой цепи, используемых при создании предпочтительных гуманизованных антител по изобретению, были исследованы базы данных последовательностей человеческих IgG для сравнения с мышиными VH-областями антител 729 с использованием поисковых алгоритмов BLAST. Человеческие варибельные области-кандидаты были выбраны из 200 лучших результатов BLAST. Они были сведены к трем кандидатам на основе сочетания гомологии каркаса, сохранения ключевых остатков каркаса и структуры канонической петли.

Анти-CCR7-антитело по изобретению предпочтительно представляет антитело, в котором варибельная область тяжелой цепи антитела содержит 4 каркасные области тяжелой цепи HFR1 - H3FR4 и 3 гипервариабельных участка HVR H1 - HVR-H3, которые операбельно связаны в следующем порядке HFR1, HVR-H1, HFR2, HVR-H2, HFR3, HVR-H3 и HFR4, и где варибельная область легкой цепи антитела содержит 4 каркасные области легкой цепи LFR1 - LFR4 и 3 гипервариабельных участка HVR-L1÷HVR-L3, которые операбельно связаны в следующем порядке LFR1, HVR-L1, LFR2, HVR-L2, LFR3, HVR-L3 и LFR4. Предпочтительно каркасные области тяжелой цепи HFR1÷HFR4 в антителе по изобретению имеют аминокислотные последовательности: i) SEQ ID NO: 40, 43, 45 и 48 соответственно (т.е. FR из VH1); ii) SEQ ID NO: 41, 44, 46 и 49 соответственно (т.е. FR из VH2); или iii) SEQ ID NO: 42, 44, 47 и 49 соответственно (т.е. FR из VH3). Предпочтительно каркасные области легкой цепи LFR1÷LFR4 в антителе по изобретению имеют аминокислотные последовательности: iv) SEQ ID NO: 50, 52, 55 и 58 соответственно (т.е. FR из VL1); или v) SEQ ID NO: 51, 53, 56 и 59 соответственно (т.е. FR из VL2).

Предпочтительно в анти-CCR7-антителе по изобретению варибельная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере с 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности по меньшей мере с одной из последовательностей SEQ ID NO: 61, 62 и 63 (VH1, 2 или 3), более предпочтительно варибельная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере с 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 61.

Предпочтительно в анти-CCR7-антителе по изобретению варибельная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере с 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности по меньшей мере с одной из последовательностей из SEQ ID NO: 64 и 65 (VK1 или 2), более предпочтительно варибельная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере с 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 64.

Особенно предпочтительное анти-CCR7-антитело по изобретению содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 (т.е. варибельную область VH1) и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (т.е. варибельную область VK1).

Предполагается модификация(и) аминокислотной последовательности анти-CCR7-антитела по изобретению. Например, может быть желательно улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела получают путем введения соответствующих нуклеотидных изменений в нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, или путем синтеза пептидов. Такие модификации включают, например, делеции и/или инсерции, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антагониста. Любая комбинация делеции, инсерции

и замены выполняется для достижения конечной конструкции, при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками. Аминокислотные изменения могут также изменять посттрансляционные процессы антагониста, такие как изменение числа или положения сайтов гликозилирования.

Инсерции в аминокислотную последовательность включают амино- и/или карбоксиконцевые слияния, длина которых колеблется от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также инсерции одного или нескольких аминокислотных остатков внутри последовательности. Примеры концевых инсерции включают антагонист с N-концевым метионильным остатком или антагонист, слитый с цитотоксическим полипептидом. Другие инсерционные варианты молекулы антагониста включают слияние N-или C-конца антагониста с ферментом или полипептидом, что увеличивает период полураспада антагониста в сыворотке крови.

Вариантом другого типа является вариант с аминокислотной заменой. Данные варианты имеют по меньшей мере один аминокислотный остаток в молекуле антагониста, замещенный другим остатком. Сайты, представляющие наибольший интерес для заместительного мутагенеза, включают гипервариабельные участки, но в объеме настоящего изобретения входят также изменения в FR.

В еще одном типе аминокислотного варианта антитела имеет место изменение исходного паттерна гликозилирования антагониста. Под изменением подразумевается делеция одного или более углеводных фрагментов, обнаруженных в антагонисте и/или добавление одного или более сайтов гликозилирования, которые отсутствуют в антагонисте. Обычно гликозилирование полипептидов является N-связанным или O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X является любой аминокислотой, кроме пролина, представляют последовательностями распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из моносахаридов или производных моносахарида N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикарбонильной группе, чаще всего к серину или треонину, хотя также могут быть использованы 5-гидроксипролин или 5-гидроксиллизин. Добавление сайтов гликозилирования к антителу обычно осуществляют путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или более описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Также изменение может быть сделано добавлением или заменой одного или более остатков серина или треонина в последовательности исходного антитела (для сайтов O-связанного гликозилирования). Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислотных последовательностей антитела, получают различными способами, известными в данной области. Такие способы включают, не ограничиваясь этим, выделение из природного источника (в случае вариантов аминокислотных последовательностей, встречающихся в природе) или получение с использованием олигонуклеотид-опосредованного (или сайт-направленного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза ранее полученного варианта или невариантной версии антагониста.

В некоторых вариантах осуществления анти-CCR7-антитело по изобретению содержит константную область легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела. Могут использоваться любые константные области антитела, известные в данной области техники. Константная область легкой цепи может представлять, например, константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа, например, константную область легкой цепи человека каппа- или лямбда-типа. Константная область тяжелой цепи может представлять, например, константные области тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа, например, константную область тяжелой цепи человека альфа-, дельта- эpsilon-, гамма-или мю-типа. Таким образом, анти-CCR7-антитело по изобретению может иметь константные области любого изотипа, включая константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, а также константные области IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В одном варианте осуществления константная область легкой или тяжелой цепи представляет фрагмент, производное, вариант или мутант встречающейся в природе константной области. Известны способы получения антитела другого подкласса или изотипа из представляющего интерес антитела, т.е. способы переключения подкласса. Таким образом, IgG-антитела могут быть получены, например, из IgM-антитела и наоборот. Такие методы позволяют получать новые антитела, которые обладают антигенсвязывающими свойствами исходного антитела (родительского антитела), но также обладают биологическими свойствами, связанными с изотипом или подклассом антител, отличными от свойств исходного антитела. Могут быть использованы методы рекомбинантной ДНК. В таких процедурах можно использовать клонированные ДНК, кодирующие определенные полипептиды антитела, например ДНК, кодирующую константную область антитела желаемого изотипа. См. также Lantto et al. (2002, *Methods Mol. Bio.* 1.178: 303-16.). Следовательно, анти-CCR7-антитела по изобретению включают антитела, которые содержат, например, одну или более последовательностей вариабельной области, раскрытых здесь и имеющих желаемый изотип (например, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgE и IgD), а также Fab- или F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты. Кроме того, если требуется IgG4, то также может потребоваться введение точечной мутации (CPSCP→CPPCP) в шарнирной области, как описано в публикации Bloom et al. (1997, *Protein Science*, 6: 407), для снижения тенденции к образованию дисульфидных связей внутри H-цепи, которые

могут привести к гетерогенности в IgC4-антителах.

Анти-CCR7-антитело по изобретению предпочтительно включает функциональную Fc-область, обладающую по меньшей мере одной эффекторной функцией, выбранной из группы, состоящей из связывания Clq, комплементзависимой цитотоксичности; связывание с Fc-рецептором, антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности и фагоцитоза.

Анти-CCR7-антитело по изобретению можно модифицировать для усиления эффекторной функции, например, усиления ADCC и/или CDC антитела. Это может быть достигнуто введением одной или более аминокислотных замен в Fc-область антитела. Предпочтительная замена в Fc-области антитела по изобретению представляет собой замену, которая увеличивает связывание с Clq и, тем самым, повышает активность CDC, как, например, описано в публикации Idusogie et al., *J. Immunol.*, 164: 4178-4184 (2000). Предпочтительной заменой в Fc-области, которая увеличивает связывание Clq, является замена E333A.

Гликозильные группы, добавленные к аминокислотному остову гликопротеинов, например, антител, образованы несколькими моносахаридами или производными моносахаридов, что в результате дает композицию, которая может различаться одним антителом, полученным в клетке от разных млекопитающих или тканей. Кроме того, было показано, что различная композиция гликозильных групп может влиять на активность антитела в антигензависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC). Следовательно, можно улучшить эти свойства анализом паттерна гликозилирования антител из разных источников. Примером такого подхода является работа Niwa et al. (2004, *Cancer Res.*, 64 (6): 2127-33).

Альтернативно или дополнительно остаток(и) цистеина может быть введен в Fc-область, тем самым обеспечивая образование межцепочечной дисульфидной связи в этой области. Полученное таким образом гомодимерное антитело может иметь повышенную способность к интернализации и/или повышенный комплементпосредованный киллинг клеток и антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). См. Caron et al. (1992, *J. Exp. Med.* 176: 1191-1195) и Shopes, (1992, *Immunol.*, 148: 2918-2922). Гомодимерные антитела с повышенной противоопухолевой активностью также могут быть получены с использованием гетеробифункциональных кросслинкеров, как описано в публикации Wolff et al. (1993, *Cancer Research*, 53: 2560-2565). Альтернативно, можно сконструировать антитело, которое обладает двойными Fc-областями, и, тем самым, оно может иметь повышенную активность к лизису с участием комплемента и ADCC. См. Stevenson et al. (1989, *Anti-Cancer Drug Design*, 3: 219-230). Для того, чтобы увеличить период полураспада антитела в сыворотке, можно включить в антитело "связывающий рецептор спасения эпитоп" (особенно фрагмент антитела), как описано, например, в патенте США 5739277. Как здесь используется, термин "связывающий рецептор спасения эпитоп" относится к эпитопу Fc-области молекулы IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), который ответственен за увеличение периода полураспада молекулы IgG in vivo в сыворотке крови.

Предпочтительное анти-CCR7-антитело по изобретению содержит константную область тяжелой цепи аллотипа G1m17,1 человека (см. Jefferis and Lefranc (2009) *MAbs*, Vol. 1, Issue 4, pp. 1-7), где константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79. Более предпочтительно константная область тяжелой цепи аллотипа G1m17,1 человека в антителе по изобретению включает аминокислотную замену E333A, константная область тяжелой цепи которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80.

Цитотоксическая химиотерапия или лучевая терапия рака ограничиваются за счет проявления серьезных, иногда угрожающих жизни побочных эффектов, которые возникают в результате токсичности для чувствительных нормальных клеток, поскольку препараты не являются избирательными для злокачественных клеток. Одна из стратегий избежания таких проблем заключается в связывании терапевтического агента с антителами, такими как анти-CCR7-антитела по изобретению. Такой подход увеличивает экспозицию для злокачественных клеток и уменьшает воздействие лиганд-нацеленных препаратов на нормальные клетки. См. Allen, *Nature*, 2: 750-763 (2002). Терапевтический агент может представлять иммуносупрессивный агент, т.е. соединение, которое действует для подавления или маскирования иммунной системы млекопитающего, подвергающегося лечению. Они включают соединения, которые подавляют продукцию цитокинов, оказывают понижающую регуляцию или подавляют экспрессию собственных антигенов или маскируют антигены МНС. Терапевтический агент также может быть цитотоксическим агентом, т.е. соединением, которое ингибирует или отменяет функцию клеток и/или вызывает разрушение клеток. Термин предназначен для включения радиоактивных изотопов, химиотерапевтических агентов, т.е. химических соединений, пригодных для лечения рака, и токсинов, таких как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или их фрагменты. Терапевтический агент также может представлять цитокин, гормон, фактор роста, фактор некроза, т.е. белок или пептид, высвобождаемый одной клеточной популяцией, которая действует на другую клетку в качестве медиаторов межклеточных взаимодействий, или даже в той же популяции клеток. Как здесь используется, термин цитокин включает белки и пептиды из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток и биологически активных аналогов цитокинов с нативной последовательностью. Терапевтический агент также может представлять пролекарство, которое относится к предшественнику или производной форме фармацевтически активного вещества,

которое менее цитотоксично для опухолевых клеток по сравнению с исходным лекарственным препаратом и может ферментативно активироваться или превращаться в более активную исходную форму.

#### **Конъюгаты антитела и одного или более низкомолекулярных токсинов**

В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения анти-CCR7-антитело по изобретению конъюгировано с одной или несколькими молекулами токсина. Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают цепь А дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантины, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены.

Кроме того, настоящее изобретение дополнительно относится к антителу, конъюгированному с соединением с нуклеолитической активностью (например, рибонуклеазой или ДНК-эндонуклеазой, такой как дезоксирибонуклеаза, ДНКаза) или другим соединением, способным разрушать клеточную структуру или органеллы и, следовательно, приводить к гибели или снизить жизнеспособность клетки.

Антитела по настоящему изобретению также могут быть конъюгированы с активирующим пролекарством агентом, который превращает пролекарство в активное противораковое лекарственное средство. Агент, представляющий компонент таких конъюгатов, включает любой агент, способный воздействовать на пролекарство таким образом, чтобы превратить его в его более активную цитотоксическую форму.

Альтернативно, можно сконструировать слитые белки, содержащие, по меньшей мере, антигенсвязывающую область анти-CCR7-антитела по изобретению, связанную, по меньшей мере, с функционально активным участком фермента по изобретению, с использованием методов рекомбинантной ДНК, хорошо известных в данной области (см., например, Neuberger et al., 1984, Nature, 312: 604-608).

Конъюгаты антитела и цитотоксического агента можно получить с использованием различных бифункциональных белковых сшивающих агентов или линкеров. Линкер может представлять "расщепляемый линкер", способствующий высвобождению цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, можно использовать кислотно-лабильный линкер, чувствительный к пептидазе линкер, диметилловый линкер или дисульфидсодержащий линкер.

Альтернативно, слитый белок, содержащий антитело и цитотоксический агент, может быть получен, например, рекомбинантными методами или пептидным синтезом.

#### **Получение и очистка антител по изобретению**

Анти-CCR7-антитела по изобретению можно получить любым из ряда обычных методов. Обычно их получают в рекомбинантных экспрессионных системах, используя любой способ, известный в данной области. См., например, Shukla and Thommes (2010), "Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins", Trends in Biotechnol. 28 (5) :253-261), Harlow and Lane (1988) "Harlow and Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY и Sambrook and Russell (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (3<sup>rd</sup> edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Любая экспрессионная система, известная в данной области техники может быть использована для получения рекомбинантных полипептидов по изобретению. В общем, клетки-хозяева трансформируют рекомбинантным экспрессионным вектором, который включает ДНК, кодирующую желаемый полипептид.

Следовательно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие анти-CCR7-антитело по изобретению. Одна нуклеотидная последовательность кодирует полипептид, включающий, по меньшей мере, переменную область легкой цепи анти-CCR7-антитела по изобретению, другая нуклеотидная последовательность кодирует полипептид, включающий, по меньшей мере, переменную область тяжелой цепи анти-CCR7-антитела по изобретению. Предпочтительной молекулой нуклеиновой кислоты является экспрессионный вектор, в котором нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды антитела по изобретению, операбельно связаны с регуляторными последовательностями экспрессии, например, такими как промотор и сигнальная последовательность. Предпочтительные сигнальные последовательности для экспрессии полипептидов анти-CCR7-антитела по изобретению включают, например, сигнальный пептид тяжелой цепи: MGWTLVFLFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO: 77) и сигнальный пептид легкой цепи: MVSSAQFLGLLLLCFQGTRC (SEQ ID NO: 78).

В еще одном аспекте изобретение относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, как определено выше в данном разделе. Клетка предпочтительно представляет выделенную клетку или культивируемую клетку. Среди клеток-хозяев, которые могут быть использованы, находятся прокариотические клетки, дрожжевые клетки или клетки высших эукариотических организмов. Прокариоты включают грамотрицательные или грамположительные организмы, например *E. coli* или бациллы. Высшие эукариотические клетки включают клетки насекомых и стабильные клеточные линии млекопитающих. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают линию клеток почек обезьяны COS-7 (Gluzman et al., 1981, Cell, 23: 175), клетки L, клетки 293, клетки C127, клетки 3T3, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки HeLa, линии клеток ВНК и линия клеток CV1/EBNA, полученная из линии клеток почки африканской зеленой марышки HCl, как описано McMahon et al., 1991, EM-

ВО J., 10: 2 821. Соответствующие клонирующие и экспрессионные векторы для применения с бактериальными, грибковыми, дрожжевыми клетками-хозяевами и клетками-хозяевами млекопитающих описаны Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985).

Трансформированные клетки можно культивировать в условиях, которые способствуют экспрессии полипептида. Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к способу получения анти-CCR7-антитела по изобретению, где способ включает стадию культивирования клетки, содержащей по меньшей мере один экспрессионный вектор, как здесь определено, в условиях, способствующих экспрессии полипептида, и, необязательно, выделение полипептида.

Анти-CCR7-антитело по изобретению может быть выделено с использованием обычных способов очистки белка, включая, например, хроматографию на протеин А-сефарозе, хроматографию на гидроксилапатите, гель-электрофорез, диализ или аффинную хроматографию (см., например, Low et al., 2007, J. Chromatography B, 848: 48-63, Shukla et al., 2007, J. Chromatography B, 848: 28-39), включая, например, аффинную хроматографию с использованием лигандов CaptureSelect™, которая предлагает уникальный аффинный раствор для очистки, на основе фрагментов антитела, полученного из однодоменного верблюжьего антитела (VHH) (см., например, Eifler et al., 2014).

Biotechnology Progress DOI: 10.1002/btpr.1958). Полипептиды, предназначенные для применения в настоящем изобретении, включают по существу гомогенные рекомбинантные полипептиды анти-CCR7-антитела, по существу не содержащие загрязняющих эндогенных веществ.

#### **Композиции, содержащие антитела по изобретению**

В еще одном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей анти-CCR7-антитело по изобретению, т.е. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с рецептором CCR7, или его фармацевтическое производное или пролекарство, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, адьювантом или носителем, для введения субъекту. Указанную фармацевтическую композицию можно использовать в способах лечения, описанных ниже, введением эффективного количества композиции субъекту, нуждающемуся в этом. Как здесь используется, термин "субъект" относится ко всем животным, относящимся к млекопитающим, и включает, не ограничиваясь этим, приматов и людей. Субъект предпочтительно является человеком мужского или женского пола любого возраста или расы.

Как здесь используется, термин "фармацевтически приемлемый носитель" предназначен для включения любых и всех растворителей, дисперсионных сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых агентов, изотонических агентов и агентов, замедляющих всасывание и т.п., совместимых с фармацевтическим введением (см., например, "Handbook of Pharmaceutical Excipients", Rowe et al eds. 7th edition, 2012, www.pharmpress.com). Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных соединений хорошо известно в данной области. За исключением того, когда какие-либо обычные среды или агент являются несовместимыми с активным соединением, предполагается их применение в композициях. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях, и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные полипептиды (менее примерно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Антитела по изобретению могут находиться в одной и той же композиции или могут вводиться в разных композициях. Введение может быть одновременным или последовательным и может быть эффективным в любом порядке.

Дополнительные активные соединения также могут быть включены в фармацевтическую композицию по изобретению. Таким образом, в конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция по изобретению может также содержать более чем одно активное соединение, если это необходимо для конкретного заболевания, которое подвергается лечению, предпочтительно соединения с дополнительными активностями, которые не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. Например, может быть желательным дополнительно обеспечить химиотерапевтический агент, цитокин, анальгезирующий или иммуномодулирующий агент, например, иммуносупрессивный агент или иммуностимулирующий агент. Эффективное количество таких других активных агентов зависит, помимо прочего, от количества антитела по изобретению, присутствующего в фармацевтической композиции, типа заболевания или расстройства или лечения и т. д.

В одном варианте осуществления антитело по изобретению готовят с носителями, которые защи-

щают указанное соединение от быстрого выведения из организма, в виде композиции с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки, например, липосомы. Можно использовать биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Специалистам в данной области техники известны способы получения таких составов. Липосомальные суспензии, включая нацеленные липосомы, также могут быть использованы в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области, например, как описано в патенте США № 4522811, международной заявке WO 201010990.

Путь введения антитела (или его фрагмента) по изобретению может быть пероральным, парентеральным, ингаляционным или местным путем. Как здесь используется, термин "парентеральный" включает внутривенное, внутриартериальное, внутрилимфатическое, внутрибрюшинное, внутримышечное, подкожное, ректальное или интравагинальное введение. Предпочтительными являются внутривенные формы парентерального введения. Под выражением "системное введение" подразумевается пероральное, внутривенное, внутрибрюшинное и внутримышечное введение. Конечно, количество антитела, необходимое для терапевтического или профилактического эффекта, зависит от выбранного антитела, характера и тяжести состояния, которое лечат, и пациента. Кроме того, антитело может подходить для пульсирующей инфузии, например, со снижающимися дозами антитела. Предпочтительно дозирование проводят путем инъекций, наиболее предпочтительно внутривенных или подкожных инъекций, в зависимости от того, является ли введение кратковременным или длительным.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция по изобретению может находиться в форме, подходящей для парентерального введения, такой как стерильные растворы, суспензии или лиофилизированные продукты в соответствующей разовой лекарственной форме. Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (когда растворимы в воде) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных растворов или дисперсий непосредственно перед инъекцией. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, *StemophorEM* (BASF, Parsippany, N.J.) или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть текучей до такой степени, чтобы ее можно легко набирать в шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять растворитель или дисперсионную среду, содержащие, например, воду, этанол, фармацевтически приемлемый полиол, такой как глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и их подходящие смеси. Необходимую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Предупреждение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабе-нов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобного. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия в композиции.

Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть достигнуто путем включения в композицию агента, который замедляет всасывание, например, моностеарат алюминия и желатин.

Стерильные инъекционные растворы можно приготовить посредством включения активного соединения (например, полипептида или антитела) в требуемом количестве в подходящий растворитель с использованием одного или комбинации ингредиентов, перечисленных выше, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии готовят включением активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и лиофильная сушка, что дает порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из ранее стерилизованного фильтрованием раствора.

В конкретном варианте осуществления указанную фармацевтическую композицию вводят внутривенно (в/в) или подкожно (п/к). Можно использовать подходящие эксципиенты, такие как наполнители, буферные агенты или поверхностно-активные вещества. Указанные формуляции готовят с использованием стандартных способов приготовления композиций для парентерального введения, которые хорошо известны в данной области и более подробно описаны в различных ссылках, включая, например, "Remington: Science and Practice of Pharmacy" (Ed. Allen, LV 22-e издание, 2012, [www.pharmpress.com](http://www.pharmpress.com)).

Особенно преимущественно формулировать фармацевтические композиции, а именно композиции для парентерального введения, в разовой лекарственной форме для легкого введения и однородности дозировки. Как здесь используется, разовая лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве разовых доз для субъекта, подлежащего лечению; где каждая разовая доза содержит заранее определенное количество активного соединения (антитела по изобретению), рас-

считанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация разовых лекарственных форм по изобретению диктуется и непосредственно зависит от уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который требуется достичь, и ограничений, имеющихся в области формуляции такого активного соединения для лечения субъектов.

Как правило, эффективное вводимое количество антитела по изобретению будет зависеть от относительной эффективности выбранного соединения, тяжести расстройства, которое лечится, и массы больного. Однако активные соединения обычно вводят один или несколько раз в сутки, например, 1, 2, 3 или 4 раза в сутки со стандартными суммарными суточными дозами в диапазоне от 0,001 до 1000 мг/кг массы тела в сутки, предпочтительно примерно от 0,01 до примерно 100 мг/кг массы тела в сутки, наиболее предпочтительно примерно от 0,05 до 10 мг/кг массы тела в сутки.

Помимо введения антител пациенту, настоящая заявка предусматривает введение антител посредством генной терапии. Международная заявка WO 96/07321 относится к применению генной терапии с целью создания внутриклеточных антител.

Фармацевтические композиции могут быть включены в контейнер, упаковку или дозатор вместе с инструкциями по введению.

Антитела и фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно использовать с другими лекарственными средствами для обеспечения комбинированной терапии. Другие лекарственные препараты могут составлять часть той же композиции или могут быть предоставлены в виде отдельной композиции для введения одновременно или в разное время.

#### **Применение антител по изобретению**

Антитела и фармацевтические композиции по изобретению будут пригодными в лечении широкого ряда заболеваний, состояний и показаний. Примеры типов заболеваний, которые можно лечить, включают раковые заболевания, воспалительные состояния, состояния и осложнения, возникшие в результате трансплантации тканей или органов, а также состояния и осложнения, возникшие в результате или связанные с фиброзом.

Антитела и фармацевтические композиции по изобретению могут соответственно использоваться для лечения расстройств или заболеваний, связанных с раковыми заболеваниями, особенно для лечения злокачественных новообразований, где указанные злокачественные новообразования характеризуются опухолевыми клетками, экспрессирующими рецептор CCR7, более конкретно, для индукции гибели или индукции апоптоза опухолевых клеток, экспрессирующих рецептор CCR7. Иллюстративные неограничивающие примеры злокачественных новообразований, опухолевые клетки которых экспрессируют рецептор CCR7, чувствительные к лечению по изобретению, включают хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), фолликулярную лимфому, крупноклеточную В-клеточную лимфому, СПИД-ассоциированную лимфому, лимфоплазмоцитарную лимфому, лимфому Беркитта, В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, болезнь Ходжкина, Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых, фунгоидный микоз, бластный криз при хронических миелопролиферативных синдромах, бластный криз при миелодиспластических синдромах, рак молочной железы, немелкоклеточный рак легкого, меланома, рак желудка или плоскоклеточная карцинома головы и шеи, и карцинома толстой кишки. В предпочтительном варианте злокачественные новообразования, чувствительные к лечению по изобретению, включают рак молочной железы, немелкоклеточный рак легкого, меланому, рак желудка или плоскоклеточную карциному головы и шеи, и толстой кишки. В наиболее предпочтительном варианте злокачественные новообразования, чувствительные к лечению по изобретению, включают фолликулярную лимфому, Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых, лимфому Беркитта, бластный криз при хронических миелопролиферативных синдромах и бластный криз при миелодиспластических синдромах. В еще более предпочтительном варианте осуществления злокачественные новообразования, подлежащие лечению по изобретению, включают CLL и MCL.

В конкретном варианте осуществления антитело по изобретению можно комбинировать с другими способами лечения болезненных состояний, описанных здесь, например химиотерапией, лучевой терапией, иммунотерапией или хирургическим методом, включая алкилирующие агенты, антимаетаболиты, антигормоны, терапевтические агенты для лечения различных симптомов заболеваний, например, болеутоляющие средства, диуретики, антидиуретики, противовирусные препараты, антибиотики, цитокины, пищевые добавки, препараты для лечения анемии, терапевтические агенты для лечения нарушений свертываемости крови, лекарственные препараты для лечения заболеваний костной системы, лекарственные препараты, применяемые в области психиатрии и психологии, и тому подобное.

Стволовые клетки костного мозга или периферической крови можно отобрать у указанного пациента после лечения анти-CCR7-антителом для осуществления аутологичной трансплантации костного мозга или стволовых клеток.

Также может быть пригодным лечить пациентов цитокинами для повышающей регуляции экспрессии CCR7 или другого белка-мишени на поверхности злокачественных В-клеток до введения антитела по изобретению. Цитокины также можно вводить одновременно с или до или после введения истощающего антитела или радиоактивно меченого антитела для стимуляции иммунных эффекторных функций.

В одном варианте осуществления химиотерапевтические схемы можно использовать для дополнения лекарственных средств, описанных здесь, и они могут назначаться одновременно или последовательно в любом порядке с введением указанного радиоактивно меченого антитела. Схема химиотерапии может быть выбрана из группы, состоящей из CHOP (циклофосфида, доксорубицина (также называемого гидроксилдаунорубицином), винкристина (также называемого онковином) и преднизона), ICE (идарубицина, цитарабина и этопозиды), митозантрона, цитарабина, DVP (даунорубицина, винкристина и преднизона), ATRA (полностью транс-ретиноевой кислоты), идарубицина, химиотерапевтической схемы hoelzer, химиотерапевтической схемы La, ABVD (блеомицина, дакарбазина, доксорубицина и винкристина), SEOP (циклофосфида, эпирубицина, винкристина и преднизолона), 2-CdA (2-хлордезоксидезоксиаденозина), FLAG&IDA (флударабина, цитарабина, филгастрима и идарубицина) (с или без последующего лечения G-CSF (гранулоцитарным колониестимулирующим фактором)), VAD (винкристина, доксорубицина и дексаметазона), M & P (мелфалана и преднизолона), С (циклофосфида)-раз в неделю, ABCM (адриамицина, блеомицина, циклофосфида и митомицина-С), MOPP (мехлорэтамину, винкристину, преднизону и прокарбазину) и DHAP (дексаметазону, цитарабину и цисплатину). Предпочтительной химиотерапевтической схемой является CHOP.

Таким образом, в еще одном аспекте раскрытие относится к способу лечения злокачественного новообразования, в частности, злокачественного новообразования, опухолевые клетки которого экспрессируют рецептор CCR7, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в указанном лечении, терапевтически эффективного количества антитела по изобретению, т.е. антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с рецептором CCR7, или фармацевтической композицией по изобретению. В конкретном варианте осуществления указанное злокачественное новообразование представляет злокачественное новообразование, которое характеризуется опухолевыми клетками, экспрессирующими рецептор CCR7. Иллюстративные неограничивающие примеры злокачественных новообразований, подлежащих лечению по изобретению, включают CLL, MCL, фолликулярную лимфому, крупноклеточную В-клеточную лимфому, СПИД-ассоциированную лимфому, лимфоплазмочитарную лимфому, лимфому Беркитта, В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, болезнь Ходжкина, Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых, фунгоидный микоз, бластный криз при хронических миелопролиферативных синдромах, бластный криз при миелодиспластических синдромах, рак молочной железы, немелкоклеточный рак легкого, меланому, рак желудка или плоскоклеточную карциному головы и шеи, и карциному толстой кишки. В предпочтительном варианте злокачественные новообразования, подлежащие лечению по изобретению, включают рак молочной железы, немелкоклеточный рак легкого, меланому, рак желудка или плоскоклеточную карциному головы и шеи, и толстой кишки. В наиболее предпочтительном варианте злокачественные новообразования, подлежащие лечению по изобретению, включают фолликулярную лимфому, Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых, лимфому Беркитта, бластный криз при хронических миелопролиферативных синдромах и бластный криз при миелодиспластических синдромах. В еще более предпочтительном варианте осуществления злокачественные новообразования, подлежащие лечению по изобретению, включают CLL и MCL.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу *in vitro* для индукции гибели или индукции апоптоза опухолевых клеток, экспрессирующих рецептор CCR7, который включает контактирование указанных клеток с антителом по изобретению, т. е. с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которое связывается с рецептором CCR7. В конкретном варианте осуществления указанные опухолевые клетки представляют опухолевые клетки, экспрессирующие рецептор CCR7, такие как клетки CLL и MCL.

Антитело, которое "ингибирует рост опухолевых клеток, экспрессирующих полипептид CCR7" или "ингибирующее рост" антитело, представляет антитело, которое приводит к измеримому ингибированию роста злокачественных клеток, экспрессирующих или сверхэкспрессирующих соответствующий полипептид. Полипептид CCR7 представляет трансмембранный полипептид, экспрессируемый на поверхности злокачественной клетки. Предпочтительные ингибирующие рост анти-CCR7-антитела ингибируют рост опухолевых клеток, экспрессирующих CCR7, более чем на 20%, предпочтительно примерно от 20% до примерно 50%, и еще более предпочтительно более чем на 50% (например, примерно от 50% до примерно 100%) по сравнению с соответствующим контролем, где контроль обычно представляет опухолевые клетки, не обработанные тестируемым антителом. В одном варианте осуществления ингибирование роста может быть измерено при концентрации антитела примерно от 0,1 до примерно 30 мг/мл или примерно от 0,5 до 200 нМ в культуре клеток, где ингибирование роста определяют через 1-10 суток после воздействия антитела на опухолевые клетки. Ингибирование роста опухолевых клеток *in vivo* можно оценить различными методами, такими как описаны в EP2474557B1 для опухолевых клеток, экспрессирующих CCR7. Антитело является ингибирующим рост *in vivo*, если введение анти-CCR7-антитела в дозе примерно от 1 мг/кг до примерно 100 мг/кг массы тела приводит к уменьшению размера опухоли или пролиферации опухолевых клеток в течение примерно от 5 суток до 3 месяцев после первого введения антитела, предпочтительно в течение примерно от 5 до 30 суток.

Антитело, которое "индуцирует апоптоз", представляет собой антитело, которое индуцирует программируемую гибель клеток, определяемую по связыванию аннексина V, фрагментации ДНК, сморщи-

ванию клеток, увеличению объема эндоплазматического ретикулума, фрагментации клеток и/или образованию мембранных везикул (называемых апоптотическими тельцами). Клетка обычно является клеткой, которая сверхэкспрессирует полипептид CCR7. Предпочтительно клетка представляет собой опухолевую клетку, например гемопозитическую клетку, такую как В-клетка, Т-клетка, базофил, эозинофил, нейтрофил, моноцит, тромбоцит или эритроцит. Существуют различные методы оценки клеточных событий, связанных с апоптозом. Например, транслокацию фосфатидилсерина (PS) можно измерить путем связывания аннексина; фрагментацию ДНК можно оценить с помощью электрофоретического разделения ДНК; и конденсацию ядра/хроматина наряду с фрагментацией ДНК можно оценить по увеличению количества гиподиплоидных клеток. Предпочтительно, антитело, которое индуцирует апоптоз, представляет собой антитело, которое увеличивает индукцию связывания аннексина относительно необработанной клетки в анализе связывания аннексина примерно в 2-50 раз, предпочтительно примерно в 5-50 раз и наиболее предпочтительно примерно в 10-50 раз.

Антитело, которое "индуцирует гибель клеток", представляет антитело, которое приводит к тому, что жизнеспособная клетка становится нежизнеспособной. Клетка представляет клетку, которая экспрессирует полипептид CCR7 и относится к клеточному типу, который специфически экспрессирует или сверхэкспрессирует полипептид CCR7. Клетка может представлять злокачественную или нормальную клетку определенного типа клеток. Полипептид CCR7 представляет трансмембранный полипептид, экспрессируемый на поверхности злокачественной клетки, или может представлять полипептид, который продуцируется и секретируется злокачественной клеткой. Клетка может быть злокачественной клеткой, например, В-клеткой или Т-клеткой. Для того чтобы дифференцировать гибель клеток, индуцированную антителозависимой клеточно-опосредуемой цитотоксичностью (ADCC) или комплементзависимой цитотоксичностью (CDC), такая гибель клеток может быть определена *in vitro* в отсутствие комплемента и иммунных эффекторных клеток. Таким образом, анализ гибели клеток может быть выполнен с использованием инактивированной нагреванием сыворотки (т. е. в отсутствие комплемента) и в отсутствие иммунных эффекторных клеток. Для того, чтобы определить, способно ли антитело индуцировать гибель клеток, потерю целостности мембраны можно оценить путем поглощения иодида пропидия (PI), трипанового синего (см. Moore et al., *Cytotechnology*, 17: 1-11 (1995)) или 7AAD по сравнению с необработанными клетками. Предпочтительными антителами, индуцирующими гибель клеток, являются антитела, которые индуцируют поглощение PI в анализе поглощения PI в клетках BT474.

Ранее упоминалась информация об опухолевых клетках, экспрессирующих рецептор CCR7, чувствительных к лечению способами по изобретению, антителами, схемами введения и дозами. В конкретном варианте осуществления опухолевые клетки, экспрессирующие рецептор CCR7, чувствительные к лечению вышеуказанными способами, представляют собой клетки CLL или MCL.

Во всех случаях выражение "терапевтически эффективное количество" означает количество, эффективное в лечении рака, как определено ранее; указанное количество может представлять количество, достаточное для осуществления желаемого ответа, или для ослабления симптома или признака, например, метастазирования или прогрессирования первичной опухоли, ее размера или роста. Терапевтически эффективное количество для конкретного субъекта может варьироваться в зависимости от таких факторов, как заболевание, подлежащее лечению, общее состояние здоровья, способ, путь и доза введения, и тяжесть проявления побочных эффектов. Предпочтительно, эффект будет приводить к изменению в количественном определении, по меньшей мере, примерно на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, 30%, 50%, 70% или даже на 90% или более. Когда используется комбинация, то терапевтически эффективное количество находится в соотношении к комбинации компонентов, и эффект не ограничивается только отдельными компонентами. Терапевтически эффективное количество будет изменять симптомы заболевания обычно по меньшей мере на 10%; обычно, по меньшей мере, примерно на 20%; предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 30%; или более предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 50%. Альтернативно, изменение миграции будет означать, что воздействие приходится на миграцию или движение различных типов клеток. Это приведет, например, к статистически значимым и поддающимся количественной оценке изменениям числа клеток, подвергшихся воздействию. Это может представлять снижение числа привлеченных клеток-мишеней в течение периода времени или в области-мишени. Также можно контролировать скорость прогрессирования первичной опухоли, ее размер, распространение или рост.

Анти-CCR7-антитела и композиции по изобретению, содержащие такие антитела, также могут использоваться для лечения воспалительных состояний и расстройств, и осложнений, возникающих в результате трансплантации тканей или органов.

Активность CCR7 связана с воспалительными заболеваниями кишечника (IBD), такими как болезнь Крона и язвенный колит. Болезнь Крона представляет хроническое и истощающее воспалительное заболевание кишечника, которое, как полагают, отражает чрезмерно активный ТН1-опосредованный иммунный ответ на флору кишечника. Патологические очаги при болезни Крона могут появиться повсеместно в кишечнике, и иногда и в других отделах желудочно-кишечного тракта. С другой стороны, очаги язвенного колита, обычно появляются в ободочной кишке. Характер повреждений также различен, но заболевания достаточно сходны, что иногда бывает трудно различить их клинически. См., например, патент

США № 6558661. Антитела и композиции, описанные здесь, можно использовать для лечения пациентов с IBD и/или ослабления, предупреждения или элиминации одного или более симптомов или осложнений IBD.

Ингибирование активности CCR7 связано с отторжением трансплантатов тканей или органов (Lo et al., 25 2011, *Transplantation*, 91: 70-77, Liu et al., 2011, *Eur. J. Immunol.*, 41: 611-23, Yuling et al., *Am. J. Transplant.*, 8: 1401-12). Антитела и композиции, описанные здесь, можно использовать для лечения реципиентов трансплантатов тканей или органов, например, реципиентов почки, сердца, кожи или легких, и/или ослабления, предупреждения или элиминации одного или более осложнений при операции по поводу трансплантации.

Активность CCR7 связана с астмой, аллергическим воспалением дыхательных путей, гиперплазией гладкой мускулатуры дыхательных путей и фиброзными заболеваниями легких (Gomperts et al., 2007, *J. Leukoc. Biol.*, 82: 449-56, Kawakami et al., 2012, *Cell Immunol.*, 2575: 24-32; Saunders et al., 2009, *Clin. Exp. Allergy*, 39: 1684-92). Антитела и композиции, описанные здесь, можно использовать для лечения пациентов с астмой, аллергическим воспалением дыхательных путей, гиперплазией гладкой мускулатуры дыхательных путей или фиброзными заболеваниями легких и/или для ослабления, предупреждения или элиминации одного или более симптомов или осложнений этих заболеваний.

Активность CCR7 связана с ревматоидным артритом (Moschovakis et al., 2012, *Eur. J. Immunol.*, 42: 1949-55). Антитела и композиции, описанные здесь, можно использовать для лечения пациентов с ревматоидным артритом и/или для ослабления, предупреждения или элиминации одного или более симптомов или осложнений ревматоидного артрита.

Активность CCR7 связана с рассеянным склерозом (Aung et al., 2010, *J. Neuroimmunol.*, 226: 158-64). Антитела и композиции, описанные здесь, можно использовать для лечения пациентов с рассеянным склерозом и/или для ослабления, предупреждения или элиминации одного или более симптомов или осложнений рассеянного склероза.

Активность CCR7 связана с псориазом (Fan et al., 2008, *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, 74 (5): 550; Bose et al., 2013, *Am. J. Pathol.*, 183 (2) : 413-421). Антитела и композиции, описанные здесь, можно использовать для лечения пациентов с псориазом и/или для ослабления, предупреждения или элиминации одного или более симптомов или осложнений псориаза.

Активность CCR7 связана с атеросклерозом (Luchtefeld et al., 2010, *Circulation*, 10 122: 1621-28). Антитела и композиции, описанные здесь, можно использовать для лечения пациентов с атеросклерозом и/или для ослабления, предупреждения или элиминации одного или более симптомов или осложнений атеросклероза.

Активность CCR7 связана с ВИЧ-инфекцией (Evans et al., 2012, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 23: 151-57). Антитела и композиции, описанные здесь, можно использовать для лечения пациентов, инфицированных ВИЧ, включая пациентов, страдающих СПИДом, или пациентов с риском заражения ВИЧ или развития СПИДа, и/или для ослабления, предупреждения или элиминации одного или более симптомов или осложнений ВИЧ или СПИД.

Анти-CCR7-антитела по изобретению и композиции, содержащие такие антитела, также можно использовать для лечения фиброза, предпочтительно фиброза ткани. Примером фиброза ткани является фиброз, выбранный из группы, состоящей из фиброза печени, фиброза почек, фиброза легких, фиброза кожи, фиброза органов сердечно-сосудистой системы, фиброза органов желудочно-кишечного тракта и других фиброзных заболеваний. Примером фиброза печени является фиброз печени, выбранный из группы, состоящей из цирроза печени, ишемической реперфузии, расстройства после пересадки печени, некротического гепатита, гепатита В, гепатита С, первичного билиарного цирроза и первичного склерозирующего холангита. В отношении цирроза печени, то по меньшей мере один цирроз, выбран из группы, состоящей из цирроза, индуцированного алкоголем, индуцированного лекарственным препаратом и индуцированного химической индукцией. Пример фиброза почек включает фиброз почек, выбранный из группы, состоящей из пролиферативного гломерулонефрита, склеротического гломерулонефрита, нефрогенной фиброзирующей дерматопии, диабетической нефропатии, интерстициального фиброза почечных канальцев и фокально-сегментарного гломерулосклероза. Пример легочного фиброза включает фиброз легких, выбранный из группы, состоящей из интерстициального фиброза легких, саркоидоза, индуцированного лекарственными препаратами, легочного фиброза, идиопатического легочного фиброза, астмы, хронической обструктивной болезни легких, диффузного пульмонарного альвеолярного повреждения, легочной гипертензии и бронхолегочной дисплазии новорожденных. Пример фиброза кожи включает фиброз кожи, выбранный из группы, состоящей из склеродермии, келоидного рубца, псориаза, гипертрофического рубцевания и псевдосклеродермии. Пример фиброза органов сердечно-сосудистой системы включает сердечно-сосудистый фиброз, выбранный из группы, состоящей из атеросклероза, рестеноза коронарного стента, застойной кардиомиопатии, сердечной недостаточности, трансплантации сердца и фиброза миокарда. Пример фиброза органов желудочно-кишечного тракта включает желудочно-кишечный фиброз, выбранный из группы, состоящей из коллагенового колита, атрофии ворсинок, гиперплазии крипт, образования полипов, фиброза при болезни Крона, заживления язвы желудка и рубца после операции по поводу абдоминальной адгезии. Фиброз может представлять состояние, связанное с

фиброзирующим заболеванием костей и может быть ревматоидным паннусом.

Любой из вышеуказанных терапевтических способов, описанных выше, может быть применен для любого субъекта, нуждающегося в такой терапии, включая, например, млекопитающих, предпочтительно приматов и наиболее предпочтительно людей.

В данном документе и в формуле изобретения глагол "содержать" и его сопряжения используются в его неограничивающем смысле для обозначения того, что объекты, следующие за словом, включаются, но объекты, не упомянутые конкретно, не исключаются. Кроме того, обращение к элементу с неопределенным артиклем "a" или "an" не исключает возможности того, что присутствует более чем один элемент, если только контекст явно не требует того, что присутствует один и только один из элементов. Таким образом, неопределенный артикль "a" или "an" обычно означает "по меньшей мере один".

Все патентные и литературные ссылки, приведенные в настоящем описании, включены посредством ссылки во всей их полноте.

Следующие примеры предлагаются только в иллюстративных целях и никоим образом не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

#### Краткое описание фигур

Фиг. 1. Эпитопное картирование (a) мышиного mAb 729 и (b) гуманизованного mAb 650 (гуманизованная версия mAb 729). Оба антитела распознают один и тот же линейный эпитоп, расположенный на N-конце человеческого CCR7 (Z=сульфатированный Тут).

Фиг. 2. Агонистический эффект связывания лиганда (a: CCL19; b: CCL21) на миграцию клеток Т-клеточной лимфомы человека ингибируется мышинным анти-CCR7 mAb 730 (IC<sub>50</sub>: 15 нМ и 6 нМ соответственно).

Фиг. 3. Тестируемые в анализе CDC, нормальные наивные человеческие Т-клетки не гибнут в результате обработки mAb 729-2A против человеческого CCR7 (треугольники), ритуксаном (RTX, прямоугольники), кэмпасом (CAMP, кружки). IgG2A (ромбы) был включен в качестве отрицательного контроля.

Фиг. 4. Анализ CDC. CD20-рефрактерные опухолевые клетки от пациента с CLL гибнут под действием мышинного mAb729-2A против человеческого CCR7 (729-2A, треугольники), но не под действием IgG2A, использованного в качестве отрицательного контроля (ромбы).

Фиг. 5. Гуманизованные анти-CCR7 mAbs (1\*1=HC1 LC1, 2\*1=HC2 LC1 и 3. 1=HC3 LC1) и химерное mAb против человеческого CCR7 (Fab мыши/Fc человека, 0\*0=HC0 LC0), индуцировали лизис лейкозных лимфоцитов. Положительный контроль: mAbs алектумаб (ALEM) и ритуксан (RTX) и отрицательный контроль: IGG1. Анализ ADCC (n=2) выполнялся с эффекторными клетками/клетками-мишенями (CLL-клетки) в соотношении 5:1 (светло-серые колонки) и 10:1 (темно-серые колонки).

Фиг. 6. Ингибирование интернализации рецептора CCR7, индуцированной CCL19, гуманизованным анти-CCR7 mAb 650, как определено анализом активной интернализации (PathHunter™, DiscoverX, Fremont, CA, США). Концентрация mAb 650 (мкг/мл) нанесена на ось x против ингибирования интернализации CCR7, индуцированной CCL19 (% ингибирования) на оси y.

Фиг. 7. Ингибирование CCL19-индуцированной CCR7-зависимой внутриклеточной передачи сигнала на пути β-аррестина, гуманизованным анти-CCR7 mAb 650, как определено известным анализом рекрутмента β-аррестина (PathHunter™, DiscoverX, Fremont, CA, USA). Концентрация mAb 650 (мкг/мл) нанесена на ось x против ингибирования CCL19-индуцированного рекрутмента β-аррестина (% ингибирования) на оси y.

Фиг. 8. Ингибирование CCL19-индуцированной CCR7-зависимой внутриклеточной передачи сигнала сAMP, гуманизованным анти-CCR7 mAb 650, как определено с использованием известного теста под названием путь вторичного мессенджера сAMP (PathHunter™, DiscoverX, Fremont, CA, USA). Концентрация mAb 650 (мкг/мл) нанесена на ось x против ингибирования CCL19-индуцированного CCR7 пути вторичного мессенджера сAMP (% ингибирования) на оси y.

#### Примеры

##### 1. Получение мышинных анти-CCR7 mAbs.

Обычных мышей (т.е. мышей с мышинной иммунной системой) иммунизировали антигенами, содержащими или экспрессирующими аминокислотные последовательности из N-концевого внеклеточного домена CCR7 человека. Мышинные моноклональные антитела получали с использованием стандартной гибридомной технологии.

Первоначальные попытки использовать антигены без сульфатирования в положении Y<sub>41</sub> N-концевого домена CCR7 давали антитела, которые не могли нейтрализовать CCL19- или CCL21-зависимую передачу сигнала CCR7. Иммунизация антигенами, содержащими сульфатированный Y<sub>41</sub>, давала ряд мышинных моноклональных антител, которые были способны нейтрализовать CCL19- или CCL21-зависимую передачу сигнала CCR7. Для восьми отобранных мышинных моноклональных антител против человеческого CCR7 были определены последовательности. Аминокислотные последовательности гипервариабельных участков этих восьми моноклональных антител приведены в табл.1.

Аминокислотная последовательность вариабельных областей тяжелой и легкой цепей мышинного

антитела 729 показана в SEQ ID NO: 1 и 2 соответственно.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности гипервариабельных участков восьми отобранных мышинных моноклональных антител против человеческого CCR7

Антитело	Аминокислотная последовательность HVR-H1	SEQ ID NO
726	GFTFSDYA	3
727	GFAFSSYA	4
728	GFAFSNYA	5
729	GLTFRDFA	6
730	GFPFSNYA	7
731	GFTFTDYA	8
734	GFTFSNYA	9
737	GFTFSSYA	10
Антитело	Аминокислотная последовательность HVR-H2	SEQ ID NO
726	ISDGGSHТ	11
727	ISDGGTYP	12
728	ISDGGTYP	12
729	ISSGGFYТ	13
730	ISSGGSYТ	14
731	ISDRGSFT	15
734	ISSGGSHТ	16
737	ISSGGSYТ	14
Антитело	Аминокислотная последовательность HVR-H3	SEQ ID NO
726	GRRAGRYD---ERDAMDY	17
727	TRRAYRYD---VKNSMDY	18
728	TRRAYRYD---VKNSMDY	18
729	VRRAYRYDGTGDYSALDY	19
730	ARREYRY----AENAMDY	20
731	TRRAYRYD---GDNAMDY	21
734	ARRAYRYD---EDSAMDS	22
737	ARATTVV-----GTDFDY	23
Антитело	Аминокислотная последовательность HVR-L1	SEQ ID NO
726	SSVSSSY	24
727	QDIGDN	25
728	QDIGNN	26
729	QDIGPS	27
730	QDIGDN	24
731	QDIGGS	28
734	QSLLDSDGKTY	29
737	QDIGSS	30
Антитело	Аминокислотная последовательность HVR-L2	SEQ ID NO
726	SIS	32
727	ATS	31
728	ATS	31
729	ATS	31
730	ATS	31
731	ATS	31
734	LVS	33
737	ATS	31
Антитело	Аминокислотная последовательность HVR-L3	SEQ ID NO
726	QQWSSNPPT	34
727	LQYASSPLT	35
728	LQYASSPLT	35
729	LQFASSPLT	36
730	LQYASSPLT	35
731	LQYANSPLT	37
734	WQGTTFPQT	38
737	LQYASSPPT	39

## 2. Оценка мышинных анти-CCR7 mAbs.

### 2.1. Эпитопное картирование.

Эпитопное картирование моноклональных антител (фиг. 1) выполняли согласно ранее опубликованным протоколам (Slootstra et al., 1996, Mol. Divers, 1: 87-96; Timmerman et al., 2007, J. Mol. Recognit., 20: 283-99). Вкратце: связывание антитела с каждым пептидом тестировали ELISA на основе PEPSCAN. Пептидные микрочипы инкубировали с раствором первичного антитела, например, состоящего из 1 мг/мл, разведенного в блокирующем растворе (4% лошадиной сыворотки, 5% овальбумина (мас./об.) в PBS/1% Твина). После отмывки пептиды инкубировали с 1000-кратным разведением конъюгата антитела с пероксидазой в течение 1 ч при 25°C. После отмывки добавляли раствор субстрата пероксидазы (0,5 мг/мл 2,2'-азино-ди-3-этилбензтиазолинсульфоната (ABTS) и 0,006% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 0,05 М цитратном буфере с

pH 4). После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре измеряли развитие окраски. Развитие окраски определяли количественно с помощью прибора с зарядовой связью (CCD) - камеры и системы обработки изображений.

2.2. Анти-CCR7 mAbs ингибируют CCR7-зависимую внутриклеточную передачу сигнала.

Полученные моноклональные анти-CCR7-антитела (табл. 2) ингибируют CCK19- и CCL21-опосредованную внутриклеточную передачу сигнала в клетках яичника китайского хомячка (CHO), сверхэкспрессирующих человеческий CCR7, как определено с использованием известного стандартного анализа рекрутмента  $\beta$ -аррестина (PathHunter™, DiscoverX, Fremont, CA, USA; Southern et al., 2013, J. Biomol. Screen., 18 (5): 599-609).

Таблица 2. Ингибирование CCL19- и CCL21-опосредованной внутриклеточной передачи сигнала в клетках яичника китайского хомячка (CHO), сверхэкспрессирующих человеческий CCR7, как определено с использованием анализа рекрутмента  $\beta$ -аррестина

Mab	IC <sub>50</sub> $\beta$ -аррестина (нМ)	
	CCL19	CCL21
mAb 726	482	166
mAb 727	30	11
mAb 728	37	27
mAb 729	43	16
mAb 730	23	11
mAb 731	38	15
mAb 732	131	29
mAb 733	599	60
mAb 734	88	31
mAb 735	113	17

2.3. Анти-CCR/ mAb ингибирует миграцию клеток.

Мышиное mAb 730 ингибирует миграцию (хемотаксис) клеток Т-клеточной лимфомы человека, эндогенно экспрессирующих рецептор CCR7 человека, индуцированную лигандами CCL19 и CCL21, со значением IC<sub>50</sub> 15 нМ и 6 нМ соответственно (фиг. 2).

Анализ клеточной миграции проводили с использованием двойных камер Transwell со вставками с размером пор 8 мкм (Costar, Cambridge, MA, США). Нижняя камера содержала лиганд (CCL19 или CCL21), разведенный в среде HamF12, с добавлением 0,5% BSA. Экспрессирующие эндогенный CCR7 клетки (Т-клеточная лимфома (HuT-78)), предварительно инкубированные с моноклональными антителами против CCR7, помещали во вставку и собранную камеру инкубировали при 37°C. Количество мигрировавших через мембрану клеток в нижней камере определяли после лизиса клеток, окрашиванием ДНК (раствор красителя CyQuant GR, Life Technologies Ltd, Великобритания).

2.4. Анти-CCR7 mAb блокирует передачу сигнала CCR7 без агонистических эффектов.

При тестировании в высоких концентрациях (267 нМ) ни одно из мышиных моноклональных антител, связывающих человеческий CCR7, приведенных в табл. 2 выше, включая mAb 729 и 730, не индуцировало детектируемые внутриклеточные агонистические эффекты в клетках яичника китайского хомячка (CHO), сверхэкспрессирующих человеческий CCR7, как определено с использованием известного стандартного анализа рекрутмента  $\beta$ -аррестина (PathHunter™, DiscoverX, Fremont, CA, USA, Southern et al., 2013, J. Biomol. Screen., 18 (5): 599-609) (данные не представлены). IgG2a использовали в качестве отрицательного контроля, и CCL21, естественный лиганд для CCR7, использовали в качестве положительного контроля.

2.5. Анализ аффинности.

2.5.1. Анализ аффинности с использованием Вiasoge Аффинность идентифицированных моноклональных антител определяли анализом Вiasoge в стандартных условиях. Моноклональное антитело иммобилизовали на соответствующей сенсорной поверхности и пропускали раствор сульфатированного антигена SYM1899 ((пиро Glu) DEVTDDZIGDNTTVDZTLFESLCSK KDVRNK; SEQ ID NO: 76); где Z обозначает сульфатированный тирозин), содержащего остатки 19-49, полученные из N-конца человеческого CCR7, через сенсорную поверхность. Полученное значение аффинности (Kd) мышиного mAb 729 для SYM1899 составляло 0,7 нМ.

2.5.2. Анализ аффинности проточной цитометрией.

Клетки CHO, экспрессирующие человеческий CCR7 (10<sup>6</sup> клеток/мл), предварительно инкубировали при 4°C в течение 24 ч с мышиными mAb 726-735 в серии 3-кратных разведений (диапазон 20 нМ-0,11 пМ). Количество связанного антитела определяли окрашиванием вторичным мышь-специфическим антителом, меченным фикоэритрином (PE), и последующим детектированием проточной цитометрией. Значения EC<sub>50</sub> (табл. 3, были определены на плато сигмоидных кривых связывания при 50% минимальных и максимальных значениях).

Таблица 3. Показатели аффинности ( $EC_{50}$ ) мышиных mAbs против человеческого CCR7 для клеток СНО, экспрессирующих hCCR7, по данным проточной цитометрии

mAb	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735
$EC_{50}$ (нМ)	13,9	4,2	7,0	2,4	5,1	4,6	4,3	3,8	4,6	3,9

2.6. Анти-CCR7 mAb не токсично для нормальных клеток.

В анализе CDC нормальные naive человеческие Т-клетки (фиг. 3) хорошо переносят обработку моноклональным антителом mAb 729-2A против CCR7 в эффективных концентрациях (диапазон 33-0,5 нМ). Анализ CDC проводили, как описано Cuesta-Mateos et al. (2015, Cancer Immunol Immunother. DOI: 10.1007/s00262-015-1670-z).

2.7. Анти-CCR7 mAb приводит к гибели рефрактерных к CD20 опухолевых клеток от пациента с CLL.

Рефрактерные к CD20 опухолевые В-клетки от пациента с CLL, не отвечающего на лечение цито-статиками и моноклональными анти-CD20-антителами, и считающегося резистентным к терапии анти-CD20-антителами, эффективно погибали в анализе комплементзависимой цитотоксичности (CDC), под действием mAb729-2A ( $IC_{50}$  0,15 нМ) (фиг. 4). Анализ CDC проводили, как описано Cuesta-Mateos et al. (2015, см. выше).

3. Гуманизация.

3.1. Дизайн и конструирование гуманизованных Abs.

Для гуманизации отбирали мышиное моноклональное антитело MAb 729 против человеческого CCR7. Используя системы нумерации по IMGT и Kabat для антител, идентифицировали CDR в mAb 729 (см. таблицу 1 выше). С помощью этих двух систем нумерации идентифицировали различные остатки в мышином антителе как относящиеся к CDR, и объединенную CDR-последовательность по IMGT/Kabat использовали для оптимального сохранения конформации CDR-петли. Код для гуманизованных вариантов мышиного mAb 729, как здесь используется, представляет mAb 650.

Для мышиной тяжелой цепи наиболее близкой V-областью гена зародышевой линии человека является Homo sapiens IGHV3-21 (SEQ ID NO: 73). Для мышиной легкой цепи самая близкая V-область гена зародышевой линии человека представляет Homo sapiens IGKV1-39 (SEQ ID NO: 74).

Для гуманизации тяжелой цепи, провели поиск в базах данных последовательностей IgG человека для сравнения с мышиной областью VH с использованием алгоритмов поиска BLAST, и выбрали человеческие переменные области-кандидаты из 200 лучших результатов BLAST. Они были сведены к трем кандидатам на основе комбинации гомологии каркасной области, сохранения ключевых каркасных остатков и структуры канонической петли, соответственно CAG17616 (SEQ ID NO: 67), AAL67510 (SEQ ID NO: 68) и ACS96226 (SEQ ID NO: 69). С использованием CDR VH мышиного антитела MAb 729 против человеческого CCR7, пересаженных на эти акцепторные каркасы, они становились гуманизованными вариантами VH1, VH2 и VH3 с аминокислотными последовательностями гуманизованных переменных областей тяжелой цепи, показанных в SEQ ID NO: 61, 62 и 63 соответственно. В табл.4 приведены аминокислотные последовательности каркасных областей в трех гуманизованных переменных областях тяжелой цепи согласно нумерации IMGT.

Таблица 4. Аминокислотные последовательности каркасных областей тяжелой цепи в трех гуманизованных переменных областях тяжелой цепи согласно нумерации IMGT

Ab	FR	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
VH1	1	EVQLLES GGGFVKPGGSLKLS CVVS	40
VH1	2	MSWVRQTPEKRLVWVAT	43
VH1	3	YYPDSVKGRFTISRDNVRN ILYLQMSLRSEDTAVYYC	45
VH1	4	WGTGTTVTVSS	48
VH2	1	EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAAP	41
VH2	2	MNWVRQAPGKGLEWVST	44
VH2	3	YYPDSVKGRFTISRDN AANSLYLQMSLR AEDTAVYYC	46
VH2	4	WQGTLVTVSS	49
VH3	1	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLS CAVS	42
VH3	2	MNWVRQAPGKGLEWVST	44
VH3	3	YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLR AEDTASYC	47
VH3	4	WQGTLVTVSS	49

Для гуманизации легкой цепи проводили поиск в базах данных последовательностей IgG человека для сравнения с мышиной областью VL, используя алгоритмы поиска BLAST, и выбрали человеческие переменные области-кандидаты из 200 лучших результатов BLAST. Они были сведены к трем кандидатам на основе комбинации гомологии каркасной области, сохранения ключевых каркасных остатков и структуры канонической петли, соответственно ABI74066 (SEQ ID NO: 70), ABA26122 (SEQ ID NO: 71) и ABU90 653 (SEQ ID NO: 72). С использованием CDR VH мышиного антитела MAb 729 против человеческого CCR7, пересаженных на эти акцепторные каркасы, они становились гуманизованными вариантами VK1, VK2 и VK3 с аминокислотными последовательностями гуманизованных переменных

областей тяжелой цепи SEQ ID NO: 64, 65 и 66 соответственно. В табл.5 приведены аминокислотные последовательности каркасных областей в трех гуманизированных вариабельных областях легкой цепи согласно нумерации IMGT.

Таблица 5. Аминокислотные последовательности каркасных областей легкой цепи в трех гуманизированных вариабельных областях легкой цепи согласно нумерации IMGT

Ab	FR	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
VK1	1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRAS	50
VK1	2	LNWYQQKPGKAPKRLIY	52
VK1	3	NLDSGVPSRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYC	55
VK1	4	FGQGTKVEIK	58
VK2	1	EIVMTQSPSSLSASVGDRVITICRAS	51
VK2	2	LNWYQQKPGKAPKLLIY	53
VK2	3	NLDSGVPSRFSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYC	56
VK2	4	FGQGTKLEIK	59
VK3	1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRAS	50
VK3	2	LAWLQQKPGKAPKSLIY	54
VK3	3	NLDSGVPSRFSGSGSDTDFSLTISLQPEDFATYYC	57
VK3	4	FGQGTRLEIK	60

Исходный вариант VK3 содержал мотив N-связанного гликозилирования (NXS/T, где X представляет любую аминокислоту, кроме пролина). Данный мотив N-связанного гликозилирования удаляли путем замены остатка аспарагина в положении 72 на остаток серина. Аспарагин мутировали на серин, который является остатком в этом положении в мышиной VL. Некоторые человеческие антитела также содержат серин в этом положении. Помимо этого мотива N-связанного гликозилирования в варианте VK3, никаких других мотивов N-связанного гликозилирования не было обнаружено в последовательностях других гуманизированных вариантов.

#### 4. Оценка гуманизированных анти-CCR7 mAbs.

##### 4.1. Связывание с иммуногеном SYM1899.

Использовали ELISA для оценки связывания вариантов антитела 650 с иммуногеном SYM1899, сульфатированным пептидом, полученным из N-конца CCR7 человека (остатки 19-49; SEQ ID NO: 76). SYM1899 иммобилизовали из расчета 100 нг/лунку в 96-луночных планшетах Maxisorp в буфере для покрытия. Буфер для покрытия удаляли и добавляли 200 мкл/лунку блокирующего раствора (3% мас./об. полусухое обезжиренное молоко, PBS) и перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшет промывали шесть раз PBS-T (0,001% об./об. Твин 20). Варианты антитела 650 разводили до концентрации 1 мкг/мл PBS и готовили серийное разведение 1:1 в PBS до концентрации 0,0078 мкг/мл. Каждое разведение антител в трех повторностях вносили из расчета 100 мкл на лунку в планшет в дополнение к отрицательному контролю PBS и инкубировали 2 ч при комнатной температуре при перемешивании. Планшет промывали шесть раз PBS-T. Добавляли 100 мкл/лунку козьего античеловеческого антитела с HRP (Fc специфического) (1:60000 в PBS) и планшеты инкубировали в течение 1 ч, перемешивая при комнатной температуре. Планшет промывали шесть раз PBS-T и один раз PBS. Добавляли 100 мкл/лунку раствора субстрата ТМВ и инкубировали при 37°C в течение 10 мин. В каждую лунку добавляли 50 мкл 1 М HCl, и планшет сразу же анализировали при 450 нм на ридере для планшетов Biolise.

Таблица 6. Определение Kd для вариантов антитела 650, рассчитанных с использованием 4-параметрической логистической кривой

Вариант антитела 650	Kd (нМ)
HC0 LC0	2,14
HC1 LC1	1,78
HC1 LC2	3,29
HC1 LC3	>100
HC2 LC1	10,05
HC2 LC2	8,33
HC2 LC3	>100
HC3 LC1	4,404
HC3 LC2	3,05
HC3 LC3	>100

Гуманизация моноклонального антитела 650 была успешной с рядом идентифицированных потенциальных вариантов-кандидатов. Все три варианта антитела 650, включая вариант легкой цепи LC3, не связывались эффективно с SYM1899 и имели Kd выше 100.

Вариант HC1 LC1 имел лучшее значение Kd 1,78 и представлял единственную конструкцию, которая неожиданно связывалась с SYM1899 даже лучше, чем химерное антитело HC0 LC0 с Kd 2,14.

##### 4.2. Варианты антитела 650 1-1, 2-1 и 3-1 опосредуют ADCC в клетках CLL.

Три гуманизированных IgG1 mAbs против человеческого CCR7, содержащие один и тот же вариант легкой цепи (LC1, т.е. ТяжелаяЦепь\*ЛегкаяЦепь: 1\*1=HC1 LC1, 2\*1=HC2 LC1 и 3.1=HC3 LC1), и химерное mAb против человеческого CCR7 (Fab мыши/Fc человека: 0\*0=HC0 LC0) приводили к гибели 50-60% злокачественных Т-клеток от пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом, как определено

анализом антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (n=2) (фиг. 5). Алемтузумаб (ALEM) и ритуксан (RTX) использовали в качестве положительных контролей, и mAb IGG1 использовали в качестве отрицательного контроля. Анализ ADCC проводили, как описано Somovilla-Crespo et al. (2013, J. of Hematol.&Oncol., 6:89).

#### 4.3. Гуманизированное анти-CCR7 mAb 650 ингибирует интернализацию рецептора CCR7.

Антагонистическая активность анти-CCR7 mAb 650-H1L1 демонстрируется ингибированием индуцированной CCL19 интернализации рецептора CCR7 ( $IC_{50}$  0,4155 мкг/мл=2,8 нМ, тестированный диапазон: 267-0,014 нМ) (фиг. 6), как определено известным анализом активной интернализации (PathHunter™, DiscoverX, Fremont, CA, США), в основном как описано ниже.

Дизайн анализа активной интернализации: эндоцитоз GPCR.

Используя технологию EFC, компания DiscoverX разработала несколько методов для исследования интернализации рецепторов. Анализ интернализации с активированным GPCR PathHunter® обеспечивает количественное измерение интернализации GPCR, опосредованной аррестином, что позволяет контролировать перемещение немеченого, связанного с аррестином GPCR через плазматическую мембрану в живых клетках.

Для оценки антагониста клетки предварительно инкубировали с антагонистом с последующей индукцией агонистом в концентрации EC80. Проводили промежуточное разведение стоковых образцов для получения 5× образца в буфере для анализа. 5 мкл 5× образца добавляли к клеткам и инкубировали при 37°C или комнатной температуре в течение 30 мин. Концентрация растворителя составляла 1%. К клеткам добавляли 5 мкл агониста 6× в EC80 в буфере для анализа и инкубировали при 37°C или комнатной температуре в течение 90 или 180 мин (EA-аррестин/EA-эндосома) или 37°C в течение 16 ч (EA-мембрана).

Детектирование сигналов.

Сигналы в анализе генерировали путем однократного добавления 12,5 или 15 мкл (50% об./об.) смеси реагентов для детектирования PathHunter Detection, с последующей инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре. Микропланшеты анализировали после генерации сигналов с помощью прибора PerkinElmer Envision™ для детектирования хемилюминесцентных сигналов.

Данные анализа.

Активность соединений анализировали с использованием пакета для анализа данных CBIS (Chem-Innovation, CA). Для антагонистического режима анализа процентное ингибирование рассчитывали по следующей формуле: % ингибирование=100% × (1 - (среднее RLU испытуемого образца - среднее RLU контрольного растворителя)/(среднее RLU контроля в EC80 - среднее RLU контрольного растворителя)).

#### 4.3. Гуманизированное анти-CCR7 mAb 650 ингибирует CCR7-зависимую внутриклеточную передачу сигнала пути β-аррестина.

Индукцированная CCL19 внутриклеточная передача сигнала CCR7 эффективно ингибируется mAb 650-H1L1, гуманизированным вариантом мышиноного mAb 729 ( $IC_{50}$  9,5622 мкг/мл=63,7 нМ, тестированный диапазон 267-0,014 нМ) (фиг. 7), как определено известным анализом рекрутмента β-аррестина (PathHunter™, DiscoverX, Fremont, CA, США), в основном как описано ниже.

Путь аррестина.

В анализе β-аррестина Path-Hunter® контролируется активация GPCR в гомогенном, без изображения формате анализа, с использованием технологии, разработанной DiscoverX под названием комплекментация фрагментов фермента (EFC) с β-галактозидазой (β-Gal) в качестве функционального репортера.

Дизайн анализа.

Формат модуляции антагонистом: для оценки антагониста клетки предварительно инкубировали с антагонистом с последующей индукцией агонистом в концентрации EC80. Промежуточное разведение стоковых образцов проводили для получения 5× образца в буфере для анализа. 5 мкл 5× образца добавляли к клеткам и инкубировали при 37°C или комнатной температуре в течение 30 мин. Концентрация растворителя составляла 1%. К клеткам добавляли 5 мкл агониста 6× в EC80 в буфере для анализа и инкубировали при 37°C или комнатной температуре в течение 90 или 180 мин.

Детектирование сигналов.

Сигналы в анализе генерировали путем однократного добавления 12,5 или 15 мкл (50% об./об.) смеси реагентов для детектирования PathHunter Detection, с последующей инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре. Микропланшеты анализировали после генерации сигналов с помощью прибора PerkinElmer Envision™ для детектирования хемилюминесцентных сигналов.

Данные анализа.

Активность соединений анализировали с использованием пакета для анализа данных CBIS (Chem-Innovation, CA). Для анализа антагонистического режима процентное ингибирование рассчитывали по следующей формуле: % ингибирование=100% × (1 - (среднее RLU испытуемого образца - среднее RLU контрольного растворителя)/(среднее RLU контроля в EC80 - среднее RLU контрольного растворителя)).

#### 4.4. Гуманизированное анти-CCR7 mAb 650 ингибирует CCR7-зависимую внутриклеточную передачу сигнала cAMP.

mAb 650-H1L1 ингибирует CCL19-индуцированную CCR7-зависимую внутриклеточную передачу сигнала cAMP ( $IC_{50}$  1,609 мкг/мл=10,7 нМ, тестированный диапазон 267-0,014 нМ) (фиг. 8), как определено с помощью теста под названием путь вторичного мессенджера cAMP (PathHunter™, DiscoverX, Fremont, CA, США), в основном как описано ниже.

Путь вторичного мессенджера cAMP.

Компания DiscoverX разработала панель клеточных линий, стабильно экспрессирующих немеченые GPCR, которые эндогенно передают сигнал через cAMP. С помощью анализа Hit Hunter® cAMP контролируется активация GPCR через сигнальный путь вторичного мессенджера Gi и Gs в гомогенном, без изображений формате анализа, используя технологию, разработанную DiscoverX, под названием комплементация фрагментов фермента (EFC) с β-галактозидазой (β-Gal) в качестве функциональной конечной точки.

Дизайн анализа: модуляция cAMP GPCR.

Формат с обратным агонистом.

Для оценки обратного агониста клетки предварительно инкубировали с образцом в присутствии форсколина в EC20. Среду аспирировали из клеток и заменяли на 15 мкл реагента 2:1 HBSS/10 mM HEPES:cAMP XS+ Ab. Проводили промежуточное разведение стоковых образцов для получения 4× образца в буфере для анализа, содержащем форсколин в 4× EC20. 4,5 мкл 4× образца добавляли к клеткам и инкубировали при 37°C или комнатной температуре в течение 30 или 60 мин. Конечная концентрация растворителя в анализе составляла 1%.

Детектирование сигналов.

После соответствующей инкубации соединения генерировали сигналы анализа инкубацией с 20 мкл смеси для лизиса cAMP XS+ ED/CL в течение 1 ч с последующей инкубацией с 20 мкл реагента cAMP XS+ EA в течение 3 ч при комнатной температуре. Микропланшеты анализировали после генерации сигналов с помощью прибора PerkinElmer Envision™ для детектирования хемилюминесцентных сигналов.

Анализ данных.

Активность соединений анализировали с использованием пакета для анализа данных CBIS (Chem-Innovation, CA). Для анализов с использованием режима обратного агониста Gi процентную активность рассчитывали по следующей формуле: % активность обратного агониста=100% × ((среднее значение RLU испытуемого образца - среднее RLU форсколина в EC20)/(среднее значение RLU положительного контроля форсколина - среднее RLU контроля в EC20)).

5. Переключение аллотипов и Fc-мутанты гуманизированных анти-CCR7-антител с повышенной CDC.

5.1. Дизайн получения мутантов с переключенным аллотипом и повышенной CDC

Исходный аллотип гуманизированных вариантов анти-CCR7 mAb 650 1-1, 2-1 и 3-1 (см. код выше в п.4.2) не проявлял достаточно сильной эффекторной функции CDC. Следовательно, аллотип трех вариантов 1-1, 2-1 и 3-1 переключали на аллотип человека G1m17,1 с получением вариантов 11-17, 21-17, 31-17, каждый из которых имел константную область тяжелой цепи с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 79. Для дальнейшего усиления эффекторной функции CDC константные области тяжелой цепи этих трех вариантов дополнительно модифицировали введением замены E333A (как описано Idusogie et al., 2000, J. Immunol., 164: 4178, 4184) с получением вариантов 11-AE, 21-AE, 31-AE, каждый из которых имел константную область тяжелой цепи с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 80. Кроме того, конструировали контрольное антитело "11-x" изменением аминокислотной последовательности HVR-H3 (CDR3) в тяжелой цепи антитела 11-17 на аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, которая полностью отменяла его способность распознавать и связываться с CCR7. Антитела транзientно экспрессировали в клетках CHO в культуральных объемах 500 мл, выделяли и использовали для дальнейшего тестирования, как описано ниже, вместе с химерным антителом HCO LC0 (см. выше), также обозначенным "0-0".

5.2. Активность мутантов гуманизированных анти-CCRV-антител с переключенным аллотипом и повышенной CDC.

Затем тестировали активность различных антител 11-17, 21-17, 31-17, 11-AE, 21-AE, 31-AE, 11-x и химерного антитела Ab 0-0 в различных тестах.

1. Связывание антител с CCR7, экспрессируемым на мембране, определяли с использованием анализа сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) с помощью проточной цитометрии на трех различных образцах клеток от пациента с хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL) и на трех различных образцах клеток от пациента с Т-клеточным пролимфоцитарным лейкозом (TPLL) (данные не представлены). Для простого расчета процента положительных клеток и/или относительной средней интенсивности флуоресценции (RMFI), которая была получена из отношения MFI (образца)/MFI (контроля), в опыт включали соответствующие контроли (изотипные контроли человека). На образцах CLL антитела 11-AE, 11-17, 31-17, 31-AE проявляли наилучшую активность и даже превосходили химерное антитело 0-0. На образцах TPLL наиболее высокую активность проявляли антитела 11-AE и 11-17. Антитела 11-AE, 11-17, 31-17, 31-AE показали сходные профили FACS на Т-клетках, полученных от двух здо-

ровых доноров (HD), в то время как эти антитела не связывались с нейтрофилами, моноцитами или НК-клетками (данные не представлены).

2. Антитела тестировали на их способность опосредовать комплементзависимую цитотоксичность (CDC) на трех разных образцах CLL и одном образце TPLL (данные не представлены). Анализ CDC проводили, как описано Cuesta-Mateos et al. (2015 год, см. выше). Антитела 11-17, 11-AE и 31-AE показывали наилучший ответ в опосредовании CDC в свежевыделенных клетках CLL образцов № 1 и № 3. Антитела 11-17 и 11-AE показывали ответ в опосредовании CDC на клетках CLL образца №2. Антитела 11-17, 11-AE, 21-AE и 31-AE показали ответ в опосредовании CDC на клетках TPLL образца №1.

На основании вышеприведенных результатов по эффективности антител в профиле FACS и опосредовании CDC, антитела 11-AE, 11-17, 31-17 и 31-AE были отобраны для дальнейшего тестирования.

3. Из четырех отобранных антител 11-AE и 11-17 показали наилучший профиль CDC на четвертом образце CLL (данные не представлены).

4. Четыре отобранных антитела дополнительно тестировали на их способность опосредовать ADCC. Анализ ADCC проводили следующим образом:

А) Клетки-мишени: выделенные PBMC или злокачественные клетки, полученные от пациентов, инкубировали при 37°C в течение 30 мин только с одной средой (RPMI+0,1% BSA) или со средой в присутствии тестируемых антител, находящихся в конечной концентрации 10 мкг/мл. В зависимости от используемого образца тестировали изотипный контроль (IC) и/или анти-CD52 (алемтузумаб), и/или анти-CD20 (ритуксимаб), и/или анти-CC7-антитела. Несвязанное антитело дважды отмывали добавлением 2 мл RPMI+0,1% BSA и центрифугированием клеток при 1800 об/мин в течение 2 мин.

В) Эффекторными клетками: PBL человека или мыши получали центрифугированием в градиенте плотности фиколла. Долю NK-клеток и моноцитов определяли с помощью FACS, как описано выше, с использованием антител, нацеленных против CD16-PE и CD14-APC.

С) Для распознавания клеток-мишеней и эффекторных клеток PBL метили кальцеин-УФ клеточным трекером (InvivoGen) в соответствии с протоколом изготовителя. Вкратце, 1 мкл 5 мМ раствора клеточного трекера добавляли на каждый мл суспензии клеток в PBS ( $1 \times 10^6$  клеток/мл) для обеспечения конечной рабочей концентрации 5 мкМ. Образец инкубировали в течение 20 мин при 37°C, защищая от света. Затем добавляли пятикратный исходный объем культуральной среды для окрашивания к клеткам и инкубировали в течение 5 мин (на данной стадии удаляется любой свободный краситель, оставшийся в растворе) и клетки осаждали центрифугированием при 1800 об/мин в течение 2 мин.

Д) Клетки-мишени высевали в 96-луночный круглодонный планшет из расчета  $10^4$  клеток/луночку в RPMI + 10% FBS. Затем PBL, меченные кальцеин-УФ, использовали в качестве эффекторных клеток (в качестве эффектора клеточного лизиса) в различных соотношениях эффектор-мишень (Е:Т). Через 4 ч инкубации клетки-мишени окрашивали несколькими специфическими маркерами, и определяли жизнеспособность клеток по окрашиванию 7AAD. Каждый образец анализировали проточной цитометрией. Определяли процент клеток-мишеней, погибших в результате ADCC: % лизиса =  $100 \times (ER-SR)/(MR-SR)$ . ER, SR и MR представляют экспериментальную, спонтанную и максимальную гибель клеток. Данные нормализовали к контрольной среде.

Все четыре отобранных антитела превосходили алемтузумаб и ритуксимаб в опосредовании ADCC при использовании выделенных PBL на двух разных образцах CLL (данные не представлены).

5. Все четыре отобранных антитела были способны опосредовать ADCC при использовании выделенных PBL на образце CLL, рефрактерном к алемтузумабу (данные не представлены).

6. Профили определения аффинности проточной цитометрией (FCAP) показали, что все четыре отобранных антитела имеют сходные профили связывания на клетках CLL и TPLL, хотя антитела с комбинацией тяжелых цепей с кодом 11 имеют несколько более высокую аффинность, чем антитела с комбинацией тяжелых цепей с кодом 31 (данные не представлены).

7. В образцах CLL и TPLL все четыре отобранных антитела блокируют миграцию в ответ на CCL19, однако антитело 31-AE было несколько менее эффективно в блокировании миграции в ответ на CCL21 (данные не представлены).

В табл.7 представлены обобщенные вышеуказанные результаты, где мутанты гуманизированных вариантов анти-CCR7-антител с переключенным аллотипом и повышенной CDC ранжированы согласно их относительной эффективности в вышеуказанных анализах. Антитела "11-х" не проявили никакого связывания с CCR7, экспрессируемым мембраной, что было показано FACS, и не опосредовали CDC или ADCC.

Таблица 7. Обзор и ранжирование относительной активности мутантов с переключенным аллотипом и повышенной CDC гуманизированных вариантов анти-CCR7-антител в анализе, как описано в примере 5

Ab	FACS CLL# 1	FACS TPLL# 1	CDC CLL# 1	FACS CLL#2	CDC CLL#2	FACS TPLL# 2	CDC CLL#3	FACS HD	FACS TPLL# 3	FACS CLL#3	CDC CLL#3	CDC TPLL	TW TPLL	FCAP TPLL	CDC CLL# 4	ADCC CLL#5	ADCC CLL# 6	ADC C TPLL	TW CL L	FCAP CLL	Общий балл
11 - 17	6	5	5	5	0	6	5	6	5	5	5	4	2	3	3	1	1	1	2	4	74
21 - 17	2	2	2	1	0	2	1	1	1	1	1	1	2								17
31 - 17	4	4	1	3	0	4	2	3	3	3	2	2	2	1	1	1	2	1	2	2	43
11 - A E	5	6	6	6	0	5	6	5	6	6	6	6	1	4	4	1	1	2	2	3	81
21 - A E	1	1	3	2	0	1	3	2	2	2	3	3	2								25
31 - A E	3	3	4	4	0	3	4	4	4	4	4	5	2	2	2	2	1	1	1	1	54

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное анти-CCR7-антитело, содержащее гипервариабельные участки HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, и где антитело обладает по меньшей мере одним из:

- VR-H1 содержит SEQ ID NO:6;
- HVR-H2 содержит SEQ ID NO:13;
- HVR-H3 содержит SEQ ID NO:19;
- HVR-L1 содержит SEQ ID NO:27;
- HVR-L2 содержит SEQ ID NO:31 и
- HVR-L3 содержит SEQ ID NO:36,

а) минимальной аффинностью в отношении синтетического антигена с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:76, определяемой  $K_d$ , которая не более чем в 10 раз выше, чем  $K_d$  анти-CCR7-антитела мыши, аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO:1 и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи которого представляет собой SEQ ID NO:2; и

б)  $IC_{50}$  не выше 100 нМ для ингибирования по меньшей мере одного из CCR7-зависимой внутриклеточной передачи сигнала и интернализации рецептора CCR7, индуцированной по меньшей мере одним CCRV-лигандом, выбранным из CCL19 и CCL21.

2. Гуманизированное анти-CCR7-антитело по п.1, где вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит 4 каркасные области тяжелой цепи HFR1-HFR4 и 3 гипервариабельных участка HVR-H1-HVR-H3, которые функционально связаны в следующем порядке HFR1, HVR-H1, HFR2, HVR-H2, HFR3, HVR-H3 и HFR4,

где вариабельная область легкой цепи антитела содержит 4 каркасные области легкой цепи LFR1-LFR4 и 3 гипервариабельных участка HVR-L1-HVR-L3, которые функционально связаны в следующем порядке LFR1, HVR-L1, LFR2, HVR-L2, LFR3, HVR-L3 и LFR4,

где каркасные области тяжелой цепи HFR1 - HFR4 имеют аминокислотные последовательности:

- i) SEQ ID NO:40, 43, 45 и 48, соответственно;
- ii) SEQ ID NO:41, 44, 46 и 49, соответственно; или
- iii) SEQ ID NO:42, 44, 47 и 49, соответственно,

и где каркасные области легкой цепи LFR1-LFR4 имеют аминокислотные последовательности:

- iv) SEQ ID NO:50, 52, 55 и 58, соответственно; или
- v) SEQ ID NO: 51, 53, 56 и 59, соответственно.

3. Гуманизированное анти-CCR7-антитело по пп.1 или 2, где вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности по меньшей мере с одной из последовательностей SEQ ID NO:61, 62 и 63, и

где вариабельная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности по меньшей мере с одной из последовательностей SEQ ID NO:64 и 65.

4. Гуманизированное анти-CCR7-антитело по п.3, где вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61 и вариабельная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64.

5. Гуманизированное анти-CCR7-антитело по любому из предшествующих пунктов, где антитело содержит константную область тяжелой цепи, которая представляет область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

6. Гуманизированное анти-CCR7-антитело по любому из предшествующих пунктов, где антитело содержит функциональную Fc-область, обладающую по меньшей мере одной эффекторной функцией,

выбранной из группы, состоящей из: связывания C1q, комплемент-зависимой цитотоксичности; связывания с Fc-рецептором, антитело-зависимой клеточной цитотоксичности и фагоцитоза.

7. Гуманизированное анти-CCR7-антитело по любому из предшествующих пунктов, где антитело содержит константную область тяжелой цепи аллотипа G1m17,1.

8. Гуманизированное анти-CCR7 антитело по п.7, где константная область тяжелой цепи содержит замену E333A.

9. Фармацевтическая композиция, содержащая гуманизированное анти-CCR7-антитело по любому из пп.1-8.

10. Фармацевтическая композиция по п.9 для лечения злокачественного новообразования, воспалительного заболевания, состояния или осложнения, возникшего в результате трансплантации тканей или органов, или состояния или осложнения, возникшего в результате фиброза или связанного с фиброзом.

11. Применение гуманизированного анти-CCR7-антитела по любому из пп.1-8 для получения лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования, воспалительного заболевания, состояния или осложнения, возникшего в результате трансплантации тканей или органов, или состояния или осложнения, возникшего в результате фиброза или связанного с фиброзом.

12. Применение по п.11, где злокачественное образование представляет собой злокачественное новообразование, опухолевые клетки которого экспрессируют рецептор CCR7.

13. Применение по п.11 или 12, где злокачественное образование выбрано из группы, состоящей из хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), лимфомы из клеток мантийной зоны (MCL), фолликулярной лимфомы, крупноклеточной В-клеточной лимфомы, СПИД-ассоциированной лимфомы, лимфоплазмоцитарной лимфомы, лимфомы Беркитта, В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, болезни Ходжкина, Т-клеточного лейкоза/лимфомы взрослых, фунгоидного микоза, бластного криза при хронических миелопролиферативных синдромах, бластного криза при миелодиспластических синдромах, рака молочной железы, немелкоклеточного рака легкого, меланомы, рака желудка или плоскоклеточной карциномы головы и шеи, и карциномы толстой кишки.

14. Применение по п.11, где воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, астмы, аллергического воспаления дыхательных путей, гиперплазии гладкой мускулатуры дыхательных путей, фиброзных заболеваний легких, ревматоидного артрита, рассеянного склероза, псориаза, атеросклероза, ВИЧ-инфекции и СПИДа, или где трансплантация тканей или органов представляет одну или более из трансплантаций почек, сердца, кожи и легких.

15. Применение по п.11, где фиброз выбран из группы, состоящей из фиброза и цирроза печени, фиброза почек, фиброза легких, фиброза кожи, фиброза органов сердечно-сосудистой системы, фиброза органов желудочно-кишечного тракта.

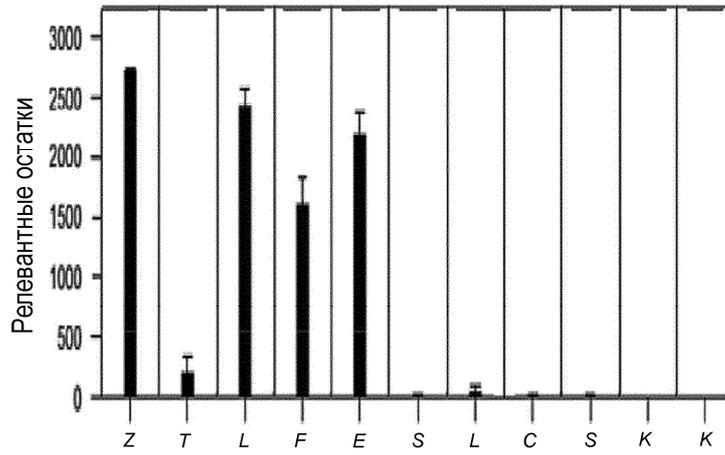
16. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую гуманизированное анти-CCR7-антитело по любому из пп.1-8.

17. Молекула нуклеиновой кислоты по п.16, где молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи антитела.

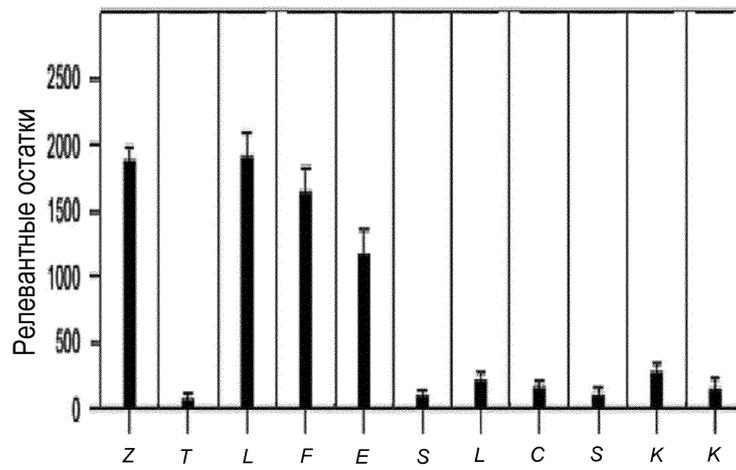
18. Молекула нуклеиновой кислоты по п.16 или 17, где кодирующая нуклеотидная последовательность функционально связана с регуляторными последовательностями для экспрессии кодирующей нуклеотидной последовательности в клетке-хозяине.

19. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.16.

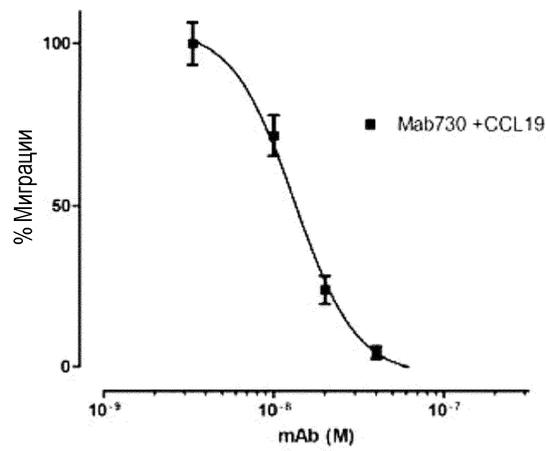
20. Способ лечения злокачественного новообразования, воспалительного заболевания, состояния или осложнения, возникшего в результате трансплантации тканей или органов, или состояния или осложнения, возникшего в результате фиброза или связанного с фиброзом у пациента, где способ включает введение пациенту гуманизированного анти-CCR7 антитела по любому из пп.1-8.



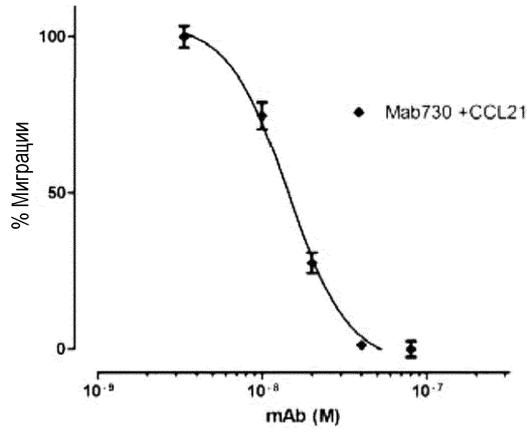
Фиг. 1a



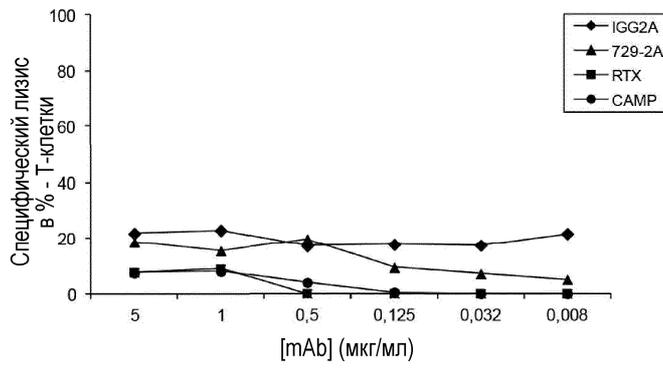
Фиг. 1b



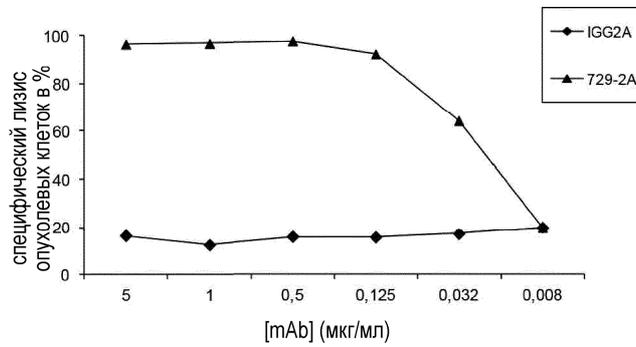
Фиг. 2a



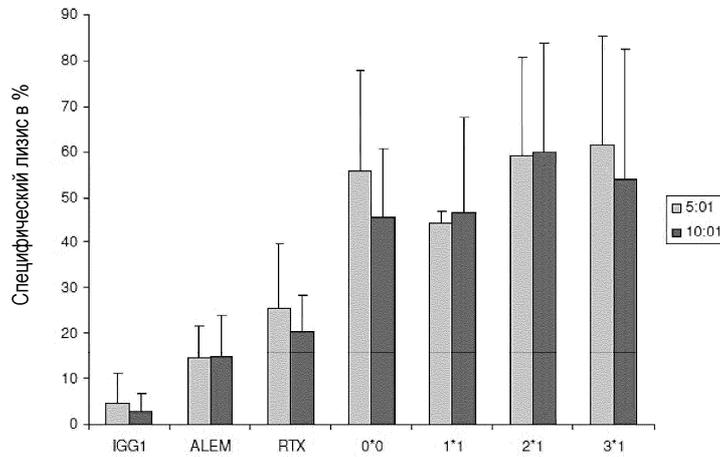
Фиг. 2b



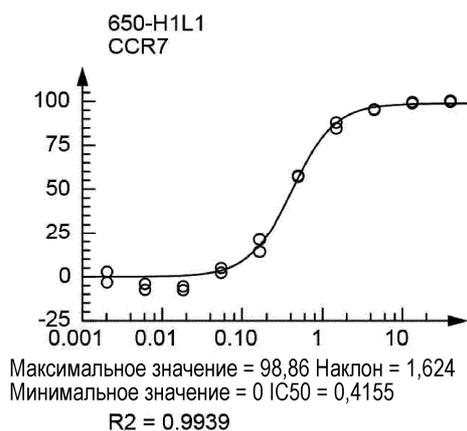
Фиг. 3



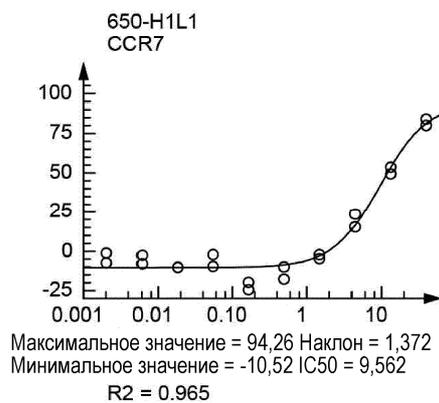
Фиг. 4



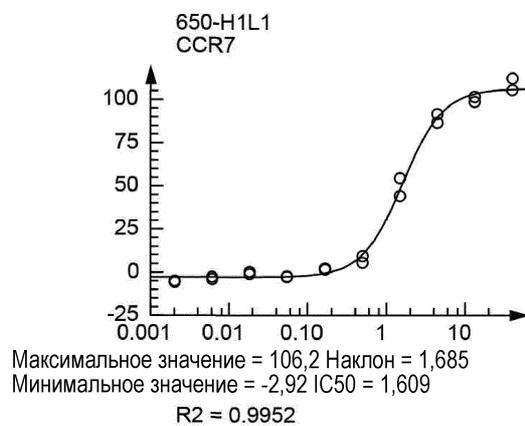
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8