

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039322**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.01.13

(21) Номер заявки
201792665

(22) Дата подачи заявки
2016.05.27

(51) Int. Cl. **C07K 16/28 (2006.01)**

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ СТЛА-4 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/168,391; 62/182,363; 62/190,653;
62/257,202; 62/280,263; 62/292,500;
62/294,558; 62/323,226

(32) 2015.05.29; 2015.06.19; 2015.07.09;
2015.11.18; 2016.01.19; 2016.02.08;
2016.02.12; 2016.04.15

(33) US

(43) 2018.06.29

(86) PCT/US2016/034508

(87) WO 2016/196237 2016.12.08

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭЙДЖЕНУС ИНК. (US); ЛЮДВИГ
ИНСТИТУТ ФОР КЭНСЕР
РИСЕРЧ ЛТД. (CH); МЕМОРИАЛ
СЛОАН-КЕТТЕРИНГ КЭНСЕР
СЕНТЕР (US)**

(72) Изобретатель:
**Дейк Марк Ван (NL), Мундт
Корнелия Анна (DE), Риттер Герд,
Шаер Дэвид, Волчок Джедд Дэвид,
Мергхуб Таха, Савицкий Дэвид
Адам, Финдеис Марк Артур, Уилсон
Николас Стюарт (US)**

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

(56) WO-A1-2009100140
WO-A1-2012120125
EP-A1-1262193
US-A1-2006240006
WO-A2-0243478

X. WU ET AL.: "1415: Eradication of melanoma by intratumoral injection of attenuated vaccinia virus requires CD8+ T cells and combination of anti-CTLA-4 blockade and virotherapy enhances therapeutic efficacy in advanced melanoma", JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 133, no. Suppl. 1, 1 May 2013 (2013-05-01), page S241, XP055201058, US, ISSN: 0022-202X, DOI: 10.1038/jid.2013.105, abstract

JUSTIN A. CARAVELLA ET AL.: "Structure-Guided design of antibodies", CURRENT COMPUTER-AIDED DRUG DESIGN, SHARJAH: BENTHAM SC. PUBL, AE, vol. 6, no. 2, 1 June 2010 (2010-06-01), pages 128-138, XP002662772, ISSN: 1573-4099, DOI: 10.2174/157340910791202469, page 132 - page 133

WO-A1-2012162277
WO-A2-2014144960
WO-A2-2008100562

CORMAC SHERIDAN: "IDO inhibitors move center stage in immuno-oncology", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 33, no. 4, 7 April 2015 (2015-04-07), pages 321-322, XP055286744, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt0415-321, the whole document, in particular table 1

CAUDILL M.M. ET AL.: "HSPPC-96: a personalised cancer vaccine", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, INFORMA HEALTHCARE, ASHLEY, LONDON; GB, vol. 1, no. 3, 1 May 2001 (2001-05-01), pages 539-547, XP009178564, ISSN: 1471-2598, DOI: 10.1517/14712598.1.3.539, the whole document

(57) В изобретении предложены антитела, которые специфично связываются с человеческим СТЛА-4 и антагонистически воздействуют на функции СТЛА-4. Также предложены фармацевтические композиции, включающие такие антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела, векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения таких антител и способы лечения субъекта с применением таких антител.

B1**039322****039322****B1**

Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительных заявок на патент США: 62/168391, поданной 29 мая 2015 года; 62/182363, поданной 19 июня 2015 года; 62/190,653, поданной 9 июля 2015 года; 62/257202, поданной 18 ноября 2015 года; 62/280263, поданной 19 января 2016 года; 62/292500, поданной 8 февраля 2016 года; 62/294558, поданной 12 февраля 2016 года; 62/323226, поданной 15 апреля 2016 года, каждая из которых в полном объеме включена в настоящую заявку посредством отсылки.

1. Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с человеческим CTLA-4, и способам их применения.

2. Уровень техники

Т-лимфоциты играют центральную роль в адаптивном иммунном ответе против антигена. По меньшей мере два сигнала требуются для полной активации наивных Т-клеток (Bretscher 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:185-90). Первый, антигенспецифичный сигнал, обеспечивает взаимодействие Т-клеточного рецептора (ТКР) с комплексом МНС/пептид на антигенпрезентирующей клетке (АПК). Второй, костимулирующий сигнал обеспечивает взаимодействия между рецепторами на Т-клетке и их лигандами на антигенпрезентирующей клетке (АПК). Захват ТКР/МНС и костимулирующие взаимодействия приводят к активации Т-клеток через ряд внутриклеточных путей, включая кальций-кальциневрин и RAS митоген-активируемую протеинкиназу, и последующую активацию факторов транскрипции для ряда эффекторных соединений, включающих цитокины, такие как IL-2. Такие события приводят к пролиферации Т-клеток, образованию пула CD4⁺ Т-хелперных (Т^H) клеток и размножению активированных CD8⁺ цитотоксических Т-клеток. Мало того, что костимуляция крайне важна для полной активации Т-клеток, ее отсутствие при связывании ТКР/МНС приводит к анергии и/или апоптозу.

Множество позитивных и негативных костимулирующих путей участвуют в регулировании Т-клеток, однако наиболее важными являются взаимодействия между CD28 на Т-клетках и B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86) на АПК. CD28 вызывает дифференцировку Т-клеток в клетки TH1 фенотипа, а также увеличивает продукцию антител В-клетками и активацию Т-клеток. B7-1 и B7-2, экспрессируемые на АПК, таких как дендритные клетки (ДК) и В-клетки, обладают перекрывающимися, но различными функциями. B7-2 конститутивно экспрессируется и быстро апрегулируется на АПК одновременно с взаимодействием с ТКР/МНС (сигнал 1). Экспрессия B7-1 на покоящейся клетке очень низкая, но, как правило, индуцируется после длительной стимуляции Т-клетками. Такие различия предполагают, что, хотя B7-2 может быть важным в инициализации активации Т-клеток, B7-1 может играть более важную роль в сохранении иммунного ответа.

После активации Т-клеток негативный регуляторный рецепторный антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4) апрегулируется на Т-клетках (Alegre et al., 2001, Nat. Rev. Immunol. 1:220-8). CTLA-4 структурно гомологичен CD28, но более прочно связывается с лигандами B7-1 и B7-2. CTLA-4 ингибирует иммунный ответ несколькими способами: он конкурирует с CD28 за связывание с лигандами B7 и, таким образом, блокирует костимуляцию; он подает негативный сигнал, ингибирующий активацию Т-клеток; и он может захватывать CD80 и CD86 у антагонистических клеток при трансэндоцитозе, что приводит к нарушению костимуляции через CD28 (Krummel and Allison, 1995, J. Exp. Med. 182:459-465; Walunas et al., 1994, Immunity 1:405-413; Qureshi et al., 2011, Science 332:600-603).

С учетом важнейшей роли B7 костимулирующего пути в стимуляции и поддержании иммунного ответа терапевтические средства, разработанные для блокирования данного пути, являются многообещающими для лечения аутоиммунных заболеваний и нарушений.

3. Сущность изобретения

В настоящем описании предложены антитела, которые специфично связываются с человеческим CTLA-4 и антагонистически воздействуют на функции CTLA-4, например CTLA-4-опосредованную иммунную супрессию. Также предложены фармацевтические композиции, включающие такие антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела, векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения таких антител, и способы лечения субъекта с применением таких антител. Антитела, раскрытые в настоящей заявке, особенно применимы для усиления активации Т-клеток при ответе против антигена (например, опухолевого антигена) и/или уменьшения Treg-опосредованной иммунной супрессии и, следовательно, для лечения рака у субъекта.

Таким образом, в одном аспекте настоящего описания предложено выделенное антитело, включающее вариабельную область тяжелой цепи, включающую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи, включающую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:

- (a) CDRH1 включает аминокислотную последовательность SYX₁MX₂ (SEQ ID NO: 22), где X₁ представляет собой S или A; и X₂ представляет собой N или S;
- (b) CDRH2 включает аминокислотную последовательность SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 2);
- (c) CDRH3 включает аминокислотную последовательность VGLMGPFXI (SEQ ID NO: 23), где X представляет собой D или N;
- (d) CDRL1 включает аминокислотную последовательность RASQSVX₁X₂YLX₃ (SEQ ID NO: 24),

где X_1 представляет собой S или G; X_2 представляет собой R, S или T; и X_3 представляет собой G или A;

(е) CDRL2 включает аминокислотную последовательность $X_1X_2SX_3RAT$ (SEQ ID NO: 25), где X_1 представляет собой G или A; X_2 представляет собой A или T; и X_3 представляет собой T, S, R или N; и

(f) CDRL3 включает аминокислотную последовательность $QQYGX_1SPX_2T$ (SEQ ID NO: 26), где X_1 представляет собой S или T; и X_2 представляет собой W или F.

В некоторых вариантах осуществления CDRH1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 27. В некоторых вариантах осуществления CDRH3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и 28. В некоторых вариантах осуществления CDRL1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 29 и 30. В некоторых вариантах осуществления CDRL2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 31-35. В некоторых вариантах осуществления CDRL3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 36 и 37. В некоторых вариантах осуществления CDRH1, CDRH2 и CDRH3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, соответственно, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3; 27, 2 и 3; или 27, 2 и 28. В некоторых вариантах осуществления CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3, соответственно, представленные в SEQ ID NO: 4, 5 и 6; 29, 32 и 36; 29, 33 и 37; 30, 31 и 6; 29, 34 и 6; или 29, 35 и 37. В некоторых вариантах осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6 соответственно.

В другом аспекте настоящего описания предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, включающее вариабельную область тяжелой цепи, включающую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи, включающую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:

(a) CDRH1 включает аминокислотную последовательность SYX_1MX_2 (SEQ ID NO: 22), где X_1 представляет собой S или A; и X_2 представляет собой N или S;

(b) CDRH2 включает аминокислотную последовательность $SISSSSYIYYADSVKG$ (SEQ ID NO: 2);

(c) CDRH3 включает аминокислотную последовательность $VGLMGPFXI$ (SEQ ID NO: 23), где X представляет собой D или N;

(d) CDRL1 включает аминокислотную последовательность $RASQSVX_1X_2Y LX_3$ (SEQ ID NO: 24), где X_1 представляет собой S или G; X_2 представляет собой R, S или T; и X_3 представляет собой G или A;

(е) CDRL2 включает аминокислотную последовательность $X_1X_2SX_3RAT$ (SEQ ID NO: 25), где X_1 представляет собой G или A; X_2 представляет собой A или T; и X_3 представляет собой T, S, R или N; и

(f) CDRL3 включает аминокислотную последовательность $QQYGX_1SPX_2T$ (SEQ ID NO: 26), где X_1 представляет собой S или T; и X_2 представляет собой W или F.

В некоторых вариантах осуществления CDRH1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 27. В некоторых вариантах осуществления CDRH3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и 28. В некоторых вариантах осуществления CDRL1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 29 и 30. В некоторых вариантах осуществления CDRL2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 31-35. В некоторых вариантах осуществления CDRL3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 36 и 37. В некоторых вариантах осуществления CDRH1, CDRH2 и CDRH3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 соответственно, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3; 27, 2 и 3; или 27, 2 и 28. В некоторых вариантах осуществления CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно, представленные в SEQ ID NO: 4, 5 и 6; 29, 32 и 36; 29, 33 и 37; 30, 31 и 6; 29, 34 и 6; или 29, 35 и 37.

В другом аспекте настоящего описания предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, включающее вариабельную область тяжелой цепи, включающую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи, включающую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления антитело включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 38-42. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 38-42. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В некоторых

В другом аспекте настоящего описания предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, включающее вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 38-42.

В другом аспекте настоящего описания предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, включающее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи, соответственно, включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 7 и 8; 7 и 44; 7 и 45; 38 и 8; 38 и 45; 39 и 43; 39 и 45; 39 и 46; 39 и 47; 40 и 43; 40 и 8; 40 и 44; 40 и 45; 41 и 8; 41 и 44; 41 и 45; 41 и 47; 42 и 43; или 42 и 45. В некоторых вариантах осуществления антитело включает переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

- 3 -

В другом аспекте настоящего описания предложено выделенное антитело, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим белком CTLA-4 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно.

В другом аспекте настоящего описания предложено выделенное антитело, которое связывается с таким же эпитопом на человеческом белке CTLA-4, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно.

В другом аспекте настоящего описания предложено антитело, которое связывается с эпитопом человеческого CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом человеческого CTLA-4, включающим, состоящим по существу из или состоящим из остатков 140-141 в SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом человеческого CTLA-4, состоящим из остатков 140-141 в SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается по меньшей мере с одним остатком человеческого CTLA-4, выбранным из группы, состоящей из остатков 140 и 141 в SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом человеческого CTLA-4, включающим, состоящим по существу из или состоящим из остатков 140-143 в SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом человеческого CTLA-4, состоящим из остатков 140-143 в SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом человеческого CTLA-4, включающим, состоящим по существу из или состоящим из остатков 135-143 в SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом человеческого CTLA-4, состоящим из остатков 135-143 в SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом человеческого CTLA-4, включающим, состоящим по существу из или состоящим из остатков 140-149 в SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом человеческого CTLA-4, состоящим из остатков 140-149 в SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом человеческого CTLA-4, включающим, состоящим по существу из или состоящим из остатков 135-149 в SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом человеческого CTLA-4, состоящим из остатков 135-149 в SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом человеческого CTLA-4, включающим, состоящим по существу из или состоящим из остатков 80-82 в SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом человеческого CTLA-4, состоящим из остатков 80-82 в SEQ ID NO: 77.

В другом аспекте настоящего описания предложено антитело, у которого, при связывании такого антитела с человеческим белком CTLA-4, с последующим добавлением дейтерия, обмен водорода в человеческом белке CTLA-4 на дейтерий в области, включающей остатки 140-141 из SEQ ID NO: 77, по существу уменьшен по сравнению с обменом водородом в человеческом белке CTLA-4 на дейтерий в той же области в отсутствие антитела, как определяют посредством водород-дейтериевого обмена. В некоторых вариантах осуществления область человеческого CTLA-4 включает остатки 140-143 из SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления область человеческого CTLA-4 включает остатки 135-143 из SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления область человеческого CTLA-4 включает остатки 140-149 из SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления область человеческого CTLA-4 включает остатки 135-149 из SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления при связывании антитела с человеческим белком CTLA-4, с последующим добавлением дейтерия, обмен водорода в человеческом белке CTLA-4 на дейтерий в области, включающей остатки 80-82 из SEQ ID NO: 77, по существу, уменьшен по сравнению с обменом водорода в человеческом белке CTLA-4 на дейтерий в той же области в отсутствие антитела, как определяют посредством водород-дейтериевого обмена.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из человеческого IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи является IgG₁. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи является IgG₂. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из человеческого IgGκ и IgGλ.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи человеческого IgG, которая является вариантом константной области тяжелой цепи человеческого IgG дикого типа, где вариант константной области тяжелой цепи человеческого IgG связывается с человеческими Fcγ рецепторами, выбранными из группы, состоящей из FcγRIIB и FcγRIIA с более высокой аффинностью, чем константная область тяжелой цепи человеческого IgG дикого типа связывается с человеческими Fcγ рецепторами. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи человеческого IgG, которая является вариантом константной области тяжелой цепи человеческого IgG дикого типа, где вариант константной области тяжелой цепи человеческого IgG связывается с человеческим FcγRIIB с более высокой аффинностью, чем константная область тяжелой цепи человеческого IgG дикого типа связывается с человеческим FcγRIIB. В некоторых вариантах осуществления вариант константной области тяжелой цепи человеческого IgG является вариантом челове-

ческого IgG₁, вариантом человеческого IgG₂ или вариантом константной области тяжелой цепи человеческого IgG₄. В некоторых вариантах осуществления вариант константной области тяжелой цепи человеческого IgG включает одну или более следующих аминокислотных мутаций согласно системе нумерации EU: G236D, P238D, S239D, S267E, L328F и L328E. В некоторых вариантах осуществления вариант константной области тяжелой цепи человеческого IgG включает ряд аминокислотных мутаций, выбранных из группы, состоящей из S267E и L328F; P238D и L328E; P238D и одной или более замен, выбранных из группы, состоящей из E233D, G237D, H268D, P271G и A330R; P238D, E233D, G237D, H268D, P271G и A330R; G236D и S267E; S239D и S267E; V262E, S267E и L328F; и V264E, S267E и L328F, согласно системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления вариант константной области тяжелой цепи человеческого IgG дополнительно включает одну или более аминокислотных мутаций, которые уменьшают аффинность IgG к человеческому FcγRIIIA, человеческому FcγRIIA или человеческому FcγRI. В некоторых вариантах осуществления FcγRIIB экспрессируется на клетке, выбранной из группы, состоящей из макрофагов, моноцитов, В-клеток, дендритных клеток, эндотелиальных клеток и активированных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи человеческого IgG, которая является вариантом константной области тяжелой цепи человеческого IgG дикого типа, где вариант константной области тяжелой цепи человеческого IgG связывается с человеческими Fcγ рецепторами с более высокой аффинностью, чем константная область тяжелой цепи человеческого IgG дикого типа связывается с человеческими Fcγ рецепторами. В некоторых вариантах осуществления человеческий Fcγ рецептор включает иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В некоторых вариантах осуществления человеческий Fcγ рецептор выбран из группы, состоящей из FcγRIIIA, FcγRIIA и FcγRI. В некоторых вариантах осуществления человеческим Fcγ рецептором является FcγRIIIA. В некоторых вариантах осуществления вариант константной области тяжелой цепи человеческого IgG включает одну или более следующих аминокислотных мутаций, согласно системе нумерации EU: G236A, S239D, F243L, T256A, K290A, R292P, S298A, Y300L, V305I, A330L, I332E, E333A, K334A, A339T и P396L. В некоторых вариантах осуществления вариант константной области тяжелой цепи человеческого IgG включает ряд аминокислотных мутаций, выбранных из группы, состоящей из: S239D; T256A; K290A; S298A; I332E; E333A; K334A; A339T; S239D и I332E; S239D, A330L и I332E; S298A, E333A и K334A; G236A, S239D и I332E; и F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L согласно системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления вариант константной области тяжелой цепи человеческого IgG включает следующие аминокислотные мутации согласно системе нумерации EU: S239D, A330L и I332E. В некоторых вариантах осуществления вариант константной области тяжелой цепи человеческого IgG включает следующие аминокислотные мутации, согласно системе нумерации EU: S239D и I332E. В некоторых вариантах осуществления вариант константной области тяжелой цепи человеческого IgG является вариантом константной области тяжелой цепи человеческого IgG₁, включающим следующие аминокислотные мутации, согласно системе нумерации EU: S239D и I332E. В некоторых вариантах осуществления антитело включает афукозилированную Fc-область. В некоторых вариантах осуществления антитело включено в лекарственную форму для интратуморальной доставки. В некоторых вариантах осуществления антитело или фармацевтическую композицию вводят интратуморально. В некоторых вариантах осуществления антитело включено в лекарственную форму для доставки в дренирующий опухоль лимфатический узел. В некоторых вариантах осуществления антитело или фармацевтическую композицию доставляют в дренирующий опухоль лимфатический узел. В некоторых вариантах осуществления антитело включено в лекарственную форму для подкожной доставки. В некоторых вариантах осуществления антитело или фармацевтическую композицию доставляют подкожно.

В некоторых вариантах осуществления человеческим Fcγ рецептором является FcγRIIc. В некоторых вариантах осуществления человеческий Fcγ рецептор экспрессируется на клетке, выбранной из группы, состоящей из макрофагов, моноцитов, В-клеток и дендритных клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело является человеческим антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является антагонистическим по отношению к CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления антитело ингибирует связывание человеческого белка CTLA-4 с человеческим CD80 или с человеческим CD86.

В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с цитотоксическим средством, цитостатическим средством, токсином, радионуклидом или детектируемой меткой.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу согласно настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению антитела согласно настоящему изобретению для изготовления фармацевтических композиций или лекарственных средств для иммунотерапии. Предпочтительно иммунотерапия предназначена для увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, необязательно для лечения рака, или лечения или предотвращения инфекционных заболеваний.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу согласно настоящему

му изобретению для применения в качестве диагностического средства.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению антитела согласно изобретению для *in vitro* обнаружения человеческого CTLA-4 в биологическом образце.

В другом аспекте настоящего описания предложена фармацевтическая композиция, включающая антитело против CTLA-4, раскрытое в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

В другом аспекте настоящего описания предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую и/или легкую цепь антитела, раскрытого в настоящей заявке. В другом аспекте настоящего описания предложен вектор, включающий полинуклеотид. В другом аспекте настоящего описания предложена рекомбинантная клетка-хозяин, включающая полинуклеотид или вектор. В другом аспекте настоящего описания предложен способ получения антитела, которое связывается с человеческим CTLA-4, где способ включает культивирование клетки-хозяина таким образом, чтобы полинуклеотид экспрессировался, и осуществлялась продукция антитела.

В другом аспекте настоящего описания предложен способ увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, где способ включает введение субъекту эффективного количества антитела против CTLA-4 или фармацевтической композиции, раскрытой в настоящей заявке. В другом аспекте настоящего описания предложен способ лечения рака у субъекта, где способ включает введение субъекту эффективного количества антитела против CTLA-4 или фармацевтической композиции, раскрытой в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, вводят подкожно или внутривенно. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, вводят внутривенно в количестве 0,1, 0,3, 1, 3, 6 или 10 мг/кг, необязательно с интервалом в три недели. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, вводят интратуморально. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, вводят интратуморально в количестве 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1 или 3 мг/кг, необязательно с интервалом в три недели. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, вводят интратуморально в количестве 0,03, 0,1 или 0,3 мг/кг, необязательно с интервалом в три недели. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, вводят интратуморально в дозе, которая в 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или 200 раз ниже, чем доза, вводимая при системном введении. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, вводят интратуморально в дозе, которая в 10 раз ниже, чем доза, вводимая при системном введении. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, вводят интратуморально в дозе, которая в 100 раз ниже, чем доза, вводимая при системном введении. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, вводят интратуморально, при этом способ дополнительно включает введение дополнительного терапевтического средства субъекту. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство вводят системно. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет солидную опухоль, и дополнительное терапевтическое средство является антителом против PD-1. В некоторых вариантах осуществления антителом против PD-1 является пембролизумаб или ниволумаб. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет плоскоклеточную карциному головы и шеи, и дополнительное терапевтическое средство является антителом против EGFR. В некоторых вариантах осуществления антителом против EGFR является цетуксимаб. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет HER2+ рак молочной железы, и дополнительное терапевтическое средство является антителом против HER2. В некоторых вариантах осуществления антителом против HER2 является трастузумаб. В некоторых вариантах осуществления такие способы дополнительно включают введение субъекту химиотерапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство вводят системно. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическим средством является гемцитабин. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, вводят интратуморально, и субъект имеет распространившуюся или метастатическую солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, вводят интратуморально, и субъект имеет рак головы и шеи (например, рецидивирующую/рефрактерную плоскоклеточную карциному головы и шеи). В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, вводят интратуморально, и субъект имеет рак молочной железы (например, рецидивирующий/рефрактерный HER2+ рак молочной железы). В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, доставляют в дренирующий опухоль лимфатический узел. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, доставляют посредством локализованного введения (например, подкожного введения). В некоторых вариантах осуществле-

ния антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, доставляют посредством локализованного введения (например, подкожного введения) в количестве 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1 или 3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, доставляют посредством локализованного введения (например, подкожного введения) в дозе, которая в 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или 200 раз ниже, чем доза, вводимая при системном введении. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, доставляют посредством локализованного введения (например, подкожного введения) в дозе, которая в 10 раз ниже, чем доза, вводимая при системном введении. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, доставляют посредством локализованного введения (например, подкожного введения) в дозе, которая в 100 раз ниже, чем доза, вводимая при системном введении. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, доставляют посредством локализованного введения (например, подкожного введения), и способ дополнительно включает введение дополнительного терапевтического средства субъекту. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство является вакциной. В некоторых вариантах осуществления вакцина включает комплекс пептида белка теплового шока (HSPPC), включающий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом. В одном варианте осуществления белок теплового шока является белком gp96 и находится в комплексе с опухлеассоциированным антигенным пептидом, где HSPPC получен из опухоли, полученной у субъекта. В некоторых вариантах осуществления белок теплового шока выбран из группы, состоящей из hsc70, hsp70, hsp90, hsp110, grp170, gp96, кальретикулина, их мутанта и комбинации двух или более из них. В некоторых вариантах осуществления белком теплового шока является hsc70. В некоторых вариантах осуществления белком теплового шока является hsp70. В некоторых вариантах осуществления антигенный пептид является синтетическим. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет рак. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет инфекционное заболевание. В некоторых вариантах осуществления такие способы дополнительно включают введение дополнительного терапевтического средства субъекту. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство является химиотерапевтическим средством или средством, направленно воздействующим на контрольную точку. В некоторых вариантах осуществления средство, направленно воздействующее на контрольную точку выбрано из группы, состоящей из антагонистического антитела против PD-1, антагонистического антитела против PD-L1, антагонистического антитела против PD-L2, антагонистического антитела против CTLA-4, антагонистического антитела против TIM-3, антагонистического антитела против LAG-3, антагонистического антитела против CEACAM1, агонистического антитела против GITR, агонистического антитела против OX40 и агонистического антитела против CD137, агонистического антитела против DR3, агонистического антитела против TNFSF14 и агонистического антитела против CD27. В некоторых вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является лучевая терапия. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство является ингибитором индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО). Подходящие ингибиторы ИДО включают, без ограничения, эпакадостат, F001287, индоксимод и NLG919. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство является вакциной. В некоторых вариантах осуществления вакцина включает комплекс пептида белка теплового шока (HSPPC), включающий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом. В одном варианте осуществления белок теплового шока является белком gp96 и находится в комплексе с опухлеассоциированным антигенным пептидом, где HSPPC получен из опухоли, полученной у субъекта.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу согласно настоящему изобретению, полинуклеотиду согласно изобретению, вектору согласно изобретению и/или рекомбинантной клетке-хозяину согласно изобретению, для применения в качестве лекарственного средства.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу согласно настоящему изобретению, полинуклеотиду согласно изобретению, вектору согласно изобретению и/или рекомбинантной клетке-хозяину согласно изобретению, для применения в качестве диагностического средства.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению антитела согласно настоящему изобретению, полинуклеотида согласно изобретению, вектора согласно изобретению и/или рекомбинантной клетки-хозяина согласно изобретению, для *in vitro* обнаружения человеческого CTLA-4 в биологическом образце.

В одном аспекте, в настоящей заявке предложена фармацевтическая композиция, включающая антитело против CTLA-4, раскрытое в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, для применения в качестве лекарственного средства.

В одном аспекте, в настоящей заявке предложена фармацевтическая композиция, включающая антитело против CTLA-4, раскрытое в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, для применения в качестве диагностического средства.

В одном аспекте, в настоящей заявке предложена фармацевтическая композиция, включающая антитело против CTLA-4, раскрытое в настоящей заявке, полинуклеотид согласно изобретению, вектор

согласно изобретению и/или рекомбинантную клетку-хозяина согласно изобретению, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. В одном аспекте фармацевтическая композиция предназначена для применения в качестве лекарственного и/или диагностического средства.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, для применения в способе увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, для применения в способе увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, для применения в способе увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, включающем введение субъекту эффективного количества антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции согласно изобретению.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, для применения в способе лечения рака.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, для применения в способе лечения рака у субъекта.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, для применения в способе лечения рака у субъекта, включающем введение субъекту эффективного количества антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции изобретения.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к: (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому средству, предпочтительно антителу против PD-1, для применения в качестве лекарственного средства.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к: (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому средству, предпочтительно антителу против PD-1, для применения в способе лечения рака. В предпочтительном варианте осуществления рак является солидной опухолью. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят интратуморально субъекту, предпочтительно вводят интратуморально субъекту в количестве 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1 или 3 мг/кг, необязательно с интервалом в три недели.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или набору компонентов, включающим: (а) антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению и (b) дополнительное терапевтическое средство, предпочтительно антителу против PD-1.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к:

(а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению и (b) антителу против EGFR, и, необязательно, (с) химиотерапевтическому средству, для применения в качестве лекарственного средства.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к:

(а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению и (b) антителу против EGFR, и, необязательно, (с) химиотерапевтическому средству, для применения в способе лечения рака. В предпочтительном варианте осуществления рак является плоскоклеточной карциномой головы и шеи. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят интратуморально субъекту, предпочтительно вводят интратуморально субъекту в количестве 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1 или 3 мг/кг, необязательно с интервалом в три недели.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или набору компонентов, включающим: (а) антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению и (b) антитело против EGFR, и, необязательно, (с) химиотерапевтическое средство.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к: (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению и (b) антителу против HER2, и, необязательно, (с) химиотерапевтическому средству, для применения в качестве лекарственного средства.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к: (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению и (b) антителу против HER2, и, необязательно, (с) химиотерапевтическому средству, для применения в способе лечения HER2+ рака молочной железы. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят интратуморально субъекту, предпочтительно вводят интратуморально субъекту в количестве 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1 или 3 мг/кг, необязательно с интервалом в три недели.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или набору компонентов, включающим: (а) антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению и (b) антитело против HER2, и, необязательно, (с) химиотерапевтическое средство.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, для применения в способе лечения рака, где антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят интратуморально субъекту, предпочтительно вводят интратуморально субъекту в количестве 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1 или 3 мг/кг, необязательно с интервалом в три недели.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, для применения в способе лечения рака, где антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят подкожно или внутривенно субъекту, предпочтительно вводят внутривенно субъекту в количестве 0,1, 0,3, 1, 3, 6 или 10 мг/кг, необязательно с интервалом в три недели.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к: (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому средству, для применения в качестве лекарственного средства. В предпочтительном варианте осуществления дополнительное терапевтическое средство является химиотерапевтическим средством или средством, направленно воздействующим на контрольную точку, или ингибитором индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО), или вакциной.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к: (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому средству, для применения в способе лечения рака. В предпочтительном варианте осуществления дополнительное терапевтическое средство является химиотерапевтическим средством или средством, направленно воздействующим на контрольную точку, или ингибитором индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО), или вакциной.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или набору компонентов, включающим: (а) антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению и (b) дополнительное терапевтическое средство. В предпочтительном варианте осуществления дополнительное терапевтическое средство является химиотерапевтическим средством или средством, направленно воздействующим на контрольную точку, или ингибитором индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО), или вакциной.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, для применения в способе лечения рака, и/или для применения в способе увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген, где антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению доставляют в дренирующий опухоль лимфатический узел.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению в способе лечения рака и/или в способе увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, где антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению доставляют в дренирующий опухоль лимфатический узел.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для получения лекарственных средств для иммунотерапии, например, для увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, лечения рака или лечения или предотвращения инфекционных заболеваний.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для получения лекарственных средств для иммунотерапии, например для увеличения актива-

ции Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, лечения рака или лечения или предотвращения инфекционных заболеваний, где антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению доставляют в дренирующий опухоль лимфатический узел.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению: (а) антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению и (b) антитела против HER2, и, необязательно, (с) химиотерапевтического средства для получения лекарственного средства для иммунотерапии, например, для увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, лечения рака или лечения или предотвращения инфекционных заболеваний.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению: (а) антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению и (b) антитела против HER2, и, необязательно, (с) химиотерапевтического средства для получения лекарственного средства для иммунотерапии, например для увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, лечения рака или лечения или предотвращения инфекционных заболеваний, где антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению доставляют в дренирующий опухоль лимфатический узел.

4. Краткое описание чертежей

Фиг. 1А является таблицей, на которой показаны аффинности связывания (K_D) антитела против CTLA-4 AGEN1884 и референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 с димерным и мономерным рекомбинантным CTLA-4 человека, яванского макака, мыши и крысы, при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Фиг. 1В является графиком, на котором показано связывание AGEN1884w, референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 и изотипического контрольного IgG₁ с CTLA-4-экспрессирующими клетками, при измерении с помощью проточной цитометрии. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) вычисляли и наносили на график в зависимости от диапазона концентраций антитела. На фиг. 1С и 1D показана селективность AGEN1884 и референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 при связывании с рекомбинантным CTLA-4 человека (rh) и яванского макака (rc) по сравнению с родственными представителями семейства (рекомбинантными человеческими CD28, ICOS, BTLA и PD-1 и рекомбинантным PD-1 яванского макака), показанная в сравнении с изотипическим контрольным IgG₁ антителом. Связывание измеряли с помощью технологии суспензионных чипов, и средняя интенсивность флуоресценции (MFI) при трех различных концентрациях антитела (10, 100, и 1000 нг/мл) показана на фиг. 1С. Фиг. 1D является сводной таблицей относительной аффинности связывания, основанной на данных, показанных на фиг. 1С;

на фиг. 2А показано связывание AGEN1884w, референсного антитела против CTLA-4 и изотипического контрольного IgG₁ антитела с активированными первичными человеческими CD4⁺ Т-клетками. Коротко, недавно выделенные CD4⁺ Т-клетки стимулировали при использовании связанных на планшетах антител против CD3 и против CD28 в течение пяти дней перед анализом связывания антител с помощью проточной цитометрии. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) вычисляли в диапазоне концентраций антител. На фиг. 2В показано внутриклеточное связывание AGEN1884 и референсного антитела против CTLA-4 по сравнению с изотипическим контрольным IgG₁ антителом при титровании по концентрациям с использованием активированных (антителами против CD3 и против CD28 с рекомбинантным IL-2 в течение трех дней) первичных CD8⁺ Т-клеток яванского макака. Данные были получены с помощью проточной цитометрии и показаны как процент CTLA-4⁺ Т-клеток от полной популяции CD8⁺ Т-клеток. На фиг. 2С показаны результаты анализа проточной цитометрии, в котором исследовали связывание AGEN1884w и изотипического контрольного IgG₁ антитела со стимулированными фитогемагглютинином CD4⁺ Т-клетками человека, яванского макака, крысы или мыши;

фиг. 3А - схемой анализа блокирования лиганда при использовании технологии суспензионных чипов. На фиг. 3В и 3С показан процент рекомбинантных белков CD80-Fc (фиг. 3В) и CD86-Fc (фиг. 3С), связывающихся с CTLA-4 конъюгированными сферами в отсутствие (100%) или в присутствии титруемой дозы AGEN1884, референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 или изотипического контрольного (IgG₁) антитела. На фиг. 3D показан процент рекомбинантных CD80-Fc и CD86-Fc, связывающихся с экспрессирующими CTLA-4 Т-клетками (Jurkat) в присутствии повышаемых концентраций AGEN1884w, референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 или изотипического контрольного (IgG₁) антитела. На фиг. 3Е показаны результаты анализа, в котором экспрессирующие CTLA-4 Т-клетки (Jurkat) инкубировали с титруемой дозой CD80-Fc или CD86-Fc перед добавлением фиксированной концентрации напрямую конъюгированного с флуорохромом AGEN1884w или референсного IgG₁ антитела против CTLA-4. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) вычисляли и наносили на график в зависимости от диапазона концентраций CD80-Fc или CD86-Fc;

на фиг. 4А показана функциональная активность антител против CTLA-4 в отношении культур первичных человеческих МПКК при стимуляции стафилококковым энтеротоксином А (SEA). В частности, на фиг. 4А показано кратное изменение продукции IL-2 в ответ на дозозависимое действие AGEN1884w и референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 по сравнению с изотипическим контрольным IgG₁. Планки погрешности указывают стандартное отклонение для лунок в тройной повторности. Фиг. 4В и 4С пред-

ставляют собой результаты анализа IL-2 с репортером люциферазой, которые показывают, что блокада CTLA-4 приводит к активации Т-клеток. Линию коэкспрессирующих CD3 и CD28 Т-клеток человека (Jurkat), созданных с помощью методов генной инженерии для конститутивной экспрессии CTLA-4 на клеточной поверхности в дополнение к репортерному гену люциферазы под контролем промотора IL-2, совместно культивировали с линией антигенпрезентирующих клеток (Raji), которые экспрессировали CD80 и CD86. Фиг. 4В является парой гистограмм, на которых показана экспрессия CD80 и CD86 на клетках Raji, при измерении с помощью проточной цитометрии. Сигнализацию ТКР инициировали при использовании антитела против CD3 в присутствии повышаемых концентраций AGEN1884w или изотипического контрольного IgG₁ антитела. На фиг. 4С показано кратное увеличение экспрессии люциферазы, суррогатного маркера активации гена IL-2, в ответ на повышаемые концентрации AGEN1884w в сравнении с изотипическим контрольным антителом. Фиг. 4D и 4Е представляют собой результаты анализа по исследованию способности антитела против CTLA-4, AGEN1884w, снижать продукцию ИФН γ первичными CD8⁺ Т-клетками в присутствии высоких концентраций антитела против CD3. Первичные человеческие Т-клетки стимулировали антителом против CD3 (10 мкг/мл) в присутствии повышаемых концентраций растворимого (фиг. 4D) или связанного на планшете (фиг. 4Е) AGEN1884w или изотипического контрольного IgG₁ антитела. Процент CD8⁺ ИФН γ ⁺ Т-клеток наносили на график в зависимости от тестируемых концентраций антитела. Пунктир указывает частоту CD8⁺ ИФН γ ⁺ Т-клеток в отсутствие стимуляции антителом против CD3. Фиг. 4F является графиком, на котором показана функциональная активность антитела против CTLA-4, AGEN1884w, отдельно или в комбинации с антителом против LAG-3, AGEN1746, антителом против PD-1, ниволумабом, или антителом против PD-1, пембролизумабом, в отношении культур первичных человеческих МКИК при стимуляции стафилококковым энтеротоксином А (SEA). Показаны средние и стандартное отклонение концентрации IL-2. IC обозначает изотипический контроль;

на фиг. 5А - аффинности связывания (K_D) AGEN2041w, референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 и референсного IgG₂ антитела против CTLA-4 с димерным и мономерным рекомбинантным CTLA-4 человека и яванского макака, при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Фиг. 5В является графиком, на котором показано связывание AGEN2041w, референсного IgG₂ антитела против CTLA-4 и изотипического контрольного IgG₂ с CTLA-4-экспрессирующими клетками, при измерении в анализе проточной цитометрии. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) вычисляли и наносили на график в зависимости от различных тестируемых концентраций антитела. Фиг. 5С является графиком, на котором показан процент CD80 и CD86, связывающихся с CTLA-4 в присутствии повышаемых концентраций AGEN2041w или референсного IgG₂ антитела против CTLA-4 (12, 37, 111, 333, 1000, 3000 и 9000 нг/мл перед добавлением сфер), при измерении с помощью технологии суспензионных чипов. Фиг. 5D и 5Е являются таблицами, которые аналогичны таблицам, показанным на фиг. 1С и 1D соответственно, где селективность AGEN2041w и референсного IgG₂ антитела против CTLA-4 при связывании с рекомбинантным CTLA-4 человека (rh) и яванского макака (gc), по сравнению с родственными представителями семейства (рекомбинантными человеческими CD28, ICOS, BTLA и PD-1; и рекомбинантным PD-1 яванского макака), исследовали в сравнении с изотипическим контрольным IgG₂ антителом. На фиг. 5D показаны значения MFI при измерении с помощью технологии суспензионных чипов, и фиг. 5Е представляет собой сводную таблицу, основанную на данных, показанных на фиг. 5D;

на фиг. 6А показана функциональная активность антител против CTLA-4 в отношении культур первичных человеческих МКИК при стимуляции стафилококковым энтеротоксином А (SEA). На фиг. 6А показано кратное изменение продукции IL-2 в ответ на дозозависимое действие AGEN1884w и AGEN2041w по сравнению с изотипическими контрольными IgG₁ и IgG₂ антителами. Планки погрешности указывают стандартное отклонение для лунок в тройной повторности. Фиг. 6В является графиком, на котором показаны результаты анализа IL-2 с репортером люциферазой, в котором исследовали AGEN2041w и изотипическое контрольное IgG₂ антитело. Кратное увеличение экспрессии люциферазы, суррогатного маркера активации гена IL-2, показано для повышаемых доз AGEN2041w и изотипического контрольного антитела;

фиг. 7А является графиком, на котором показано связывание AGEN1884w-105 (AGEN1884w, продуцируемого стабильным клоном 105), референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 и изотипического контрольного IgG₁ с CTLA-4-экспрессирующими клетками, при измерении в анализе проточной цитометрии. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) вычисляли и наносили на график в зависимости от титруемого антитела. Фиг. 7В является результатом анализа, в котором исследовали продукцию IL-2, повышаемую AGEN1884w-105, референсным IgG₁ антителом против CTLA-4 и изотипическим контрольным IgG₁ после стимуляции стафилококковым энтеротоксином А (SEA). На фиг. 7В показано шесть биологических повторностей и средние значения (усы) кратного изменения IL-2;

фиг. 8А, 8В, и 8С представляют собой кривые связывания титрования дозы антител с клетками СНО, экспрессирующими Fc γ RIIAH131 (фиг. 8А), Fc γ RIIB (фиг. 8В) и Fc γ RIIAV158 (фиг. 8С) соответственно. На кривые нанесена средняя интенсивность флуоресценции (MFI) вторичного детектирующего антитела. Планки погрешностей указывают стандартное отклонение при тройной повторности. Тестиро-

вали следующие антитела: AGEN1884w-FortiCHO, AGEN1884w-PowerCHO, AGEN2041w, референсное IgG₁ антитело против CTLA-4 и изотипическое контрольное IgG₁ антитело;

фиг. 9A и 9B - графики, на которых показан средний ответ (единицы ответа, RU) образцов в тройной повторности в диапазоне концентраций антител AGEN1884w-FortiCHO, AGEN1884w-PowerCHO, AGEN2041w и референсного IgG₁ антитела против CTLA-4, связанных с человеческим FcγRIIA (фиг. 9A) или человеческим FcγRIIA (фиг. 9B), при определении с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

фиг. 10A является схемой анализа с репортерным геном Fcγ рецептора IIIA (FcγRIIA). Фиг. 10B-10G представляют собой результаты анализа с репортером, в котором способность AGEN1884W-105 или AGEN1884w (AGEN1884w-105, на фиг. 10B, 10C, 10F, и 10G; AGEN1884w, на фиг. 10D и 10E) активировать линию репортерных клеток, экспрессирующих либо вариант FcγRIIA V158, либо вариант FcγRIIA F158, сравнивали с аналогичной способностью референсного IgG₁ антитела (фиг. 10B и 10C) против CTLA-4, AGEN2041w (фиг. 10D и 10E) и варианта AGEN1884w N297A (фиг. 10F и 10G). Относительные световые единицы (RLU) нанесены на графики в зависимости от диапазона концентраций антител;

фиг. 11 представляет собой результат анализа с репортером, где AGEN2041w, референсное IgG₂ антитело против CTLA-4 и изотипическое контрольное IgG₂ антитело тестировали на способность активировать линию репортерных клеток, экспрессирующих вариант FcγRIIA H131, при связывании антител с CTLA-4-экспрессирующими клетками-мишенями. Относительные световые единицы (RLU) нанесены на графики в зависимости от диапазона концентраций антител;

фиг. 12A является графиком, на котором показано связывание AGEN1884w-105, варианта AGEN1884w-N297A и изотипического контрольного IgG₁ с CTLA-4-экспрессирующими клетками, при измерении в анализе проточной цитометрии. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) вычисляли и наносили на график в зависимости от различных тестируемых концентраций антител. Фиг. 12B представляет собой результат анализа, в котором исследовали продукцию IL-2, индуцированную AGEN1884w-105, AGEN1884w-N297A и изотипическим контрольным IgG₁ после стимуляции стафилококковым энтеротоксином A (SEA). На фиг. 12B показаны шесть биологических повторностей и средние значения (усы) кратного изменения IL-2;

фиг. 13A и 13B представляют собой результаты анализа, в котором исследовали воздействие блокирования связывания с FcR на антагонистическую активность антител против CTLA-4. На фиг. 13A показаны семь биологических повторностей и средние значения (усы) кратного изменения IL-2. На фиг. 13B показаны семь биологических повторностей продукции IL-2 (пг/мл);

фиг. 14 - графиком, на котором показана продукция IL-2 человеческими МКПК при стимуляции стафилококковым энтеротоксином A (SEA) в ответ на 10 мкг/мл AGEN1884w,

AGEN1884w-N297A, AGEN1884w-S267E/L328F, AGEN1884w-

S239D/A330L/I332E, AGEN2041w, изотипического контрольного IgG₁ антитела или изотипического контрольного IgG₂ антитела. Средние значения (усы) продукции IL-2 показаны для каждого тестируемого антитела;

фиг. 15 является графиком, на котором показан процент лизиса клеток-мишеней в присутствии эффекторных клеток вместе с титрованием дозы AGEN1884w, референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 или изотипического контрольного антитела. Клетки Jurkat, созданные с применением методов генной инженерии для конститутивной экспрессии CTLA-4 на клеточной поверхности, использовали в качестве клеток-мишеней, и клетки NK92-FcγRIIA использовали в качестве эффекторных клеток;

на фиг. 16 сравниваются аффинности связывания (K_D) CD80-Fc-His, CD86-Fc-His, референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 и AGEN1884 в отношении CTLA-4. Walker and Sansom Nat. Rev. Immunology 2011 соответствует Walker and Sansom Nat. Rev. Immunol. (2011) 11(12):852-63. Xu et al., JI 2012 соответствует Xu et al., J. Immunol. (2012) 189(9):4470-7;

фиг. 17A представляет собой выравнивание последовательностей CTLA-4 человека (SEQ ID NO: 77), CTLA-4 яванского макака (SEQ ID NO: 84), CTLA-4 мыши (SEQ ID NO: 85) и CTLA-4 крысы (SEQ ID NO: 86). Точки обозначают остатки, идентичные соответствующим человеческим остаткам. Знак "*" (звездочка) указывает положения, которые содержат один полностью консервативный остаток. Знак ":" (двоеточие) указывает на консервативность между группами с сильно выраженным подобием. Знак "." (точка) указывает на консервативность между группами со слабо выраженным подобием. Фиг. 17B и 17C представляет собой выравнивания последовательностей CTLA-4 человека (SEQ ID NO: 77), CTLA-4 яванского макака (SEQ ID NO: 84), CD28 человека (SEQ ID NO: 87), ICOS человека (SEQ ID NO: 88), BTLA человека (SEQ ID NO: 89) и PD-1 человека (SEQ ID NO: 90). Две области, демонстрирующие сильное уменьшение поглощения дейтерия при связывании человеческого CTLA-4 с AGEN1884w-Fab, были подчеркнуты на фиг. 17A-C: Q⁸⁰VT⁸² и Y¹³⁵PPYYLGIGNGTQI¹⁴⁹. Фиг. 17D представляет собой компоновку рентгеновских координат в файлах 3osk и 1i8l Банка белковых структур. Этот комбинированный структурный анализ указывает на гирляндную кластеризацию CTLA-4 и B7-1 кластеров. Это дает модель димера человеческого B7-1 вместе с димером человеческого CTLA-4, который, как предполагают, является наиболее простой формой олигомерного сигнального компетентного иммунного ком-

плекса. Участок контакта между CTLA-4 и B7-1 включает область M¹³⁴YPPPY¹⁴⁰, но не ограничивается данным конкретным мотивом. Фиг. 17E представляет собой модель связывания AGEN1884w-Fab с человеческим CTLA-4. Все остатки CTLA-4, указанные в предыдущем описании к фиг. 17A-17E, пронумерованы согласно SEQ ID NO: 77;

фиг. 18A и 18B - результаты исследования Т-клеточно-зависимого ответа против антигена (TDAR) у яванских макаков. AGEN1884w (10 мг/кг), референсное IgG₁ антитело против CTLA-4 (3 мг/кг) (фиг. 18A), AGEN2041w (10 мг/кг) (фиг. 18B) или контрольное изделие (фиг. 18A и 18B) вводили внутривенно (медленное болюсное введение) вместе с HBsAg вакцинами (30 мкг в заднюю конечность) в Дни 1 и 29. Образцы в двойной повторности анализировали на титры антител к вирусу гепатита В (IgG) в сыворотке с помощью ELISA. Точки данных представляют средние±SEM в каждой контрольной группе;

фиг. 19A и 19B представляют собой выравнивания последовательностей переменных тяжелых цепей BADD411-2354 (SEQ ID NO: 7), BADD412-2356 (SEQ ID NO: 38), BADD412-2357 (SEQ ID NO: 39), BADD412-2358 (SEQ ID NO: 40), BADD412-2359 (SEQ ID NO: 41) и BADD412-2360 (SEQ ID NO: 42) и переменных легких цепей BADD412-2367 (SEQ ID NO: 43), BADD412-2376 (SEQ ID NO: 8), BADD412-2382 (SEQ ID NO: 44), BADD412-2384 (SEQ ID NO: 45), BADD412-2390 (SEQ ID NO: 46) и BADD412-2393 (SEQ ID NO: 47) соответственно. Показанные CDR-области тяжелой и легкой цепей определены согласно Kabat;

фиг. 20A-20E - графики, на которых показан процент рекомбинантных CD80-PE или CD86-PE, связывающихся с CTLA-4-конъюгированными сферами в присутствии титруемых доз 19 антител против CTLA-4 (AGEN1884-AGEN1902), при измерении с помощью технологии суспензионных чипов.

5. Подробное описание

В настоящем описании предложены антитела, которые специфично связываются с человеческим CTLA-4 и антагонистически воздействуют на функцию CTLA-4, например CTLA-4-опосредованную иммунную супрессию. Также предложены фармацевтические композиции, включающие такие антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела, векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения таких антител, а также способы лечения субъекта с применением таких антител. Антитела, раскрытые в настоящей заявке, особенно применимы для увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген (например, опухолевый антиген) и, следовательно, для лечения рака или предотвращения или лечения инфекционных заболеваний у субъекта. Антитела, раскрытые в настоящей заявке, также могут применяться в фармацевтических композициях, или в производстве лекарственных средств, для лечения рака или предотвращения или лечения инфекционных заболеваний.

5.1. Определения.

При использовании в настоящем описании термины "приблизительно" и "примерно" в случае использования при определении числового значения или числового диапазона, означают, что отклонения от 5 до 10% выше и от 5 до 10% ниже значения или диапазона остаются в рамках подразумеваемого определения указанного значения или диапазона.

При использовании в настоящем описании термин "CTLA-4" относится к белку цитотоксических Т-лимфоцитов 4. Нуклеотидная и полипептидная последовательности CTLA-4 известны в уровне техники. Примерная человеческая аминокислотная последовательность CTLA-4 представлена в GenBank под идентификатором GI: 15778585 и примерная мышьяная аминокислотная последовательность CTLA-4 представлена в GenBank под идентификатором GI: 15778586.

При использовании в настоящем описании термины "антитело" и "антитела" включают полноразмерные антитела, антигенсвязывающие фрагменты антител и молекулы, включающие CDR-области, VH-области или VL-области антител. Примеры антител включают моноклональные антитела, рекомбинантно продуцируемые антитела, моносpezifичные антитела, мультисpezifичные антитела (включая бисpezifичные антитела), человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, включающие две молекулы тяжелой цепи и две молекулы легкой цепи, мономер легкой цепи антитела, мономер тяжелой цепи антитела, димер легкой цепи антитела, димер тяжелой цепи антитела, пару легкой цепи антитела тяжелой цепи антитела, интратела, гетероконъюгаты антител, однодоменные антитела, моновалентные антитела, одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv-фрагменты (scFv), камелизированные антитела, аффитела, Fab-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, связанные дисульфидной связью Fv-фрагменты (sdFv), антиидиотипические (анти-Id) антитела (в том числе, например, антитела против анти-Id антител) и антигенсвязывающие фрагменты любого из перечисленных. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящей заявке, относятся к популяциям поликлональных антител. Антитела могут относиться к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY), любому классу (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂) или любому субклассу (например, IgG_{2a} или IgG_{2b}) молекулы иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящей заявке, являются IgG антителами или их классом (например, человеческими IgG₁ или IgG₄) или субклассом. В определенном варианте осуществления антитело является гуманизированным моноклональным антителом. В другом определенном варианте осуществления антитело является человеческим моноклональным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящей заявке, является IgG₁ или IgG₂ антителом.

При использовании в настоящем описании термины "VH-область" и "VL-область" относятся к одиночным переменным областям тяжелой и легкой цепи антитела, соответственно, включающим FR (каркасные области) 1, 2, 3 и 4 и CDR (определяющие комплементарность области) 1, 2 и 3 (см. Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. (NIH Publication No. 91-3242, Bethesda).

При использовании в настоящем описании термин "CDR" или "определяющая комплементарность область" означает несплошные антигенсвязывающие участки, присутствующие в переменной области полипептидов тяжелой и легкой цепей. Эти определенные области были описаны в Kabat et al., *J. Biol. Chem.* 252, 6609-6616 (1977) и Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. (1991), а также в Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) и MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996), где определения включают перекрывающиеся аминокислотные остатки или подмножества аминокислотных остатков, при сравнении друг с другом. Аминокислотные остатки, которые входят в CDR-области, согласно определению в каждом из вышеуказанных цитируемых источников, представлены для сравнения. Предпочтительно термин "CDR" является CDR-областью, определенной согласно Кэбату, на основе сравнений последовательностей. CDRH1, CDRH2 и CDRH3 обозначают CDR-области тяжелой цепи, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 обозначают CDR-области легкой цепи.

При использовании в настоящем описании термин "система нумерации EU" относится к правилу нумерации EU для константных областей антител, как описано в Edelman G.M. et al., *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969) и Kabat et al. в статье "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991.

При использовании в настоящем описании термин "каркасные (FR) аминокислотные остатки" относится к таким аминокислотам в каркасной области цепи иммуноглобулина. Термин "каркасные области" или "FR-область" при использовании в настоящем описании включает аминокислотные остатки, которые являются частью переменной области, но не являются частью CDR-области (например, при использовании определения CDR-областей Кэбата).

При использовании в настоящем описании термин "афукозилирование" или "афукозилированный" применительно к Fc относится, по существу, к отсутствию фукозы, ковалентно присоединенной, прямо или опосредованно, к остатку 297 Fc-области человеческого IgG₁, при нумерации согласно индексу EU (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)), или к соответствующему остатку в не относящихся к IgG₁ или нечеловеческих IgG₁ иммуноглобулинах. Таким образом, в композиции, включающей множество афукозилированных антител, по меньшей мере 70% антител не будут фукозилированными, прямо или опосредованно (например, через промежуточные сахара), по остатку 297 Fc-области антител, и, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% не будут фукозилированными, прямо или опосредованно, по остатку 297 Fc-области.

При использовании в настоящем описании термин "специфично связывается с" относится к способности антитела связываться с антигеном с константой диссоциации (Kd) по меньшей мере приблизительно 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M или меньше, и/или связываться с антигеном с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза превышает его аффинность к неспецифическому антигену.

При использовании в настоящем описании "эпитоп" является термином из уровня техники и относится к локализованной области антигена, с которой может специфично связываться антитело. Эпитопом могут быть, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или непрерывный эпитоп), или эпитоп может быть, например, образован при соединении двух или более несмежных областей полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или несплошной эпитоп). В некоторых вариантах осуществления эпитоп, с которым связывается антитело, может быть определен, например, с помощью ЯМР спектроскопии, рентгеновских дифракционных кристаллографических исследований, анализов ELISA, водород-дейтериевого обмена в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии с электрораспылением), анализов олигопептидного сканирования на основе микроматриц и/или картирования мутагенеза (например, картирования сайт-направленного мутагенеза). В случае рентгеновской кристаллографии кристаллизация может быть выполнена при использовании любого из известных в уровне техники способов (например, Giege R. et al. (1994) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A. (1990) *Eur. J. Biochem.* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 6300-6303). Кристаллы антитела:антигена можно исследовать при использовании известных методов рентгеновской дифракции и можно уточнять при использовании такой программы, как X-PLOR (Yale University, 1992, распространяемой Molecular Simulations, Inc.; см., например, *Meth. Enzymol.* (1985), выпуски 114 и 115, eds Wyckoff H.W. et al.; U.S. 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G. (1997) *Meth. Enzymol.* 276A: 361-423, ed Carter C.W.; Roversi P. et al. (2000) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 56(Pt 10): 1316-1323). Исследования картирования мутагенеза могут быть выполнены с применением любого способа, известного специалисту в данной области. См., например, Champe M. et al. (1995) *Biol. Chem.* 270 Дж: 1388-1394 и Cunningham BC & Wells JA (1989) *Science* 244: 1081-1085 по поводу описания способов мутагенеза, в том числе методик мутагенеза с применением

аланинового сканирования. В определенном варианте осуществления эпитоп антитела или его антиген-связывающий фрагмент определяют с помощью исследований мутагенеза с применением аланинового сканирования.

При использовании в настоящем описании термин "лечить" и "лечение" относятся к терапевтическим или профилактическим процедурам, описанным в настоящей заявке. В способах "лечения" применяют введение антитела субъекту, имеющему заболевание или нарушение или предрасположенному к появлению такого заболевания или нарушения, с целью предотвращения, лечения, задержки, уменьшения тяжести или облегчения одного или более симптомов заболевания или нарушения, или рецидива заболевания или нарушения, или для повышения выживаемости субъекта сверх ожидаемой в отсутствие такого лечения.

При использовании в настоящем описании термин "эффективное количество" в отношении применения терапии у субъекта относится к количеству терапии, которое обеспечивает достижение требуемого профилактического или терапевтического эффекта.

При использовании в настоящем описании термин "субъект" включает любого человека или не относящегося к человеку животного.

Водород-дейтериевый обмен оценивают при использовании анализа, включающего следующие этапы: (a) взятие раствора только CTLA-4 или CTLA-4 в комбинации с антителом в водном буфере и разведение данного раствора приблизительно в 90% объеме/избыточном объеме маркирующего буфера с оксидом дейтерия, в течение, например, 0, 60, 300, 1800 и 7200 с; (b) остановку обмена водорода на дейтерий путем снижения pH; (c) обработку образцов с помощью расщепления протеазой и выполнение масс-спектрометрического анализа; и (d) вычисление включения дейтерия в протеолизные пептиды CTLA-4 и сравнение включения дейтерия в присутствии или отсутствии антитела. Водород-дейтериевый обмен в протеолизном пептиде CTLA-4 "уменьшен", если водород-дейтериевый обмен в присутствии антитела против CTLA-4 уменьшен по меньшей мере на 10% по сравнению с водород-дейтериевым обменом в отсутствие антитела, при оценке в предыдущем анализе.

5.2. Антитела против CTLA-4.

В одном аспекте настоящего описания предложены антитела, которые специфично связываются с человеческим CTLA-4 и антагонистически воздействуют на функции CTLA-4. Аминокислотные последовательности примерных антител представлены в табл. 1-6, ниже.

Таблица 1. Последовательности переменных областей, CDR-областей и каркасных областей (FR) примерных антител против CTLA-4

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
1	Kabat CDRH1 (AGEN1884w)	SYSMN
2	Kabat CDRH2 (AGEN1884w)	SISSSSSYIYYADSVKG
3	Kabat CDRH3 (AGEN1884w)	VGLMGPFDI
4	Kabat CDRL1 (AGEN1884w)	RASQSVSRYLQ
5	Kabat CDRL2 (AGEN1884w)	GASTRAT
6	Kabat CDRL3 (AGEN1884w)	QQYGSSPWT
7	VH (AGEN1884w)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGL EWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSS
8	VL (AGEN1884w)	EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVSRYLQWYQQKPGQAPR LLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQGTKVEIK
9	Последовательность зародышевой линии: IGHV3-21*01	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGL EWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR
10	Последовательность зародышевой линии: IGKV3-20*01	EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QYGSSP
11	Последовательность зародышевой линии: IGKV3-11*01	EIVLTQSPATLSTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQ RSNWPP
12	AGEN1884w полноразмерная тяжелая цепь (с С-концевым лизином)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGL EWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
93	AGEN1884w полноразмерная тяжелая цепь (без С-концевого лизина)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGL EWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

13	AGEN1884w полноразмерная последовательность легкой цепи	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASQSVSRYL _{GW} YQQKPGQAPR LLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFI _{FP} PSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITL LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
14	AGEN2041w полноразмерная последовательность тяжелой цепи (с С- концевым лизином)	EVQLVESGGGLV _{KP} GGSLRL _{SC} AAAGFTTFSSYSMNWVRQAPGKGL EWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMN _{SL} RAED TAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTV _{PSS} NFGTQTYTCNV _{DH} KPSNTKVDK _{TV} ERKCCVECP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLT _{VV} HQDWLNGKE YKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT _{PP} MLDS _{DG} SFFLYS KLTVDKSRWQQGNV _{FSC} SV _{MHEAL} HNHYTQKSL _{SL} SPGK
94	AGEN2041w полноразмерная последовательность тяжелой цепи (без С-концевого лизина)	EVQLVESGGGLV _{KP} GGSLRL _{SC} AAAGFTTFSSYSMNWVRQAPGKGL EWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMN _{SL} RAED TAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTV _{PSS} NFGTQTYTCNV _{DH} KPSNTKVDK _{TV} ERKCCVECP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLT _{VV} HQDWLNGKE YKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT _{PP} MLDS _{DG} SFFLYS KLTVDKSRWQQGNV _{FSC} SV _{MHEAL} HNHYTQKSL _{SL} SPG
15	AGEN1884 полноразмерная последовательность легкой цепи	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASQSVSRYL _{GW} YQQKPGQAPR LLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQGTKEIKRSVAAPSVFI _{FP} PSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITL LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
16	IMGT CDRH1 (AGEN1884w)	GFTFSSYS
17	IMGT CDRH2 (AGEN1884w)	ISSSSSYI
18	IMGT CDRH3 (AGEN1884w)	ARVGLMGPFDI
19	IMGT CDRL1 (AGEN1884w)	QSVSRY
20	IMGT CDRL2 (AGEN1884w)	GAS
21	IMGT CDRL3 (AGEN1884w)	QQYGSSPWT
22	CDRH1 консенсусная последовательность	SYX ₁ MX ₂ , где X ₁ представляет собой S или A; и X ₂ представляет собой N или S
23	CDRH3 консенсусная последовательность	VGLMGPFXI, где X представляет собой D или N
24	CDRL1 консенсусная последовательность	RASQSVX ₁ X ₂ YLX ₃ , где X ₁ представляет собой S или G; X ₂ представляет собой R, S или T; и X ₃ представляет собой G или A
25	CDRL2 консенсусная последовательность	X ₁ X ₂ SX ₃ RAT, где X ₁ представляет собой G или A; X ₂ представляет собой A или T; и X ₃ представляет собой T, S, R или N

26	CDRL3 консенсусная последовательность	QQYGX ₁ SPX ₂ T, где X ₁ представляет собой S или T; и X ₂ представляет собой W или F
27	CDRH1	SYAMS
28	CDRH3	VGLMGPFNI
29	CDRL1	RASQSVSSYLA
30	CDRL1	RASQSVGTYLA
31	CDRL2	GASRRAT
32	CDRL2	ATSSRAT
33	CDRL2	GASSRAT
34	CDRL2	AASTRAT
35	CDRL2	GASNRAT
36	CDRL3	QQYGTSPWT
37	CDRL3	QQYGSSPFT
38	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLVWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSS
39	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSS
40	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSS
41	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLVWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFNIWGQGTMTVTVSS
42	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSS
43	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGYLAWYQHKGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
44	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYATSSRATGIPDRFSGSVSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTSPWTFGQGTKVEIK
45	VL	EIVLTQSPATLSFSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTFTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIK
46	VL	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPDRFSGSASGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
47	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIK
48	VH FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
49	VH FR2	WVRQAPGKGLEWVS
50	VH FR3	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
51	VH FR4	WGQGTMTVTVSS
52	VH FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
53	VH FR2	WVRQAPGKGLVWVS

54	VH FR3	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
55	VH FR1	EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
56	VH FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFTFS
57	VL FR1	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC
58	VL FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
59	VL FR3	GIPDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYC
60	VL FR4	FGQGTKVEIK
61	VL FR1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
62	VL FR2	WYQHKVQAPRLLIY
63	VL FR3	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
64	VL FR2	WYQQKPGQAPSLLIY
65	VL FR3	GIPDRFSGSVSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
66	VL FR1	EIVLTQSPATLSFSPGERATLSC
67	VL FR3	GIPDRFSGSGSGTDFTTISRLEPEDFAVYYC
68	VL FR4	FGPGTKVDIK
69	VL FR1	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSC
70	VL FR3	GIPDRFSGSASGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
71	VL FR3	GIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYC
72	VH консенсусная последовательность	EVQLX ₁ ESGGGLVX ₂ PGGSLX ₃ LSCAASGFTFSSYX ₄ MX ₅ WVRQAPG KGLX ₆ WVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAX ₇ LYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGLMGPF ₈ WVGQGMVTVSS, где X ₁ представляет собой V или L; X ₂ представляет собой K или Q; X ₃ представляет собой R или T; X ₄ представляет собой S или A; X ₅ представляет собой N или S; X ₆ представляет собой E или V; X ₇ представляет собой S или T; и X ₈ представляет собой D или N

73	VL консенсусная последовательность	EIVLTQSPX₁TL₂SPGERATL₃SCRASQSVX₃X₄YLX₅WYQX₆KX₇GQAPX₈LLIYX₉X₁₀SX₁₁RATGIPX₁₂RFSGSX₁₃SGTDFTX₁₄TI₁₅X₁₆LEPEDFAVYYCQY₁₇SPX₁₈TFGX₁₉GTKVX₂₀IK, где X₁ представляет собой G или A; X₂ представляет собой L, V или F; X₃ представляет собой S или G; X₄ представляет собой R, T или S; X₅ представляет собой G или A; X₆ представляет собой Q или H; X₇ представляет собой P или V; X₈ представляет собой R или S; X₉ представляет собой G или A; X₁₀ представляет собой A или T; X₁₁ представляет собой T, R, S или N; X₁₂ представляет собой D или A; X₁₃ представляет собой G, V или A; X₁₄ представляет собой L или F; X₁₅ представляет собой T или S; X₁₆ представляет собой R или S; X₁₇ представляет собой S или T; X₁₈ представляет собой W или F; X₁₉ представляет собой Q или P; и X₂₀ представляет собой E или D
74	AGEN1884w N297A полноразмерная тяжелая цепь (с С-концевым лизином)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS₁CAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGL EWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN₂AKNSLYLQMN₃SLRAED TAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVT₄SVWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTV₅TPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK₆RVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV₇SHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLT₈VLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKG₉FYP₁₀SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNV₁₁FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
95	AGEN1884w N297A полноразмерная тяжелая цепь (без С-концевого лизина)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS₁CAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGL EWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN₂AKNSLYLQMN₃SLRAED TAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVT₄SVWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTV₅TPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK₆RVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV₇SHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLT₈VLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKG₉FYP₁₀SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNV₁₁FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
75	AGEN1884w S267E/L328F полноразмерная тяжелая цепь (с С-концевым лизином)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS₁CAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGL EWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN₂AKNSLYLQMN₃SLRAED TAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVT₄SVWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTV₅TPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK₆RVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV₇EHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT₈VLHQDWL NGKEYKCKVSNKAF₉PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKG₁₀FYP₁₁SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNV₁₂FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

96	AGEN1884w S267E/L328F полноразмерная тяжелая цепь (без С-концевого лизина)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGL EWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVEHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKAFAPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
76	AGEN1884w S239D/A330L/I332E полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGL EWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
97	AGEN1884w S239D/A330L/I332E полноразмерная тяжелая цепь (без С-концевого лизина)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGL EWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Таблица 2. Последовательности CDR тяжелой цепи примерных антител против CTLA-4¹

Антитело	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)
AGEN1884w	SYSMN (1)	SISSSSSSIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1885	SYSMN (1)	SISSSSSSIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1886	SYSMN (1)	SISSSSSSIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1887	SYAMS (27)	SISSSSSSIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1888	SYAMS (27)	SISSSSSSIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1889	SYSMN (1)	SISSSSSSIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1890	SYSMN (1)	SISSSSSSIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1891	SYSMN (1)	SISSSSSSIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1892	SYSMN (1)	SISSSSSSIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1893	SYSMN (1)	SISSSSSSIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1894	SYSMN (1)	SISSSSSSIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1895	SYSMN (1)	SISSSSSSIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1896	SYSMN (1)	SISSSSSSIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1897	SYAMS (27)	SISSSSSSIYYADSVKG (2)	VGLMGPFNI (28)
AGEN1898	SYAMS (27)	SISSSSSSIYYADSVKG (2)	VGLMGPFNI (28)
AGEN1899	SYAMS (27)	SISSSSSSIYYADSVKG (2)	VGLMGPFNI (28)
AGEN1900	SYAMS (27)	SISSSSSSIYYADSVKG (2)	VGLMGPFNI (28)
AGEN1901	SYSMN (1)	SISSSSSSIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1902	SYSMN (1)	SISSSSSSIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)

¹ CDR-области VH в табл. 2 определены согласно Kabat.

Таблица 3. Последовательности CDR легкой цепи примерных антител против CTLA-4²

Антитело	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
AGEN1884w	RASQSVSRYLГ (4)	GASTRAT (5)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1885	RASQSVSSYLA (29)	ATSSRAT (32)	QQYGTSPWT (36)
AGEN1886	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT (33)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1887	RASQSVSRYLГ (4)	GASTRAT (5)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1888	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT (33)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1889	RASQSVGTYLA (30)	GASRRAT (31)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1890	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT (33)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1891	RASQSVSSYLA (29)	AASTRAT (34)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1892	RASQSVSSYLA (29)	GASNRAT (35)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1893	RASQSVGTYLA (30)	GASRRAT (31)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1894	RASQSVSRYLГ (4)	GASTRAT (5)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1895	RASQSVSSYLA (29)	ATSSRAT (32)	QQYGTSPWT (36)
AGEN1896	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT (33)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1897	RASQSVSRYLГ (4)	GASTRAT (5)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1898	RASQSVSSYLA (29)	ATSSRAT (32)	QQYGTSPWT (36)
AGEN1899	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT (33)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1900	RASQSVSSYLA (29)	GASNRAT (35)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1901	RASQSVGTYLA (30)	GASRRAT (31)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1902	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT (33)	QQYGSSPFT (37)

² CDR-области VL в табл. 3 определены согласно Kabat.

Таблица 4. Каркасные (FR) VH последовательности примерных антител против CTLA-4³

Антитело	VH FR1 (SEQ ID NO:)	VH FR2 (SEQ ID NO:)	VH FR3 (SEQ ID NO:)	VH FR4 (SEQ ID NO:)
AGEN1884w	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKGLEW VS (49)	RFTISRDNAKNSLYLQMN LRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVTVSS (51)
AGEN1885	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKGLEW VS (49)	RFTISRDNAKNSLYLQMN LRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVTVSS (51)
AGEN1886	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKGLEW VS (49)	RFTISRDNAKNSLYLQMN LRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVTVSS (51)
AGEN1887	EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFS (52)	WVRQAPGKGLVW VS (53)	RFTISRDNAKNSLYLQMN LRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVTVSS (51)
AGEN1888	EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFS (52)	WVRQAPGKGLVW VS (53)	RFTISRDNAKNSLYLQMN LRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVTVSS (51)
AGEN1889	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKGLEW VS (49)	RFTISRDNAKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCAR (54)	WGQGTMTVTVSS (51)
AGEN1890	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKGLEW VS (49)	RFTISRDNAKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCAR (54)	WGQGTMTVTVSS (51)

AGEN1891	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKGLEW VS (49)	RFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR (54)	WGQGTMTVSS (51)
AGEN1892	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKGLEW VS (49)	RFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR (54)	WGQGTMTVSS (51)
AGEN1893	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (55)	WVRQAPGKGLEW VS (49)	RFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVSS (51)
AGEN1894	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (55)	WVRQAPGKGLEW VS (49)	RFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVSS (51)
AGEN1895	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (55)	WVRQAPGKGLEW VS (49)	RFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVSS (51)
AGEN1896	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (55)	WVRQAPGKGLEW VS (49)	RFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVSS (51)
AGEN1897	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (52)	WVRQAPGKGLVW VS (53)	RFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVSS (51)
AGEN1898	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (52)	WVRQAPGKGLVW VS (53)	RFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVSS (51)
AGEN1899	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (52)	WVRQAPGKGLVW VS (53)	RFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVSS (51)
AGEN1900	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (52)	WVRQAPGKGLVW VS (53)	RFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVSS (51)
AGEN1901	EVQLVESGGGLVKPGGSLT LSCAASGFTFS (56)	WVRQAPGKGLEW VS (49)	RFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVSS (51)
AGEN1902	EVQLVESGGGLVKPGGSLT LSCAASGFTFS (56)	WVRQAPGKGLEW VS (49)	RFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVSS (51)

³ Каркасные области VH, описанные в табл. 4, определены на основе ограничений системы нумерации Кэбата для CDR-областей. Другими словами, CDR-области VH определены согласно Кэбату, и каркасные области являются аминокислотными остатками, окружающими CDR-области в вариабельной области в формате FR1, CDRH1, FR2, CDRH2, FR3, CDRH3 и FR4.

Таблица 5. Каркасные (FR) VL последовательности примерных антител против CTLA-4⁴

Антитело	VL FR1 (SEQ ID NO:)	VL FR2 (SEQ ID NO:)	VL FR3 (SEQ ID NO:)	VL FR4 (SEQ ID NO:)
AGEN1884w	EIVLTQSPGTLSSLSP GERATLSC (57)	WYQQKPGQAPRLI IY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTLTITR LEPEDFAVYYC (59)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1885	EIVLTQSPATLSSLSP GERATLSC (61)	WYQQKPGQAPSLI IY (64)	GIPDRFSGSVSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1886	EIVLTQSPATLSFSP GERATLSC (66)	WYQQKPGQAPRLI IY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTFTISR LEPEDFAVYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1887	EIVLTQSPGTLSSLSP GERATLSC (57)	WYQQKPGQAPRLI IY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTLTITR LEPEDFAVYYC (59)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1888	EIVLTQSPATLSFSP GERATLSC (66)	WYQQKPGQAPRLI IY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTFTISR LEPEDFAVYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1889	EIVLTQSPATLSSLSP GERATLSC (61)	WYQHKVGQAPRLI IY (62)	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1890	EIVLTQSPATLSFSP GERATLSC (66)	WYQQKPGQAPRLI IY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTFTISR LEPEDFAVYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1891	EIVLTQSPATLSVSP GERATLSC (69)	WYQQKPGQAPRLI IY (58)	GIPDRFSGSASGTDFTLTISR LEPEDFAVYYC (70)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1892	EIVLTQSPATLSSLSP GERATLSC (61)	WYQQKPGQAPRLI IY (58)	GIPARFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYC (71)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1893	EIVLTQSPATLSSLSP GERATLSC (61)	WYQHKVGQAPRLI IY (62)	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1894	EIVLTQSPGTLSSLSP GERATLSC (57)	WYQQKPGQAPRLI IY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTLTITR LEPEDFAVYYC (59)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1895	EIVLTQSPATLSSLSP GERATLSC (61)	WYQQKPGQAPSLI IY (64)	GIPDRFSGSVSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1896	EIVLTQSPATLSFSP GERATLSC (66)	WYQQKPGQAPRLI IY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTFTISR LEPEDFAVYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1897	EIVLTQSPGTLSSLSP GERATLSC (57)	WYQQKPGQAPRLI IY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTLTITR LEPEDFAVYYC (59)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1898	EIVLTQSPATLSSLSP GERATLSC (61)	WYQQKPGQAPSLI IY (64)	GIPDRFSGSVSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1899	EIVLTQSPATLSFSP GERATLSC (66)	WYQQKPGQAPRLI IY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTFTISR LEPEDFAVYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1900	EIVLTQSPATLSSLSP GERATLSC (61)	WYQQKPGQAPRLI IY (58)	GIPARFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYC (71)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1901	EIVLTQSPATLSSLSP GERATLSC (61)	WYQHKVGQAPRLI IY (62)	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1902	EIVLTQSPATLSFSP GERATLSC (66)	WYQQKPGQAPRLI IY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTFTISR LEPEDFAVYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)

⁴ Каркасные области VL, описанные в табл. 5, определены на основе ограничений системы нумерации

ции Кэбата для CDR-областей. Другими словами, CDR-области VL определены согласно Кэбату, и кар-касые области являются аминокислотными остатками, окружающими CDR-области в вариательной области в формате FR1, CDRL1, FR2, CDRL2, FR3, CDRL3 и FR4.

Таблица 6. VH и VL последовательности примерных антител против CTLA-4

Антитело	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
AGEN1884w	BADD411-2354	7	BADD412-2376	8
AGEN1885	BADD411-2354	7	BADD412-2382	44
AGEN1886	BADD411-2354	7	BADD412-2384	45
AGEN1887	BADD412-2356	38	BADD412-2376	8
AGEN1888	BADD412-2356	38	BADD412-2384	45
AGEN1889	BADD412-2357	39	BADD412-2367	43
AGEN1890	BADD412-2357	39	BADD412-2384	45
AGEN1891	BADD412-2357	39	BADD412-2390	46
AGEN1892	BADD412-2357	39	BADD412-2393	47
AGEN1893	BADD412-2358	40	BADD412-2367	43
AGEN1894	BADD412-2358	40	BADD412-2376	8
AGEN1895	BADD412-2358	40	BADD412-2382	44
AGEN1896	BADD412-2358	40	BADD412-2384	45
AGEN1897	BADD412-2359	41	BADD412-2376	8
AGEN1898	BADD412-2359	41	BADD412-2382	44
AGEN1899	BADD412-2359	41	BADD412-2384	45
AGEN1900	BADD412-2359	41	BADD412-2393	47
AGEN1901	BADD412-2360	42	BADD412-2367	43
AGEN1902	BADD412-2360	42	BADD412-2384	45

Таблица 7. Примерные последовательности CTLA-4 и представителей семейства

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
77	CTLA-4 человека (P16410)	MACLGFRHKAQLNLATRTWPCTLLFLLFIPVFCKAMHVAQPAVV LASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMG NELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPP YYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAV SLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN
78	эпитоп CTLA-4	QVT
79	эпитоп CTLA-4	YPPPYLIGIGNGTQI
80	эпитоп CTLA-4	YLG I
81	эпитоп CTLA-4	MYPPPY
82	эпитоп CTLA-4	YPPPYLGI
83	эпитоп CTLA-4	YLGIGNGTQI
84	CTLA-4 макака (G7PL88)	MACLGFRHKAQLNLATRTWPCTLLFLLFIPVFCKAMHVAQPAVV LANSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMG NELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPP YYMGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAV SLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN
85	CTLA-4 мыши (P09793)	MACLGLRRYKAQLQLPSRTWPFVALLTLLFIPVFSEAIQVTQPSVV LASSHGVASFVCEYSPSHNTDEVVRVTVLRQTNDQMTVECATTFTEK NTVGFLDYFPCSGTFNESRVNLTIQGLRAVDGTGLYICKVELMYPPP YFVGMGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWILVAVSLGLFFYSFVLSAV SLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN
86	CTLA-4 крысы (Q62859)	MACLGLQRYKTHLQLPSRTWPFVGLLSLLFIPVFSEAIQVTQPSVV LASSHGVASFVCEYASSHNTDEVVRVTVLRQTNDQMTVECATTFVTK NTLGLFDDPFCSGTFNESRVNLTIQGLRAADTGLYICKVELMYPPP YFVGMGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFVLTAV SLNRTLKKRSPLTTGVYVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN
87	CD28 человека (P10747)	MLRLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCYSYNL FSREFRSLHKGLDSEVVCVYGNYSQQLQVYSKTGFNC DGKLG ESVTFYQLNLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSGNTIIHVKGK HLCPSPFPFGPSKPFVWLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRS RLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
88	ICOS человека (Q9Y6W8)	MKSGLWYFFLFLCLRIKVLTEINGSANYEMFIFHNGGVQILCKYPD IVQQFKMQLLKGGQILCDLTKTKGSGNTVSIKSLKFCHS QLSNNSV SFFLYNLDSHSHANYFCNLSIFDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQ LKFWLPICGAFFVVCILGCILICWLTKKKYSSSVHPNGEYMFMR AVNTAKKSRLTDVTL
89	BTLA человека (Q7Z6A9)	MKTLPAMLGTGKLFVWFFLIPYLDIWNHKGESCDVQLYIKRQSEH SILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWCKLNGTTCVKLEDRQTSWKEE KNISFFILHFEFVLPNDNGSYRCSANFQSNLIESHSTLTLYVTDVKS ASERPSKDEMASRPWLLYRLPLGGLPLLITTCFCLFCLLRHQGK QNELSDTAGREINLVD AHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDP DLCFRMQEGSEVYSNPCL EENKPGIVYASLNH SVIGPNSRLARNVK EAPTEYASICVRS
90	PD-1 человека (Q15116)	MQIPQAPWPVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFSPALLVVTE GDNATFTCSFSNTSESFVLNWMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQD CRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSTYL CGAISLAPKAIKESL RAELRVTERRAEVPHTAHPSPRPAGQFQTLVVGVGGLGSLVLL VWVLAVICSRAARGTIGARTGQPLKEDPSAVPVFSDY GELDFQW REKTPPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQF LRPEDGHCWPL

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, включающее:

(а) CDRH1, включающую последовательность аминокислот SYX₁MX₂ (SEQ ID NO: 22), где X₁ представляет собой S или A; и X₂ представляет собой N или S; и/или

(b) CDRH2, включающую аминокислотную последовательность SSSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 2); и/или

(c) CDRH3, включающую аминокислотную последовательность VGLMGPFXI (SEQ ID NO: 23), где X представляет собой D или N; и/или

(d) CDRL1, включающую аминокислотную последовательность RASQSVX₁X₂YLX₃ (SEQ ID NO: 24), где X₁ представляет собой S или G; X₂ представляет собой R, S или T; и X₃ представляет собой G или A; и/или

(e) CDRL2, включающую аминокислотную последовательность X₁X₂SX₃RAT (SEQ ID NO: 25), где X₁ представляет собой G или A; X₂ представляет собой A или T; и X₃ представляет собой T, S, R или N;

и/или

(f) CDRL3, включающую аминокислотную последовательность QQYGX₁SPX₂T (SEQ ID NO: 26), где X₁ представляет собой S или T; и X₂ представляет собой W или F.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает одну, две или все три VH CDR-области, указанные выше. В некоторых вариантах осуществления антитело включает CDRH1 одного из антител в табл. 2. В некоторых вариантах осуществления антитело включает CDRH2 одного из антител в табл. 2. В некоторых вариантах осуществления антитело включает CDRH3 одного из антител в табл. 2. В некоторых вариантах осуществления антитело включает одну, две или все три VH CDR-области одного из антител в табл. 2 (например, VH CDR-области в одной строке табл. 2, например, все VH CDR-области - из антитела AGEN1884w). В некоторых вариантах осуществления антитело включает VH каркасные области, описанные в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления антитело включает VH каркасные области антитела, представленного в табл. 4 (например, одну, две, три или четыре каркасные области в одной строке табл. 4).

В некоторых вариантах осуществления антитело включает одну, две или все три VL CDR-области, указанные выше. В некоторых вариантах осуществления антитело включает CDRL1 одного из антител в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления антитело включает CDRL2 одного из антител в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления антитело включает CDRL3 одного из антител в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления антитело включает одну, две или все три VL CDR-области одного из антител в табл. 3 (например, VL CDR-области в одной строке табл. 3, например все VL CDR-области - из антитела AGEN1884w). В некоторых вариантах осуществления антитело включает VL каркасные области, описанные в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления антитело включает VL каркасные области (FR) антитела, представленного в табл. 5 (например, одну, две, три или четыре каркасные области в одной строке табл. 5).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, включающее варируемую область тяжелой цепи, включающую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3 и варируемую область легкой цепи, включающую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:

(a) CDRH1 включает аминокислотную последовательность SYX₁MX₂ (SEQ ID NO: 22), где X₁ представляет собой S или A; и X₂ представляет собой N или S;

(b) CDRH2 включает аминокислотную последовательность SSSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 2);

(c) CDRH3 включает аминокислотную последовательность VGLMGPFXI (SEQ ID NO: 23), где X представляет собой D или N;

(d) CDRL1 включает аминокислотную последовательность RASQSVX₁X₂YLX₃ (SEQ ID NO: 24), где X₁ представляет собой S или G; X₂ представляет собой R, S или T; и X₃ представляет собой G или A;

(e) CDRL2 включает аминокислотную последовательность X₁X₂SX₃RAT (SEQ ID NO: 25), где X₁ представляет собой G или A; X₂ представляет собой A или T; и X₃ представляет собой T, S, R или N; и

(f) CDRL3 включает аминокислотную последовательность QQYGX₁SPX₂T (SEQ ID NO: 26), где X₁ представляет собой S или T; и X₂ представляет собой W или F.

В некоторых вариантах осуществления CDRH1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 27. В некоторых вариантах осуществления CDRH3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и 28. В некоторых вариантах осуществления CDRL1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 29 и 30. В некоторых вариантах осуществления CDRL2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 31-35. В некоторых вариантах осуществления CDRL3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 36 и 37. В некоторых вариантах осуществления CDRH1, CDRH2 и CDRH3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, соответственно, антитела в табл. 2. В некоторых вариантах осуществления CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3, соответственно, антитела в табл. 3.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, включающее варируемую область тяжелой цепи, включающую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, соответственно, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3; 27, 2 и 3; или 27, 2 и 28.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, включающее варируемую область легкой цепи, включающую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3, соответственно, представленные в SEQ ID NO: 4, 5 и 6; 29, 32 и 36; 29, 33 и 37; 30, 31 и 6; 29, 34 и 6; или 29, 35 и 37.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено выделенное антитело,

которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, включающее переменную область тяжелой цепи, включающую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, включающую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3, соответственно, представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6; 1, 2, 3, 29, 32 и 36; 1, 2, 3, 29, 33 и 37; 27, 2, 3, 4, 5 и 6; 27, 2, 3, 29, 33 и 37; 1, 2, 3, 30, 31 и 6; 1, 2, 3, 29, 34 и 6; 1, 2, 3, 29, 35 и 37; 27, 2, 28, 4, 5 и 6; 27, 2, 28, 29, 32 и 36; 27, 2, 28, 29, 33 и 37; или 27, 2, 28, 29, 35 и 37 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает переменную область тяжелой цепи, включающую CDRH1, CDRH2 и CDRH3 области, и переменную область легкой цепи, включающую CDRL1, CDRL2 и CDRL3 области, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 области включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления CDR-области антитела могут быть определены согласно схеме нумерации Чотиа, которая относится к положению структурных петель иммуноглобулина (см., например, Chothia C. & Lesk A.M. (1987), *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Al-Lazikani B. et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 273: 927-948; Chothia C. et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227: 799-817; Tramontano A. et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215(1): 175-82; и патент США 7709226). Как правило, при использовании правила нумерации Кэбата, петля CDRH1 Чотиа присутствует в аминокислотах тяжелой цепи 26-32, 33 или 34, петля CDRH2 Чотиа присутствует в аминокислотах тяжелой цепи 52-56, и петля CDRH3 Чотиа присутствует в аминокислотах тяжелой цепи 95-102, тогда как петля CDRL1 Чотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи 24-34, петля CDRL2 Чотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи 50-56, и петля CDRL3 Чотиа присутствует в аминокислотах легкой цепи 89-97. Конец петли CDRH1 Чотиа при нумерации с использованием правила нумерации Кэбата изменяется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это вызвано тем, что схема нумерации Кэбат помещает вставки в H35A и H35B; если не присутствует ни 35A, ни 35B, петля оканчивается в 32; если присутствуют только 35A, петля оканчивается в 33; если присутствуют и 35A, и 35B, петля оканчивается в 34).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, причем антитело включает VL CDR-области Чотиа из VL антитела, раскрытого в табл. 6 в настоящей заявке (например, AGEN1884w или AGEN2041w). В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, причем антитело включает VH CDR-области Чотиа антитела, раскрытого в табл. 6 в настоящей заявке (например, AGEN1884w или AGEN2041w). В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, причем антитело включает VH CDR-области Чотиа и VL CDR-области Чотиа антитела, раскрытого в табл. 6 в настоящей заявке (например, AGEN1884w или AGEN2041w). В некоторых вариантах осуществления антитела, которые специфично связываются с человеческим белком CTLA-4, включают одну или более CDR-областей, где CDR-области Чотиа и Кэбата имеют одну и ту же аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4 и включает комбинации CDR-областей Кэбата и CDR-областей Чотиа.

В некоторых вариантах осуществления CDR-области антитела могут быть определены согласно системе нумерации IMGT, как описано в Lefranc M-P. (1999) *The Immunologist* 7: 132-136 и Lefranc M-P. et al. (1999) *Nucleic Acids Res.* 27: 209-212. Согласно схеме нумерации IMGT, CDRH1 присутствует в положениях 26-35, CDRH2 присутствует в положениях 51-57, CDRH3 присутствует в положениях 93-102, CDRL1 присутствует в положениях 27-32, CDRL2 присутствует в положениях 50-52, и CDRL3 присутствует в положениях 89-97. В определенном варианте осуществления в настоящем описании предложены антитела, которые специфично связываются с человеческим белком CTLA-4 и включают CDR-области антитела, раскрытого в табл. 6 в настоящей заявке (например, AGEN1884w или AGEN2041w), при определении с помощью системы нумерации IMGT, например, как описано в Lefranc M-P (1999) выше и Lefranc M-P. et al. (1999) выше.

В некоторых вариантах осуществления CDR-области антитела могут быть определены согласно MacCallum R.M. et al. (1996) *J. Mol. Biol.* 262: 732-745. См. также, например, Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains", в *Antibody Engineering*, Kontermann and Dubel, eds., глава 31, стр. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001). В определенном варианте осуществления в настоящем описании предложены антитела, которые специфично связываются с человеческим белком CTLA-4 и включают CDR-области антитела, раскрытого в табл. 6 в настоящей заявке (например, AGEN1884w или AGEN2041w), при определении с помощью метода в MacCallum R.M. et al.

В некоторых вариантах осуществления CDR-области антитела могут быть определены согласно схеме нумерации AbM, которая относится к гиперпеременной областям AbM, которые представляют собой компромисс между CDR-областями Кэбата и структурными петлями Чотиа, и используется в про-

грамме моделирования антител Oxford Molecular AbM (Oxford Molecular Group, Inc.). В определенном варианте осуществления в настоящем описании предложены антитела, которые специфично связываются с человеческим белком CTLA-4 и включают CDR-области антитела, раскрытого в табл. 6 в настоящей заявке (например, AGEN1884w или AGEN2041w), при определении с помощью схемы нумерации AbM.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, где антитело включает переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 областей, представленные в SEQ ID NO: 7, и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 областей, представленные в SEQ ID NO: 8, где каждая CDR определена в соответствии с определением Кэбата, определением Чотиа, комбинацией определения Кэбата и определения Чотиа, системой нумерации IMGT, определением AbM или контактным определением CDR.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, причем антитело включает переменную область тяжелой цепи, включающую CDRH1, CDRH2 и CDRH3 области, и переменную область легкой цепи, включающую CDRL1, CDRL2 и CDRL3 области, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 области включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19, 20 и 21 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, включающее переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, включающее переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, полученную из последовательности зародышевой линии IGHV3-21 человека. Одна или более областей, выбранных из каркасной области 1, каркасной области 2, каркасной области 3, CDRH1 и CDRH2 (например, двух, трех, четырех или пяти из этих областей), могут быть получены из последовательности зародышевой линии IGHV3-21 человека. В одном варианте осуществления каркасная область 1, каркасная область 2, каркасная область 3, CDRH1 и CDRH2 получены из последовательности зародышевой линии IGHV3-21 человека.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем описании предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, включающее переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% (например, по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 38-42. В некоторых вариантах осуществления антитело включает переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 38-42. В некоторых вариантах осуществления антитело включает переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94. В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 97.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, включающее переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, включающее переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, полученную из последовательности зародышевой линии IGKV3-20 или IGKV3-11 человека. Одна или более областей, выбранных из каркасной области 1, каркасной области 2, каркасной области 3, CDRL1 и CDRL2 (например, двух, трех, четырех или пяти из этих областей), могут быть получены из последовательности зародышевой линии IGKV3-20 или IGKV3-11 человека. В одном варианте осуществления каркасная область 1, каркасная область 2, каркасная область 3, CDRL1 и CDRL2 получены из последовательности зародышевой линии IGKV3-20 или IGKV3-11 человека.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем описании предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, включающее переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%)

идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 43-47. В некоторых вариантах осуществления антитело включает вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 43-47. В некоторых вариантах осуществления антитело включает вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело включает легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления антитело включает легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, включающее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, полученную из последовательности зародышевой линии IGHV3-21 человека, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, полученную из последовательности зародышевой линии IGKV3-20 или IGKV3-11 человека. Одна или более областей, выбранных из каркасной области 1, каркасной области 2, каркасной области 3, CDRH1 и CDRH2 (например, двух, трех, четырех или пяти из этих областей), могут быть получены из последовательности зародышевой линии IGHV3-21 человека. В одном варианте осуществления каркасная область 1, каркасная область 2, каркасная область 3, CDRH1 и CDRH2 получены из последовательности зародышевой линии IGHV3-21 человека. Одна или более областей, выбранных из каркасной области 1, каркасной области 2, каркасной области 3, CDRL1 и CDRL2 (например, двух, трех, четырех или пяти из этих областей), могут быть получены из последовательности зародышевой линии IGKV3-20 или IGKV3-11 человека. В одном варианте осуществления каркасная область 1, каркасная область 2, каркасная область 3, CDRL1 и CDRL2 получены из последовательности зародышевой линии IGKV3-20 или IGKV3-11 человека.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим белком CTLA-4, включающее вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% (например, по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 38-42, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% (например, по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 43-47. В некоторых вариантах осуществления антитело включает вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 38-42, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 43-47. В некоторых вариантах осуществления антитело включает аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 7 и 8; 7 и 44; 7 и 45; 38 и 8; 38 и 45; 39 и 43; 39 и 45; 39 и 46; 39 и 47; 40 и 43; 40 и 8; 40 и 44; 40 и 45; 41 и 8; 41 и 44; 41 и 45; 41 и 47; 42 и 43; или 42 и 45 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем описании предложено выделенное антитело, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим белком CTLA-4 с антителом, включающим аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем описании предложено выделенное антитело, которое связывается с тем же эпитопом на человеческом белке CTLA-4, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи, представленные в

SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно.

Любая константная область Ig может использоваться в антителах, раскрытых в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления область Ig является константной областью тяжелой цепи IgG₁ человека или IgG₂ человека.

В некоторых вариантах осуществления IgG области антител, описанных в настоящей заявке, обладают увеличенной аффинностью к CD32B (также известному как FcγRIIB или FCGR2B), например, по сравнению с антителом с Fc-областью дикого типа, например, Fc IgG₁. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящей заявке, обладают селективно увеличенной аффинностью к CD32B (FcγRIIB) по сравнению с CD32A (FcγRIIA) и CD16 (FcγRIIIA). Изменения последовательности, которые приводят к увеличению аффинности к CD32B, известны в уровне техники, например, в Mimoto et al., *Protein Engineering, Design & Selection* 10: 589-598 (2013), Chu et al., *Molecular Immunology* 45: 3926-3933 (2008) и Strohl, *Current Opinion in Biology* 20: 685-691 (2009), каждый из которых полностью включен в настоящую заявку посредством отсылки. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие мутацию, выбранную из группы, состоящей из G236D, P238D, S239D, S267E, L328F и L328E и их комбинаций, при нумерации согласно индексу EU (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda (1991)). В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие замены S267E и L328F. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие замены P238D и L328E. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие замены P238D и замену, выбранную из группы, состоящей из E233D, G237D, H268D, P271G, A330R и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие замены P238D, E233D, G237D, H268D, P271G и A330R. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие G236D и S267E. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие S239D и S267E. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие V262E, S267E и L328F. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие V264E, S267E и L328F.

В некоторых вариантах осуществления IgG области антител, описанных в настоящей заявке, обладают увеличенной аффинностью к FcγRIIA, например, по сравнению с антителом с Fc-областью дикого типа, например, Fc IgG₁. Изменения последовательности, которые приводят к увеличению аффинности к FcγRIIA, известны в уровне техники, например, в Kellner et al., *Methods* 65: 105-113 (2014), Lazar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 4005-4010 (2006), Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276(9):6591-6604 (2001), каждый из которых полностью включен в настоящую заявку посредством отсылки. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие мутацию, выбранную из группы, состоящей из G236A, S239D, F243L, T256A, K290A, R292P, S298A, Y300L, V305I, A330L, I332E, E333A, K334A, A339T и P396L и их комбинаций, при нумерации согласно индексу EU (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda (1991)). В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие S239D. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие T256A. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие K290A. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие S298A. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие I332E. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие E333A. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие K334A. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие A339T. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие S239D и I332E. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие S239D, A330L и I332E. В некоторых вариантах осуществления антитело

включает константную область тяжелой цепи, например константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие S298A, E333A и K334A. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие G236A, S239D и I332E. В некоторых вариантах осуществления антитело включает константную область тяжелой цепи, например константную область IgG₁ или ее фрагмент, включающие F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L.

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящей заявке, демонстрируют активность в виде антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящей заявке, инициируют опосредованное естественными киллерными клетками клеточное истощение. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящей заявке, используются для лечения опухоли, инфильтрированной естественными киллерными клетками. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящей заявке, демонстрируют активность в виде антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP). В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящей заявке, инициируют опосредованное макрофагами клеточное истощение. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящей заявке, применяются для лечения опухоли, инфильтрированной макрофагами. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящей заявке, селективно истощают интратуморальные регуляторные Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления антитело, раскрытое в настоящей заявке, является активируемым антителом, которое в активированном состоянии связывает человеческий белок CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает маскирующую молекулу, которая ингибирует связывание антитела в нерасщепленном состоянии с человеческим белком CTLA-4, и по меньшей мере одну отщепляемую молекулу, соединенную с антителом, например, где отщепляемая молекула является полипептидом, который функционирует как субстрат для протеазы, которой обогащено микроокружение опухоли. Примерные активируемые антитела описаны, например, в патентах США 8513390 и 8518404 и в публикациях заявок на патент США US 2014/0255313, US 2014/0010810, US 2014/0023664, которые включены в настоящую заявку посредством отсылки. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает константную область тяжелой цепи человеческого IgG, которая является вариантом константной области тяжелой цепи человеческого IgG дикого типа, где вариант константной области тяжелой цепи человеческого IgG связывается с человеческим FcγRIIIA с более высокой аффинностью, чем константная область тяжелой цепи человеческого IgG дикого типа связывается с человеческим FcγRIIIA.

5.3. Фармацевтические композиции.

В настоящей заявке предложены композиции, включающие антитело против CTLA-4, описанное в настоящей заявке, обладающие требуемой степенью чистоты в физиологически приемлемом носителе, вспомогательное вещество или стабилизатор (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат, и другие органические кислоты; антиоксиданты, включающие 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; пирокатехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (меньше чем приблизительно 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, в том числе глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие вещества, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахарозу, маннит, трегалозу или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, Zn-белковые комплексы); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEENTM, PLURONICSTM или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

В определенном варианте осуществления фармацевтические композиции включают антитело против CTLA-4, описанное в настоящей заявке, и, необязательно, одно или более дополнительных профилактических или терапевтических средств, в фармацевтически приемлемом носителе. В определенном варианте осуществления фармацевтические композиции включают эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящей заявке, и, необязательно, одно или более дополнительных профилактических или терапевтических средств, в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах осуществления антитело является единственным действующим веществом, включенным в фармацевтическую композицию.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящей заявке, могут применяться при ингибировании активности CTLA-4 и лечении состояния, такого как рак или инфекционное заболевание.

В одном аспекте, в настоящей заявке предложена фармацевтическая композиция, включающая ан-

титело против CTLA-4 согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, для применения в качестве лекарственного средства.

В одном аспекте, в настоящей заявке предложена фармацевтическая композиция, включающая антитело против CTLA-4 согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, для применения в способе лечения рака.

Фармацевтически приемлемые носители, применяемые в препаратах для парентерального применения, включают водные растворители, неводные растворители, противомикробные средства, изотонические вещества, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие вещества, эмульгирующие вещества, комплексообразователи или хелатообразующие вещества и другие фармацевтически приемлемые вещества. Примеры водных растворителей включают раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, изотонический раствор декстрозы для инъекций, стерильную воду для инъекций, раствор декстрозы и лактированный раствор Рингера для инъекций. Неводные растворители для парентерального применения включают нелетучие масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и арахисовое масло. Противомикробные средства в бактериостатических или фунгистатических концентрациях могут быть добавлены к препаратам для парентерального применения, упакованным в многодозовых контейнерах, которые включают фенолы или крезолы, препараты ртути, бензиловый спирт, хлорбутанол, метиловый и пропиловый сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты, тимеросал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. Изотонические вещества включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфат и цитрат. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. Местные анестетики включают прокаина гидрохлорид. Суспендирующие и диспергирующие вещества включают натрий карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон.

Эмульгирующие вещества включают Полисорбат 80 (TWEEN® 80). Комплексообразователи или хелатообразователи ионов металлов включают ЭДТА. Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль в случае смешивающихся с водой растворителей; и гидроксид натрия, соляную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для регулирования pH.

Фармацевтическая композиция может быть изготовлена для любого пути введения субъекту. Определенные примеры путей введения включают интраназальный, пероральный, пульмональный, трансдермальный, кожный и парентеральный. Парентеральное введение, для которого характерна подкожная, внутримышечная или внутривенная инъекция, также предусмотрено в настоящей заявке.

Препараты для инъекций могут быть изготовлены в стандартных формах, либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий, твердых форм, подходящих для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, либо в виде эмульсий. Препараты для инъекций, растворы и эмульсии также содержат одно или более вспомогательных веществ. Подходящими вспомогательными веществами являются, например, вода, раствор хлорида натрия, декстроза, глицерин или этанол. Кроме того, при необходимости фармацевтические композиции, которые будут вводить, также могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, такие как смачивающие или эмульгирующие вещества, pH-буферные вещества, стабилизаторы, повышающие растворимость вещества и другие подобные вещества, такие как, например, ацетат натрия, сорбитан монолаурат, олеат триэтаноламина и циклодекстрины.

Препараты для парентерального введения антитела включают стерильные растворы, готовые для инъекций, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые для объединения с растворителем непосредственно перед применением, в том числе подкожные таблетки, стерильные суспензии, готовые для инъекций, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые для объединения с разбавителем непосредственно перед применением, и стерильные эмульсии. Растворы могут быть водными или неводными.

В случае внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) и растворы, содержащие загустители и солюбилизаторы, такие как глюкозу, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль и их смеси.

Смеси для наружного применения, включающие антитело, изготавливают, как описано для местного и системного введения. Готовая смесь может быть раствором, суспензией, эмульсией и т.п. и может быть изготовлена в виде кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, настоев, лосьонов, суспензий, tinkтур, паст, пен, аэрозолей, растворов для промывания, спреев, суппозитория, повязок, трансдермальных пластырей или любых других препаратов, подходящих для наружного применения.

Антитело против CTLA-4, описанное в настоящей заявке, может быть изготовлено в форме аэрозоля для наружного применения, такого как ингаляция (см., например, патенты США 4044126, 4414209 и 4364923, в которых описаны аэрозоли для доставки стероида, применимые для лечения воспалительных заболеваний, в особенности астмы). Такие лекарственные формы для введения в дыхательные пути могут находиться в форме аэрозоля или раствора для небулайзера, или в виде микродисперсного порошка для инсуффляций, отдельно или в комбинации с инертным носителем, таким как лактоза. В таком случае частицы лекарственной формы, в одном варианте осуществления, будут иметь диаметр меньше 50 мкм, в одном варианте осуществления меньше 10 мкм.

Антитело против CTLA-4, описанное в настоящей заявке, может быть изготовлено в лекарственной форме для местного или наружного применения, например для наружного применения на кожу и слизистые оболочки, например в глаз, в форме гелей, кремов и лосьонов, и для применения в глаз или интрацестерального или интраспинального применения. Наружное применение предусмотрено для трансдермальной доставки, а также для введения в глаза или на слизистую оболочку, или для ингаляционной терапии. Также могут вводить назальные растворы антитела, отдельно или в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

Трансдермальные пластыри, включая ионтофоретические и электрофоретические устройства, известны специалистам в данной области и могут применяться для введения антитела. Например, такие пластыри раскрыты в патентах США 6267983, 6261595, 6256533, 6167301, 6024975, 6010715, 5985317, 5983134, 5948433 и 5860957.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, включающая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящей заявке, является лиофилизированным порошком, который может быть восстановлен для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Она также может быть восстановлена и изготовлена в форме твердых веществ или гелей. Леофилизированный порошок изготавливают при растворении антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящей заявке, или их фармацевтически приемлемого производного, в подходящем растворителе. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный порошок является стерильным. Растворитель может содержать вспомогательное вещество, которое повышает стабильность, или другой фармакологический компонент порошка, или восстановленный раствор, приготовленный из порошка. Вспомогательные вещества, которые могут применяться, включают, без ограничения перечисленными, декстрозу, сорбит, фруктозу, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу или другое подходящее вещество. Растворитель также может содержать буфер, такой как цитратный, натрий или калий-фосфатный или другой такой буфер, известный специалистам в данной области, в одном варианте осуществления, приблизительно при нейтральном pH. Последующая стерилизация раствора фильтрованием, сопровождаемая лиофилизацией при стандартных условиях, известных специалистам в данной области, дает требуемую лекарственную форму. В одном варианте осуществления готовый раствор дозируют во флаконы для лиофилизации. Каждый флакон будет содержать однократную дозу или множество доз соединения. Леофилизированный порошок можно хранить в подходящих условиях, таких как при температуре от приблизительно 4°C до комнатной температуры. Восстановление такого лиофилизированного порошка водой для инъекций обеспечивает лекарственную форму для применения при парентеральном введении. Для восстановления лиофилизированный порошок добавляют в стерильную воду или другой подходящий носитель. Точное количество зависит от выбранного соединения. Такое количество может быть определено эмпирически.

Антитела против CTLA-4, описанные в настоящей заявке, и другие композиции, предложенные в настоящей заявке, также могут быть изготовлены в лекарственной форме для направленного воздействия на конкретную ткань, рецептор или другую область тела субъекта, подвергаемого лечению. Множество таких способов направленного воздействия известно специалистам в данной области. Все такие способы направленного воздействия рассматриваются в настоящей заявке для применения в настоящих композициях. В отношении неограничивающих примеров способов направленного воздействия см., например, патенты США 6316652, 6274552, 6271359, 6253872, 6139865, 6131570, 6120751, 6071495, 6060082, 6048736, 6039975, 6004534, 5985307, 5972366, 5900252, 5840674, 5759542 и 5709874. В определенном варианте осуществления антитела или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящей заявке, направленно воздействуют на опухоль.

Композиции, которые будут применяться для введения *in vivo*, могут быть стерильными. Это с легкостью достигается при фильтровании через, например, стерильные фильтрующие мембраны.

5.4. Способы применения.

В другом аспекте настоящего описания предложен способ лечения субъекта с применением антител против CTLA-4, раскрытых в настоящей заявке. Любое заболевание или нарушение у субъекта, при котором эффективно ингибирование функции CTLA-4, можно лечить с применением антител против CTLA-4, раскрытых в настоящей заявке. Антитела против CTLA-4, раскрытые в настоящей заявке, особенно применимы для ингибирования толерантности иммунной системы к опухолям и, соответственно, могут применяться в качестве иммунотерапии для субъектов с раком. Например, в некоторых вариантах осуществления, в настоящем описании предложен способ увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, где способ включает введение субъекту эффективного количества антитела против CTLA-4 или его фармацевтической композиции, как раскрыто в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем описании предложен способ лечения рака у субъекта, где способ включает введение субъекту эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, как раскрыто в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал иммунотерапию. В некоторых вариантах осуществления рак является распространенным или метастатическим раком. Раковые опухоли, которые можно лечить антителами против CTLA-4 или фармацевтическими композициями, раскры-

тыми в настоящей заявке, включают, без ограничения, солидный рак (например, рецидивирующий или рефрактерный солидный рак и распространившийся или метастатический солидный рак), карциному, саркому, меланому (например, меланому III стадии или IV стадии), мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, уротелиальный рак, рак яичника, рак предстательной железы (например, метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы и прогрессирующий метастатический рак предстательной железы), рак поджелудочной железы, рак молочной железы (например, HER2+ рак молочной железы (например, рецидивирующий/рефрактерный HER2+ рак молочной железы)), рак головы и шеи (например, рецидивирующую/рефрактерную плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC)), глиому, злокачественную глиому, мультиформную глиобластому, метастаз в головной мозг, рак из клеток Меркеля, рак желудка, гастроэзофагеальный рак, почечно-клеточный рак, увеальную меланому, рак толстой кишки, рак шейки матки, лимфому (например, рецидивирующую или рефрактерную лимфому), неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, лейкоз и множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления рак лечат путем интратуморального введения антител против CTLA-4 или фармацевтических композиций, раскрытых в настоящей заявке. Раковые опухоли, которые можно лечить путем интратуморального введения антител против CTLA-4 или фармацевтических композиций, раскрытых в настоящей заявке, включают, без ограничения, солидные опухоли (например, распространившиеся или метастатические солидные опухоли), рак головы и шеи (например, рецидивирующую/рефрактерную плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC)) и рак молочной железы (например, HER2+ рак молочной железы (например, рецидивирующий/рефрактерный HER2+ рак молочной железы)).

Дополнительные онкологические заболевания, которые можно лечить антителами против CTLA-4 или фармацевтическими композициями, раскрытыми в настоящей заявке, включают, без ограничения, В-клеточные лимфомы (например, В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз, В-клеточную неходжкинскую лимфому, кожную В-клеточную лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому), базальноклеточную карциному, рак мочевого пузыря, бластому, метастаз в головной мозг, рак молочной железы, лимфому Беркитта, карциному (например, аденокарциному (например, гастроэзофагеального перехода)), рак шейки матки, рак толстой кишки, рак толстой и прямой кишки (рак толстой кишки и рак прямой кишки), карциному эндометрия, рак пищевода, саркому Юинга, фолликулярную лимфому, рак желудка, карциному гастроэзофагеального перехода, желудочно-кишечный рак, глиобластому (например, мультиформную глиобластому, например, недавно диагностированную или рецидивирующую), глиому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточную карциному головы и шеи), метастаз печени, лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому, рак почки (например, почечно-клеточную карциному и опухоли Вильмса), рак гортани, лейкоз (например, хронический миелоцитарный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз), рак печени (например, карциному печени и гепатому), рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого и мелкоклеточный рак легкого), лимфобластную лимфому, лимфому, мантийноклеточную лимфому, метастатическую опухоль головного мозга, метастатический рак, миелому (например, множественную миелому), нейробластому, глазную меланому, ротоглоточный рак, остеосаркому, рак яичника, рак поджелудочной железы (например, протоковую аденокарциному поджелудочной железы), рак предстательной железы (например, гормонорезистентный (например, кастрационно-резистентный), метастатический, метастатический гормонорезистентный (например, кастрационно-резистентный, андрогеннезависимый)), почечно-клеточную карциному (например, метастатическую), карциному слюнной железы, саркому (например, рабдомиосаркому), рак кожи (например, меланому (например, метастатическую меланому)), саркому мягких тканей, солидную опухоль, плоскоклеточную карциному, синовиальную саркому, рак яичка, рак щитовидной железы, переходно-клеточный рак (уротелиальноклеточный рак), увеальную меланому (например, метастатическую), веррукозную карциному, рак вульвы и макроглобулинемию Вальденстрема.

В некоторых вариантах осуществления рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, является саркомой или карциномой человека, например, фибросаркомой, миксосаркомой, липосаркомой, хондросаркомой, остеогенной саркомой, хордомой, ангиосаркомой, эндотелиосаркомой, лимфангиосаркомой, лимфангиоэндотелиосаркомой, синовиомой, мезотелиомой, опухолью Юинга, лейомиосаркомой, рабдомиосаркомой, карциномой толстой кишки, раком поджелудочной железы, раком молочной железы, раком яичника, раком предстательной железы, плоскоклеточной карциномой, базальноклеточной карциномой, аденокарциномой, карциномой потовой железы, карциномой слюнной железы, папиллярной карциномой, папиллярной аденокарциномой, цистаденокарциномой, медуллярной карциномой, бронхогенной карциномой, почечноклеточной карциномой (например, метастатической), гепатомой, карциномой желчных протоков, хориокарциномой, семиномой, эмбриональной карциномой, опухолью Вильмса, раком шейки матки, опухолью яичка, карциномой легкого, мелкоклеточной карциномой легкого, карциномой мочевого пузыря, эпителиальной карциномой, глиомой, мультиформной глиобластомой, астроцитомой, медуллобластомой, краниофарингиомой, эпендимомой, пинеаломой, гемангиобластомой, невриномой слухового нерва, олигодендроглиомой, менингиомой, меланомой, нейробластомой или ретинобластомой. В некоторых вариантах осуществления рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, является острым лимфоцитарным лейкозом или острым миелоцитарным лейкозом (например, миелобластным, промиелоцитарным, миело-

моноцитарным, моноцитарным и эритролейкозом); хроническим лейкозом (хроническим миелоцитарным (гранулоцитарным) лейкозом или хроническим лимфоцитарным лейкозом); болезнью Ходжкина; неходжкинской лимфомой; острым миелоидным лейкозом; В-клеточной лимфомой; Т-клеточной лимфомой; анапластической крупноклеточной лимфомой; внутриглазной лимфомой; фолликулярной лимфомой; лимфомой тонкой кишки; или лимфомой маргинальной зоны селезенки. В некоторых вариантах осуществления рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, является множественной миеломой, макроглобулинемией Вальденстрема, болезнью тяжелых цепей, желудочно-кишечными стромальными опухолями, раком головы и/или шеи (например, плоскоклеточной карциномой гортаноглотки, плоскоклеточной карциномой гортани, клеточной карциномой ротоглотки или веррукозной карциномой гортани), стромальной саркомой эндометрия, тучноклеточной саркомой, саркомой мягких тканей взрослых, саркомой матки, карциномой из клеток Меркеля, уротелиальной карциномой, меланомой с метастазами в головном мозге, увеальной меланомой, увеальной меланомой с метастазами в печени, немелкоклеточным раком легкого, раком прямой кишки или миелодиспластическим синдромом. В некоторых вариантах осуществления рак, который лечат в соответствии с настоящими способами, является метастатическим.

В некоторых вариантах осуществления рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, включает рак предстательной железы, рак молочной железы, рак легкого, рак толстой и прямой кишки, меланому, бронхиальный рак, рак мочевого пузыря, рак головного мозга или центральной нервной системы, рак периферической нервной системы, рак матки или эндометрия, рак ротовой полости или глотки, неходжкинскую лимфому, рак щитовидной железы, рак почки, рак желчных протоков, рак тонкой кишки или аппендикса, рак слюнной железы, рак щитовидной железы, рак надпочечника, плоскоклеточный рак, мезотелиому, остеосаркому, тимому/карциному тимуса, глиобластому, миелодиспластический синдром, саркому мягких тканей, DIPG, аденокарциному, остеогенную саркому, хондросаркому, лейкоз или рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, включает рак (например, аденокарциному), лимфому, бластому, меланому, саркому или лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, включает плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, желудочно-кишечный рак, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рак поджелудочной железы, глиобластому, глиому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени (например, карциному печени и гепатому), рак мочевого пузыря, рак молочной железы, воспалительный рак молочной железы, карциному из клеток Меркеля, рак толстой кишки, рак толстой и прямой кишки, рак желудка, рак мочевого пузыря, карциному эндометрия, миелому (например, множественную миелому), карциному слюнной железы, рак почки (например, почечно-клеточную карциному и опухоли Вильмса), базальноклеточную карциному, меланому, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, рак яичка, рак пищевода, серозную аденокарциному или различные типы рака головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, включает десмопластическую меланому, воспалительный рак молочной железы, тимому, рак прямой кишки, рак анального канала или поддающуюся хирургическому лечению или не поддающуюся хирургическому лечению глиому ствола головного мозга. В определенном варианте осуществления рак является солидной опухолью. В другом определенном варианте осуществления рак является мультиформной глиобластомой. В некоторых вариантах осуществления мультиформная глиобластома является рецидивирующей. В некоторых вариантах осуществления мультиформная глиобластома является недавно диагностированной. В некоторых вариантах осуществления мультиформная глиобластома находится у субъекта, имеющего неметилированные промоторы MGMT. В некоторых вариантах осуществления мультиформная глиобластома является рефрактерной к терапии бевацизумабом. В некоторых вариантах осуществления мультиформная глиобластома находится у субъекта, который не получал терапии бевацизумабом.

В некоторых вариантах осуществления рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, является метастатической меланомой (например, резистентной метастатической меланомой), метастатическим раком яичника или метастатической почечно-клеточной карциномой. В некоторых вариантах осуществления рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, является меланомой, которая является резистентной к ипилимумабу. В некоторых вариантах осуществления рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, является меланомой, которая является резистентной к ниволумабу или пембролизумабу. В некоторых вариантах осуществления рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, является меланомой, которая является резистентной к ипилимумабу и ниволумабу или пембролизумабу.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложен способ предотвращения или лечения инфекционного заболевания у субъекта, где способ включает введение субъекту эффективного количества антитела против CTLA-4 или его фармацевтической композиции, как раскрыто в настоящей заявке. В одном варианте осуществления в настоящей заявке предложены способы предотвращения и/или лечения инфекции (например, вирусной инфекции, бактериальной инфекции, микоза, про-

тозойной инфекции или паразитарной инфекции). Инфекция, которую предотвращают и/или лечат в соответствии с настоящими способами, может быть вызвана возбудителем, определенным в настоящей заявке. В определенном варианте осуществления антитело против CTLA-4, описанное в настоящей заявке, или его композиция являются единственным действующим средством, которое вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4, описанное в настоящей заявке, или его композицию применяют в комбинации с противоинфекционной терапией (например, противовирусными средствами, противобактериальными средствами, противогрибковыми средствами или противогельминтными средствами) для лечения инфекционных заболеваний.

Инфекционные заболевания, которые можно лечить и/или предотвращать антителами против CTLA-4 или фармацевтическими композициями, раскрытыми в настоящей заявке, вызваны возбудителями, включающими, без ограничения перечисленными, бактерии, паразиты, грибы, простейшие и вирусы. В определенном варианте осуществления инфекционное заболевание, которое лечат и/или предотвращают антителами против CTLA-4 или фармацевтическими композициями, раскрытыми в настоящей заявке, вызвано вирусом. Вирусные заболевания или вирусные инфекции, которые можно предотвращать и/или лечить в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, включают, без ограничения перечисленными, инфекции, вызванные вирусом гепатита А, гепатита В, гепатита С, гриппа (например, гриппа А или гриппа В), ветряной оспы, аденовирусом, вирусом простого герпеса I типа (HSV-I), простого герпеса II типа (HSV-II), вирусом чумы крупного рогатого скота, риновирусом, эховирусом, ротавирусом, респираторно-синцитиальным вирусом, вирусом папилломы, паповавирусом, цитомегаловирусом, эхиновирусом, арбовирусом, хантавирусом, вирусом Коксаки, вирусом эпидемического паротита, вирусом кори, вирусом краснухи, полиовирусом, вирусом натуральной оспы, вирусом Эпштейна-Барр, вирусом иммунодефицита человека I типа (ВИЧ-I), вирусом иммунодефицита человека II типа (ВИЧ-II) и возбудителями таких вирусных заболеваний, как вирусный менингит, энцефалит, лихорадка денге или натуральная оспа.

Бактериальные инфекции, которые можно предотвращать и/или лечить, включают инфекции, вызванные *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* и *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериальные заболевания, вызванные бактериями (например, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* и *Pseudomonas aeruginosa*), которые можно предотвращать и/или лечить в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, включают, без ограничения перечисленными, *Mycobacteria rickettsia*, микоплазму, нейссерии, *S.pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* (болезнь Лайма), *Bacillus anthracis* (сибирскую язву), столбняк, стрептококк, стафилококк, микобактерию, коклюш, холеру, чуму, дифтерию, хламидию, *S. aureus* и легионеллу.

Протозойные заболевания или протозойные инфекции, вызываемые простейшими, которые можно предотвращать и/или лечить в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, включают, без ограничения перечисленными, лейшманию, кокцидиоз, трипаномозу, шистозому или малярию. Паразитарные заболевания или паразитарные инфекции, вызываемые паразитами, которые можно предотвращать и/или лечить в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, включают, без ограничения перечисленными, хламидии и риккетсии.

Грибковые заболевания или грибковые инфекции, которые можно предотвращать и/или лечить в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, включают, без ограничения перечисленными, инфекции, вызванные кандидами, зигомикоз, кандидоз молочных желез, прогрессирующий диссеминированный трихоспороноз со скрытой трихоспорономией, диссеминированный кандидоз, легочный параконидиоидомикоз, легочный аспергиллез, пневмонию *Pneumocystis carinii*, криптококковый менингит, кокцидиоидный менингоэнцефалит и спинномозговой васкулит, инфекцию *Aspergillus niger*, кератит *Fusarium*, микозы околоносовых пазух, эндокардит *Aspergillus fumigatus*, тибальную дисхондроплазию, вагинит *Candida glabrata*, ротоглоточный кандидоз, X-сцепленную хроническую гранулематозную болезнь, дерматомироз стопы, кожный кандидоз, грибковый плацентит, диссеминированный трихоспороноз, аллергический бронхолегочный аспергиллез, грибковый кератит, инфекцию *Cryptococcus neoformans*, грибковый перитонит, инфекцию *Curvularia geniculata*, стафилококковый эндофтальмит, споротрихоз и дерматомироз.

В некоторых вариантах осуществления инфекционное заболевание является острым. В некоторых вариантах осуществления инфекционное заболевание является хроническим. В некоторых вариантах осуществления инфекционное заболевание вызвано флавивирусом, например вирусом лихорадки Западного Нила, вирусом энцефалита Сент-Луис, вирусом энцефалита Повассан, вирусом клещевого энцефалита, вирусом мденге, вирусом Зика, вирусом болезни леса Кысанур, вирусом желтой лихорадки и вирусом Чикунгунья. В некоторых вариантах осуществления инфекционное заболевание вызвано вирусом Эбола. В некоторых вариантах осуществления инфекционное заболевание вызвано вирусом гриппа. В некоторых вариантах осуществления инфекционное заболевание вызвано вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусом гепатита В (HBV) или вирусом гепатита С (HCV). В некоторых вариантах осуществления, антитело против CTLA-4 или его фармацевтическая композиция, как раскрыто в настоящей заявке, способствует контролю вируса. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4

или его фармацевтическая композиция, как раскрыто в настоящей заявке, устраняет резервуары вируса.

Настоящее изобретение в одном аспекте относится к антителу против CTLA-4 согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению, включающей антитело против CTLA-4 согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, для применения в качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение в одном аспекте относится к антителу против CTLA-4 согласно изобретению и/или его применению в комбинации с фармацевтически приемлемыми носителями или вспомогательными веществами, для получения фармацевтических композиций или лекарственных средств для иммунотерапии (например, иммунотерапии для увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, лечения рака или лечения или предотвращения инфекционных заболеваний).

Настоящее изобретение в одном аспекте относится к антителу против CTLA-4 согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению, включающей антитело против CTLA-4 согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, для применения в способе лечения рака.

Настоящее изобретение в одном аспекте относится к антителу против CTLA-4 согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению, включающей антитело против CTLA-4 изобретения и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, для применения в способе ингибирования толерантности иммунной системы к опухолям и/или для иммунотерапии у субъектов с раком.

Настоящее изобретение в одном аспекте относится к антителу против CTLA-4 согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению, включающей антитело против CTLA-4 согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, для применения в способе лечения инфекционного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления указанные способы дополнительно включают введение субъекту дополнительного терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство является химиотерапевтическим средством или средством, направленным воздействующим на контрольную точку. В некоторых вариантах осуществления средство, направленное воздействующее на контрольную точку, выбрано из группы, состоящей из антагонистического антитела против PD-1, антагонистического антитела против PD-L1, антагонистического антитела против PD-L2, антагонистического антитела против CTLA-4, антагонистического антитела против TIM-3, антагонистического антитела против LAG-3, антагонистического антитела против CEACAM1, агонистического антитела против GITR, агонистического антитела против OX40, агонистического антитела против CD137, агонистического антитела против DR3, агонистического антитела против TNFSF14 и агонистического антитела против CD27. В некоторых вариантах осуществления средство, направленное воздействующее на контрольную точку, является антагонистическим антителом против PD-1. В некоторых вариантах осуществления средство, направленное воздействующее на контрольную точку, является антагонистическим антителом против PD-L1. В некоторых вариантах осуществления средство, направленное воздействующее на контрольную точку, является антагонистическим антителом против LAG-3. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство является агонистом по отношению к представителю суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли или представителю суперсемейства фактора некроза опухоли.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к: (а) антителу против CTLA-4 согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению, включающей антитело против CTLA-4 согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, и (b) дополнительному терапевтическому средству, для применения в качестве лекарственного средства. В предпочтительном варианте осуществления дополнительное терапевтическое средство является химиотерапевтическим средством или средством, направленным воздействующим на контрольную точку.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к: (а) антителу против CTLA-4 согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению, включающей антитело против CTLA-4 согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, и (b) дополнительному терапевтическому средству, для применения в способе лечения рака.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к: (а) антителу против CTLA-4 согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению, включающей антитело против CTLA-4 согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, и (b) дополнительному терапевтическому средству, для применения в способе лечения инфекционного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4, раскрытое в настоящей заявке, вводят субъекту в комбинации с соединением, которое направленно воздействует на иммуномодулирующий фермент(ы), такой как ИДО (индоламин-(2,3)-диоксигеназа) и/или ТДО (триптофан-2,3-диоксигеназа). В некоторых вариантах осуществления такое соединение выбрано из группы, состоящей из эпa-

кадостата (Incyte Corp.; см., например, WO 2010/005958, которая в полном объеме включена в настоящую заявку посредством отсылки), F001287 (Flexus Biosciences), индоксимода (NewLink Genetics) и NLG919 (NewLink Genetics). В одном варианте осуществления соединением является эпикадостат. В другом варианте осуществления соединением является F001287. В другом варианте осуществления соединением является индоксимод. В другом варианте осуществления соединением является NLG919.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к: (а) антителу против CTLA-4 согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению, включающей антитело против CTLA-4 согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, и (b) соединению, которое направленно воздействует на иммуномодулирующий фермент, для применения в качестве лекарственного средства. В предпочтительном варианте осуществления соединение направленно воздействует на ИДО и/или ТДО.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к: (а) антителу против CTLA-4 согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению, включающей антитело против CTLA-4 согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, и (b) соединению, которое направленно воздействует на иммуномодулирующий фермент, для применения в способе лечения рака. В предпочтительном варианте осуществления соединение направленно воздействует на ИДО и/или ТДО.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4, раскрытое в настоящей заявке, вводят субъекту в комбинации с вакциной. В некоторых вариантах осуществления вакцина является противоопухолевой вакциной на основе белка теплового шока или противопатогенной вакциной на основе белка теплового шока. В определенном варианте осуществления антитело против CTLA-4, раскрытое в настоящей заявке, вводят субъекту в комбинации с противоопухолевой вакциной на основе белка теплового шока. Белки теплового шока (HSP) являются семейством высококонсервативных белков, обнаруженных во всех биологических видах. Их экспрессия может быть сильно индуцирована до намного более высоких уровней вследствие теплового шока или других форм стресса, включая воздействие токсинов, окислительный стресс или нехватку глюкозы. Пять семейств были выделены в соответствии с молекулярной массой: HSP-110, -90, -70, -60 и -28. Белки HSP доставляют иммуногенные пептиды в пути перекрестного презентирования в антигенпрезентирующих клетках (АПК), таких как макрофаги и дендритные клетки (ДК), что приводит к активации Т-клеток. Белки HSP функционируют как шапероны-носители опухолеассоциированных антигенных пептидов, образуя комплексы, которые способны индуцировать опухолеспецифический иммунитет. При высвобождении из погибающих опухолевых клеток, HSP-антигенные комплексы захватывают антигенпрезентирующие клетки (АПК), в которых антигены процессируются с образованием пептидов, которые связывают молекулы МНС I класса и II класса, что ведет к активации противоопухолевых CD8+ и CD4+ Т-клеток. Иммунитет, индуцируемый комплексами HSP, полученными из препаратов опухолей, специфично направлен против уникального репертуара антигенных пептидов, экспрессируемых раковой опухолью каждого субъекта.

Комплекс пептидов и белка теплового шока (HSPPC) представляет собой белковый комплекс пептидов, состоящий из белка теплового шока, нековалентно связанного в комплекс с антигенными пептидами. Комплексы HSPPC индуцируют как врожденный, так и адаптивный иммунные ответы. В определенном варианте осуществления антигенный пептид(ы) демонстрирует антигенность рака, подвергнутого лечению. Комплексы HSPPC эффективно захватываются АПК через мембранные рецепторы (главным образом CD91) или при связывании с Toll-подобными рецепторами. Интернализация HSPPC приводит к функциональному созреванию АПК с продукцией хемокинов и цитокинов, приводящей к активации естественных киллерных (NK) клеток, моноцитов, и Th1 и Th2-опосредованным иммунным ответам. В некоторых вариантах осуществления комплексы HSPPC, применяемые в способах, раскрытых в настоящей заявке, включают один или несколько белков теплового шока из семейства белков стресса hsp60, hsp70 или hsp90, в комплексе с антигенными пептидами. В некоторых вариантах осуществления комплексы HSPPC включают hsc70, hsp70, hsp90, hsp110, grp170, grp96, кальретикулин или комбинации двух или более из них.

В определенном варианте осуществления антитело против CTLA-4, раскрытое в настоящей заявке, вводят субъекту в комбинации с комплексом пептидов и белка теплового шока (HSPPC), например комплексом пептидов с белком теплового шока 96 (HSPPC-96), для лечения рака. HSPPC-96 включает белок теплового шока массой 96 кДа (Hsp), grp96, в комплексе с антигенными пептидами. HSPPC-96 представляет собой противоопухолевую иммунотерапию, получаемую из опухоли субъекта, и содержит антигенный "фингерпринт" рака. В некоторых вариантах осуществления такой фингерпринт содержит уникальные антигены, которые присутствуют только в определенных раковых клетках у данного конкретного субъекта, и инъекция вакцины направлена на стимуляцию иммунной системы субъекта распознавать и атаковать любые клетки со специфическим раковым фингерпринтом.

В некоторых вариантах осуществления HSPPC, например HSPPC-96, получают из опухолевой ткани субъекта. В определенном варианте осуществления HSPPC (например, HSPPC-96) получают из опухоли такого типа рака, или ее метастаза, который подвергают лечению. В другом определенном варианте осуществления HSPPC (например, HSPPC-96) является аутогенным для субъекта, подвергнутого лече-

нию. В некоторых вариантах осуществления опухолевая ткань является ненекротической опухолевой тканью. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 1 г (например, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 г) ненекротической ткани опухоли используются для получения курса вакцины. В некоторых вариантах осуществления ненекротическую опухолевую ткань после хирургической резекции замораживают до применения для получения вакцины. В некоторых вариантах осуществления HSPPC, например HSPPC-96, выделяют из опухолевой ткани с помощью методов очистки, фильтруют и подготавливают для вводимой с помощью инъекции вакцины. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят 6-12 доз HSPPC, например HSPPC-96. В таких вариантах осуществления дозы HSPPC, например HSPPC-96, могут вводить ежедневно в случае первых 4 доз, а затем каждые две недели в случае 2-8 дополнительных доз.

Дополнительные примеры комплексов HSPPC, которые могут применяться в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, раскрыты в следующих патентах и заявках на патент, которые полностью включены в настоящую заявку посредством отсылки, патентах США 6391306, 6383492, 6403095, 6410026, 6436404, 6447780, 6447781 и 6610659.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к: (a) антителу против CTLA-4 согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению, включающей антитело против CTLA-4 согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, и (b) вакцине, для применения в качестве лекарственного средства. В предпочтительном варианте осуществления вакцина является противоопухолевой вакциной на основе белка теплового шока или противопатогенной вакциной на основе белка теплового шока. В предпочтительном варианте осуществления вакцина является противовирусной вакциной на основе белка теплового шока.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к: (a) антителу против CTLA-4 согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению, включающей антитело против CTLA-4 согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, и (b) вакцине, для применения в способе лечения рака. В предпочтительном варианте осуществления вакцина является противоопухолевой вакциной на основе белка теплового шока.

Антитело против CTLA-4 и дополнительное терапевтическое средство (например, химиотерапевтическое средство, средство, направленно воздействующее на контрольную точку, ингибитор ИДО и/или вакцину) могут вводить отдельно, последовательно или параллельно, в виде отдельных лекарственных форм. В одном варианте осуществления антитело против CTLA-4 вводят парентерально, а ингибитор ИДО вводят перорально.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4, раскрытое в настоящей заявке, вводят субъекту интратуморально. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4, раскрытое в настоящей заявке, вводят субъекту интратуморально в комбинации с дополнительным терапевтическим средством. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство вводят системно. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет солидные опухоли. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет HER2+ рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство, которое вводят системно, является антителом против PD-1 (например, пембролизумабом или ниволумабом). В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство, которое вводят системно, является антителом против EGFR (например, цетуксимабом). В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство, которое вводят системно, является антителом против HER2м (например, трастузумабом). В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство, которое вводят системно, является химиотерапевтическим средством (например, гемцитабином). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет солидные опухоли, при этом дополнительное терапевтическое средство, которое вводят системно, является антителом против PD-1 (например, пембролизумабом или ниволумабом). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC), при этом дополнительное терапевтическое средство, которое вводят системно, является антителом против EGFR (например, цетуксимабом). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет HER2+ рак молочной железы, при этом дополнительное терапевтическое средство, которое вводят системно, является антителом против HER2 (например, трастузумабом). В некоторых вариантах осуществления субъект дополнительно получает химиотерапевтическое средство (например, гемцитабин). В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу против CTLA-4 и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению и, необязательно, дополнительному терапевтическому средству, для применения в способе лечения рака, где антитело против CTLA-4 и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят субъекту интратуморально. В одном предпочтительном варианте осуществления субъекту вводят дополнительное терапевтическое средство, более предпочтительно дополнительное терапевтическое средство вводят субъекту системно.

В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 применяется в способах, раскрытых в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления антителом против PD-1 является ниволумаб,

также известный как BMS-936558 или MDX1106, разработанный Bristol-Myers Squibb. В некоторых вариантах осуществления антителом против PD-1 является пембролизумаб, также известный как Ламбролизумаб или MK-3475, разработанный Merck & Co. В некоторых вариантах осуществления антителом против PD-1 является пидилизумаб, также известный как CT-011, разработанный CureTech. В некоторых вариантах осуществления антителом против PD-1 является MEDI0680, также известный как AMP-514, разработанный Medimmune. В некоторых вариантах осуществления антителом против PD-1 является PDR001, разработанный Novartis Pharmaceuticals. В некоторых вариантах осуществления антителом против PD-1 является REGN2810, разработанный Regeneron Pharmaceuticals. В некоторых вариантах осуществления антителом против PD-1 является PF-06801591, разработанный Pfizer. В некоторых вариантах осуществления антителом против PD-1 является BGB-A317, разработанный BeiGene. В некоторых вариантах осуществления антителом против PD-1 является TSR-042, разработанный AnaptysBio и Tesaro. В некоторых вариантах осуществления антителом против PD-1 является SHR-1210, разработанный Hengrui.

Другие неограничивающие примеры антител против PD-1, которые могут применяться в способах лечения, раскрытых в настоящей заявке, раскрыты в следующих патентах и заявках на патент, которые полностью включены в настоящую заявку посредством отсылки во всех отношениях: патент США 6808710; патент США 7332582; патент США 7488802; патент США 8008449; патент США 8114845; патент США 8168757; патент США 8354509; патент США 8686119; патент США 8735553; патент США 8747847; патент США 8779105; патент США 8927697; патент США 8993731; патент США 9102727; патент США 9205148; публикация заявки на патент США US 2013/0202623 A1; публикация заявки на патент США US 2013/0291136 A1; публикация заявки на патент США US 2014/0044738 A1; публикация заявки на патент США US 2014/0356363 A1; публикация заявки на патент США US 2016/0075783 A1; и публикация PCT WO 2013/033091 A1; публикация PCT WO 2015/036394; публикация PCT WO 2014/179664 A2; публикация PCT WO 2014/209804 A1; публикация PCT WO 2014/206107 A1; публикация PCT WO 2015/058573 A1; публикация PCT WO 2015/085847 A1; публикация PCT WO 2015/200119 A1; публикация PCT WO 2016/015685 A1; и публикация PCT WO 2016/020856 A1.

В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-L1 применяется в способах, раскрытых в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления антителом против PD-L1 является атезолизумаб, разработанный Genentech. В некоторых вариантах осуществления антителом против PD-L1 является дурвалумаб, разработанный AstraZeneca, Celgene и Medimmune. В некоторых вариантах осуществления антителом против PD-L1 является авелумаб, также известный как MSB0010718C, разработанный Merck Serono и Pfizer. В некоторых вариантах осуществления антителом против PD-L1 является MDX-1105, разработанный Bristol-Myers Squibb. В некоторых вариантах осуществления антителом против PD-L1 является AMP-224, разработанный Amplimmune и GSK.

Неограничивающие примеры антител против PD-L1, которые могут применяться в способах лечения, раскрытых в настоящей заявке, раскрыты в следующих патентах и заявках на патент, которые полностью включены в настоящую заявку посредством отсылки во всех отношениях: патент США 7943743; патент США 8168179; патент США 8217149; патент США 8552154; патент США 8779108; патент США 8981063; патент США 9175082; публикация заявки на патент США US 2010/0203056 A1; публикация заявки на патент США US 2003/0232323 A1; публикация заявки на патент США US 2013/0323249 A1; публикация заявки на патент США US 2014/0341917 A1; публикация заявки на патент США US 2014/0044738 A1; публикация заявки на патент США US 2015/0203580 A1; публикация заявки на патент США US 2015/0225483 A1; публикация заявки на патент США US 2015/0346208 A1; публикация заявки на патент США US 2015/0355184 A1; и публикация PCT WO 2014/100079 A1; публикация PCT WO 2014/022758 A1; публикация PCT WO 2014/055897 A2; публикация PCT WO 2015/061668 A1; публикация PCT WO 2015/109124 A1; публикация PCT WO 2015/195163 A1; публикация PCT WO 2016/000619 A1; и публикация PCT WO 2016/030350 A1.

В некоторых вариантах осуществления антитело против LAG-3 применяется в способах, раскрытых в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления антителом против LAG-3 является BMS-986016, разработанный Bristol-Myers Squibb. В некоторых вариантах осуществления антителом против LAG-3 является LAG525, разработанный Novartis. В некоторых вариантах осуществления антителом против LAG-3 является GSK2831781, разработанный GSK.

Неограничивающие примеры антител против LAG-3, которые могут применяться в способах лечения, раскрытых в настоящей заявке, раскрыты в следующих патентах и заявках на патент, которые полностью включены в настоящую заявку посредством отсылки во всех отношениях: патент США 9,244,059; публикация заявки на патент США US 2011/0150892 A1; публикация заявки на патент США US 2014/0093511 A1; публикация заявки на патент США US 2014/0286935 A1; публикация заявки на патент США US 2015/0259420 A1; и публикация PCT WO 2015/042246 A1; публикация PCT WO 2015/116539 A1; публикация PCT WO 2015/200119 A1; и публикация PCT WO 2016/028672 A1.

В некоторых вариантах осуществления антитело против EGFR применяется в способах, раскрытых в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления антителом против EGFR является цетуксимаб, разработанный Bristol-Myers Squibb и ImClone, панитумумаб, разработанный Abgenix и Amgen, ни-

мотузумаб, разработанный CMI Cuba и BioSciences YM, нецитумумаб, разработанный ImClone, залутумумаб, разработанный Genmab, матузумаб, разработанный Takeda, Sym004, разработанный Merck Serono и Symphogen, имгатузумаб, разработанный Glycart и Roche, дулиготумаб, разработанный Genentech и Roche, депатуксизумаб, разработанный Abbott, депатуксизумаб мафодотин, разработанный Abbvie, MM-151, разработанный Adimab и Merrimack, GC1118, разработанный Green Cross, AMG 595, разработанный Amgen и ImmunoGen, CetuGEX, разработанный Glycotope, лапритуксимаб эмтанзин, разработанный ImmunoGen, JNJ-61186372, разработанный Genmab и Janssen Biotech, SCT200, разработанный Sinocelltech, LY3164530, разработанный Lilly, HLX07, разработанный Shanghai Henlius, или SYN004, разработанный Synergmore.

В некоторых вариантах осуществления антитело против HER2 применяется в способах, раскрытых в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления антителом против HER2 является трастузумаб, разработанный Genentech и Roche, трастузумаб эмтанзин, разработанный Genentech и Roche, пертузумаб, разработанный Genentech, эртумаксумаб, разработанный Fresenius, маргетуксимаб, разработанный MacroGenics, MM-111, разработанный Merrimack, CT-P06, разработанный Celltrion, PF-05280014, разработанный Pfizer, MM-302, разработанный Merrimack, SB3, разработанный Merck & Co, CMAB302, разработанный Shanghai CP Guojian, TrasGEX, разработанный Glycotope, ARX788, разработанный Ambrx и Zhejiang Medicine, SYD985, разработанный Synthron, FS102, разработанный Bristol-Myers Squibb и f-star, BCD-022, разработанный Biocad, ABP 980, разработанный Amgen, DS-8201a, разработанный Daiichi Sankyo, HLX02, разработанный Shanghai Henlius, или CANMAb, разработанный Biocan и Mylan.

Антитело или фармацевтическая композиция, описанные в настоящей заявке, могут быть доставлены субъекту множеством путей. Они включают, без ограничения перечисленными, парентеральный, интраназальный, эндотрахеальный, пероральный, внутрикожный, наружный, внутримышечный, внутрибрюшинный, трансдермальный, внутривенный, интратуморальный, конъюнктивальный и подкожный пути. Также может применяться пульмональное введение, например, при помощи ингалятора или небулайзера, и включение в лекарственную форму пропеллента для применения в виде спрея. В некоторых вариантах осуществления антитело или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей заявке, доставляют подкожно или внутривенно. В некоторых вариантах осуществления антитело или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей заявке, доставляют интратуморально. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, доставляют в дренирующий опухоль лимфатический узел. В некоторых вариантах осуществления антитело или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей заявке, доставляют посредством локализованного введения (например, подкожного введения). В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, доставляют системно. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, раскрытые в настоящей заявке, доставляют локально.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу против CTLA-4 и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению и, необязательно, дополнительному терапевтическому средству, для применения в способе лечения рака, где антитело против CTLA-4 и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению доставляют субъекту интратуморально, доставляют в дренирующий опухоль лимфатический узел субъекта или доставляют путем локализованного введения (например, подкожного введения) субъекту.

Количество антитела или композиции, которое будет эффективным при лечении и/или профилактике состояния, будет зависеть от природы заболевания и может быть определено с помощью стандартных клинических методов.

Точная доза, которая будет применяться в композиции, также будет зависеть от пути введения и тяжести инфекции или заболевания, вызванного ей, и должна быть определена согласно решению специалиста и обстоятельствам в случае каждого субъекта. Например, эффективные дозы также могут изменяться в зависимости от способов введения, целевого участка, физиологического состояния больного (в том числе возраста, массы тела и состояния здоровья), является ли больной человеком или животным, других применяемых лекарственных средств, или является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно больной является человеком, однако лечению также могут подвергаться не относящиеся к человеку млекопитающие, в том числе трансгенные млекопитающие. Дозы в лечении оптимально титруют для оптимизации безопасности и эффективности.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей заявке, вводят субъекту (например, посредством внутривенной инъекции) в количестве 0,1, 0,3, 1, 3, 6, 10, приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг или приблизительно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей заявке, вводят субъекту (например, посредством внутривенной инъекции) раз в три недели в дозах, описанных выше.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу против CTLA-4 и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению и, необязательно, дополнительному терапевтиче-

скому средству, для применения в способе лечения рака, где антитело против CTLA-4 и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят субъекту в количестве 0,1, 0,3, 1, 3, 6, 10, приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг или приблизительно 10 мг/кг, более предпочтительно раз в три недели.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей заявке, вводят субъекту (например, посредством внутривенной инъекции) в количестве 0,1 мг/кг или приблизительно 0,1 мг/кг раз в три недели. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей заявке, вводят субъекту (например, посредством внутривенной инъекции) в количестве 0,3 мг/кг или приблизительно 0,3 мг/кг раз в три недели. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей заявке, вводят субъекту (например, посредством внутривенной инъекции) в количестве 1 мг/кг или приблизительно 1 мг/кг раз в три недели. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей заявке, вводят субъекту (например, посредством внутривенной инъекции) в количестве 3 мг/кг или приблизительно 3 мг/кг раз в три недели. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей заявке, вводят субъекту (например, посредством внутривенной инъекции) в количестве 6 мг/кг или приблизительно 6 мг/кг раз в три недели. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей заявке, вводят субъекту (например, посредством внутривенной инъекции) в количестве 10 мг/кг или приблизительно 10 мг/кг раз в три недели.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей заявке, вводят субъекту посредством интратуморальной инъекции в количестве 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,03 мг/кг, приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг или приблизительно 3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей заявке, вводят субъекту посредством интратуморальной инъекции раз в три недели в дозах, описанных выше.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей заявке, вводят субъекту посредством интратуморальной инъекции в количестве 0,01 мг/кг или приблизительно 0,01 мг/кг раз в три недели. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей заявке, вводят субъекту посредством интратуморальной инъекции в количестве 0,03 мг/кг или приблизительно 0,03 мг/кг раз в три недели. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей заявке, вводят субъекту посредством интратуморальной инъекции в количестве 0,1 мг/кг или приблизительно 0,1 мг/кг раз в три недели. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей заявке, вводят субъекту посредством интратуморальной инъекции в количестве 0,3 мг/кг или приблизительно 0,3 мг/кг раз в три недели. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей заявке, вводят субъекту посредством интратуморальной инъекции в количестве 1 мг/кг или приблизительно 1 мг/кг раз в три недели. В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей заявке, вводят субъекту посредством интратуморальной инъекции в количестве 3 мг/кг или приблизительно 3 мг/кг раз в три недели.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей заявке, вводят субъекту посредством локализованного введения (например, подкожного введения) в количестве 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,03 мг/кг, приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг или приблизительно 3 мг/кг.

Антитело против CTLA-4, описанное в настоящей заявке, также может применяться для анализа содержания белка CTLA-4 в биологическом образце при использовании классических иммуногистохимических методов, известных специалистам в данной области, включающих иммуноанализы, такие как иммуноферментный анализ (ELISA), иммунопреципитацию или Вестерн-блоттинг.

Подходящие метки для анализа антител известны в уровне техники и включают ферментные метки, такие как глюкозооксидаза; радиоизотопы, такие как иод (^{125}I , ^{121}I), углерод (^{14}C), серу (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{121}In) и технеций (^{99}Tc); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, а также биотин. Такие метки могут применяться для мечення антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящей заявке. В альтернативе второе антитело, которое распознает антитело против CTLA-4 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящей заявке, может быть помечено и может применяться в комбинации с антителом против CTLA-4 или его антигенсвязывающим фрагментом для определения уровней белка CTLA-4. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению антитела против CTLA-4 согласно изобретению для анализа и/или определения уровней белка CTLA-4 в биологическом образце *in vitro*.

Предполагается, что анализ уровня экспрессии белка CTLA-4 включает качественное или количественное измерение или оценку уровня белка CTLA-4 в первом биологическом образце либо напрямую (например, при определении или оценке абсолютного содержания белка), либо относительно (например, при сравнении с уровнем ассоциированного с заболеванием белка во втором биологическом образце). Уровень экспрессии полипептида CTLA-4 в первом биологическом образце можно измерить или оценить и сравнить со стандартным уровнем белка CTLA-4, причем стандарт получают из второго биологического образца, полученного от индивида, не имеющего нарушения, или определяют путем усреднения уровней в группе индивидов, не имеющих нарушения. Как будет известно из уровня техники, если известен "стандартный" уровень полипептида CTLA-4, его можно многократно использовать в качестве стандарта для сравнения.

При использовании в настоящем описании термин "биологический образец" относится к любому биологическому образцу, полученному у субъекта, линии клеток, ткани или другого источника клеток, потенциально экспрессирующих CTLA-4. Способы получения биопсий ткани и физиологических жидкостей у животных (например, людей) известны в уровне техники. Биологические образцы включают мононуклеарные клетки периферической крови.

Антитело против CTLA-4 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящей заявке, могут применяться для прогностических, диагностических, мониторинговых и скрининговых применений, в том числе применений *in vitro* и *in vivo*, известных и стандартных для специалиста и на основе настоящего описания. Прогностические, диагностические, мониторинговые и скрининговые анализы и наборы для *in vitro* оценки и оценки статуса иммунной системы и/или иммунного ответа могут применяться для прогноза, диагностики и мониторинга с целью оценки образцов больных, в том числе таких, которые, как известно, имели или подозревались на наличие дисфункции иммунной системы, или в сравнении с ожидаемой или требуемой реакцией иммунной системы, ответа на антиген или ответа на вакцину. Оценка и определение статуса иммунной системы и/или иммунного ответа также могут применяться при определении пригодности больного для клинического исследования лекарственного средства или для введения конкретного химиотерапевтического средства или антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, в том числе их комбинаций, против другого средства или антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента. Данный тип прогностического и диагностического мониторинга и оценки уже применяется на практике с применением антител против белка HER2 при раке молочной железы (HerceptinTM, Dako), где такой анализ также применяется для оценки больных в случае применения терапии антителами с использованием Герцептина®. Применения *in vivo* включают направленную клеточную терапию и модуляцию иммунной системы, а также радиовизуализацию иммунных реакций.

В одном аспекте изобретение относится к антителу против CTLA-4 и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения в качестве диагностического средства.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу против CTLA-4 и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения в способе прогноза, диагностики и/или мониторинга дисфункции иммунной системы и/или рака.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению антитела против CTLA-4 согласно изобретению для прогноза, диагностики и/или мониторинга дисфункции иммунной системы и/или рака у субъекта посредством анализа и/или определения уровней белка CTLA-4 в биологическом образце субъекта *in vitro*.

В одном варианте осуществления антитело против CTLA-4 или его антигенсвязывающий фрагмент могут применяться в иммуногистохимии образцов биопсии. В другом варианте осуществления антитело против CTLA-4 или его антигенсвязывающий фрагмент могут применяться для определения уровней CTLA-4 или уровней клеток, которые содержат CTLA-4 на поверхности своей мембраны, где такие уровни можно затем соотносить с симптомами определенного заболевания. Антитела против CTLA-4 или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящей заявке, могут нести детектируемую или функциональную метку. В случае использования флуоресцентных меток, можно применять доступную в настоящий момент микроскопию и анализ с сортировкой флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или комбинацию методик обоих методов, известных в уровне техники, для идентификации и количественного определения специфических участников связывания. Антитела против CTLA-4 или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящей заявке, могут нести флуоресцентную метку. Примеры флуоресцентных меток включают, например, реакционно-способные и конъюгированные зонды, например, аминкумарин, флуоресцеин и техасский красный, красители Alexa Fluor, красители Cy и красители DyLight. Антитело против CTLA-4 или его антигенсвязывающий фрагмент могут нести радиоактивную метку, такую как изотопы ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹¹⁷Lu, ¹²¹I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁹⁸Au, ²¹¹At, ²¹³Bi, ²²⁵Ac и ¹⁸⁶Re. При использовании радиоактивных меток могут применяться доступные в настоящий момент методики счета, известные в уровне техники для идентификации и количественного определения специфического связывания антитела против CTLA-4 или его антигенсвязывающего фрагмента с CTLA-4 (например, человеческим CTLA-4). В случае, когда меткой является фермент, обнаружение может быть выполнено с помощью любого из используемых в настоящий момент колори-

метрических, спектрофотометрических, флуороспектрофотометрических, амперометрических или газометрических методов, известных в уровне техники. Это может быть достигнуто при контакте образца или контрольного образца с антителом против CTLA-4 или его антигенсвязывающим фрагментом при условиях, которые обеспечивают образование комплекса между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и CTLA-4. Любые комплексы, образованные между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и CTLA-4, обнаруживают и сравнивают в образце и контроле. С учетом специфического связывания антител, описанных в настоящей заявке, с CTLA-4, такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут применяться для специфического обнаружения экспрессии CTLA-4 на поверхности клеток. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящей заявке, также могут применяться для очистки CTLA-4 с помощью иммуоафинной очистки. Также в настоящую заявку включена система анализа, которая может быть подготовлена в форме тест-набора для количественного анализа степени присутствия, например CTLA-4 или комплексов CTLA-4/лиганд CTLA-4. Система или тест-набор могут включать меченый компонент, например меченое антитело и один или несколько дополнительных иммунохимических реактивов.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения относится к способу *in vitro* анализа и/или определения уровней белка CTLA-4 в биологическом образце, включающему: (1) контакт образца и, необязательно, контрольного образца с антителом против CTLA-4 или его антигенсвязывающим фрагментом согласно изобретению при условиях, которые обеспечивают образование комплекса между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и CTLA-4, и (2) обнаружение и сравнение комплексов, образованных в образце и, необязательно, контроле.

5.5. Полинуклеотиды, векторы и способы получения антител против CTLA-4.

В другом аспекте в настоящей заявке предложены полинуклеотиды, включающие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, описанное в настоящей заявке, или его фрагмент (например, вариабельную область легкой цепи и/или вариабельную область тяжелой цепи), которые специфично связываются с антигеном CTLA-4 (например, человеческим CTLA-4), и векторы, например, векторы, включающие такие полинуклеотиды, для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (например, *E. coli* и клетках млекопитающих). В настоящей заявке предложены полинуклеотиды, включающие нуклеотидные последовательности, кодирующие любое из антител, предложенных в настоящей заявке, а также векторы, включающие такие полинуклеотидные последовательности, например векторы экспрессии, для их эффективной экспрессии в клетках-хозяевах, например клетках млекопитающих.

При использовании в настоящем описании "выделенный" полинуклеотид или молекула нуклеиновой кислоты отделены от других молекул нуклеиновых кислот, которые присутствуют в природном источнике (например, в организме мыши или человека) молекулы нуклеиновой кислоты. Кроме того, "выделенная" молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула кДНК, может по существу не содержать другого клеточного материала или среды культивирования, в случае получения рекомбинантными методами, или по существу не содержать химических предшественников или других химических соединений, в случае если она химически синтезирована. Например, выражение "по существу не содержит" включает препараты полинуклеотида или молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие меньше чем приблизительно 15, 10, 5, 2, 1, 0,5 или 0,1% (в частности, меньше чем приблизительно 10%) другого материала, например, клеточного материала, среды культивирования, других молекул нуклеиновых кислот, химических предшественников и/или других химических соединений. В определенном варианте осуществления молекула(ы) нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело, описанное в настоящей заявке, выделена или очищена.

В определенных аспектах в настоящей заявке предложены полинуклеотиды, включающие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с полипептидом CTLA-4 (например, человеческим CTLA-4) и включают аминокислотную последовательность, как описано в настоящей заявке, а также антитела, которые конкурируют с такими антителами за связывание с полипептидом CTLA-4 (например, дозозависимым образом) или связываются с тем же эпитопом, что и такие антитела.

В некоторых аспектах в настоящей заявке предложены полинуклеотиды, включающие нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или тяжелую цепь антитела, описанного в настоящей заявке. Полинуклеотиды могут включать нуклеотидные последовательности, кодирующие легкую цепь, включающую VL FR-области и CDR-области антител, описанных в настоящей заявке (см., например, табл. 1).

Также в настоящей заявке предложены полинуклеотиды, кодирующие антитело против CTLA-4, которые оптимизированы, например, посредством оптимизации кодонов/РНК, замены гетерологичными сигнальными последовательностями и удалением элементов нестабильности мРНК. Способы получения оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих антитело против CTLA-4 или его фрагмент (например, легкую цепь, тяжелую цепь, VH-домен или VL-домен), для рекомбинантной экспрессии, посредством введения замен кодонов и/или удаления ингибирующих областей в мРНК, могут быть осуществлены при адаптации способов оптимизации, описанных, например, в патентах США 5965726; 6174666; 6291664; 6414132; и 6794498 соответственно. Например, потенциальные участки сплайсинга и элементы

нестабильности (например, А/Т или А/У богатые элементы) в РНК могут быть подвергнуты мутации без изменения аминокислот, кодируемых последовательностями нуклеиновых кислот, с увеличением стабильности РНК для рекомбинантной экспрессии. При таких изменениях используют вырожденность генетического кода, например, с использованием альтернативного кодона для идентичной аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления может потребоваться произвести изменение одного или более кодонов, кодирующих консервативную мутацию, например, подобную аминокислоту с подобной химической структурой и свойствами и/или функцией, что и исходная аминокислота. Такие способы могут позволить повысить экспрессию антитела против CTLA-4 или его фрагмента по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз или больше по сравнению с экспрессией антитела против CTLA-4, кодируемого полинуклеотидами, которые не были оптимизированы.

В некоторых вариантах осуществления оптимизированная полинуклеотидная последовательность, кодирующая антитело против CTLA-4, описанное в настоящей заявке, или его фрагмент (например, VL-домен и/или VH-домен), может гибридизоваться с антисмысловым (например, комплементарным) полинуклеотидом неоптимизированной полинуклеотидной последовательности, кодирующей антитело против CTLA-4, описанное в настоящей заявке, или его фрагмент (например, VL-домен и/или VH-домен). В некоторых вариантах осуществления оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело против CTLA-4, описанное в настоящей заявке, или его фрагмент, гибридизуются при условиях высокой строгости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной полинуклеотидной последовательности, кодирующей антитело против CTLA-4, описанное в настоящей заявке, или его фрагмент. В определенном варианте осуществления оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело против CTLA-4, описанное в настоящей заявке, или его фрагмент, гибридизуется при условиях гибридизации высокой строгости, промежуточной или более низкой строгости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей антитело против CTLA-4, описанное в настоящей заявке, или его фрагмент. Информация касательно условий гибридизации была описана, например, в публикации заявки на патент США US 2005/0048549 (например, в параграфах 72-73), которая включена в настоящую заявку посредством отсылки.

Полинуклеотиды могут быть получены, и нуклеотидная последовательность полинуклеотидов определена с помощью любого способа, известного в уровне техники. Нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, описанные в настоящей заявке, например антитела, описанные в табл. 1, а также модифицированные варианты таких антител, могут быть определены с помощью способов, известных в уровне техники, т.е. нуклеотидные кодоны, которые, как известно, кодируют конкретные аминокислоты, собирают таким способом, чтобы получать нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело. Такой полинуклеотид, кодирующий антитело, может быть собран из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, как описано в Kutmeier G. et al. (1994), *BioTechniques* 17: 242-6), что, коротко, включает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей антитело, отжиг и лигирование таких олигонуклеотидов, а затем амплификацию лигированных олигонуклеотидов с помощью ПЦР.

В альтернативе полинуклеотид, кодирующий антитело, описанное в настоящей заявке, может быть получен из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы) с применением способов, известных в уровне техники (например, ПЦР и других методов молекулярного клонирования). Например, ПЦР амплификация с использованием синтетических праймеров, гибридизующихся с 3'- и 5'-концами известной последовательности, может быть выполнена при использовании геномной ДНК, полученной из клеток гибридомы, продуцирующих представляющее интерес антитело. Такие методы ПЦР амплификации могут применяться для получения нуклеиновых кислот, включающих последовательность, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела. Такие способы ПЦР амплификации могут применяться для получения нуклеиновых кислот, включающих последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи антитела. Амплифицированные нуклеиновые кислоты можно клонировать в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для последующего клонирования, например, с целью получения химерных и гуманизированных антител.

Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретное антитело, не доступен, но известна последовательность молекулы антитела, нуклеиновая кислота, кодирующая иммуноглобулин, может быть синтезирована химически или получена из подходящего источника (например, библиотеки кДНК антитела или библиотеки кДНК, полученной из, или нуклеиновой кислоты, предпочтительно поли А+ РНК, выделенной из, любой ткани или клеток, экспрессирующих антитело, таких как клетки гибридомы, отобранные для экспрессии антитела, описанного в настоящей заявке) с помощью ПЦР амплификации при использовании синтетических праймеров, гибридизующихся с 3'- и 5'-концами последовательности, или путем клонирования с использованием олигонуклеотидного зонда, специфичного к последовательности определенного гена, для определения, например, клона кДНК в библиотеке кДНК, который кодирует антитело. Амплифицированные нуклеиновые кислоты, полученные с помощью ПЦР, можно затем клонировать в реплицирующиеся клонирующие векторы с применением любого способа, известного в уровне техники.

ДНК, кодирующая антитела против CTLA-4, описанные в настоящей заявке, может быть с легко-

стью выделена и секвенирована с применением стандартных методик (например, при помощи олигонуклеотидных зондов, которые способны специфично связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител против CTLA-4). Клетки гибридомы могут служить источником такой ДНК. После выделения, ДНК может быть помещена в векторы экспрессии, которыми затем трансфицируют клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьян, клетки яичников китайского хомячка (CHO) (например, клетки CHO из CHO GS System™ (Lonza)), или клетки миеломы, которые в иных условиях не продуцируют иммуноглобулиновый белок, с получением синтеза антител против CTLA-4 в рекомбинантных клетках-хозяевах.

Для получения полных антител ПЦР-праймеры, включающие VH или VL нуклеотидные последовательности, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты сайта рестрикции, могут применяться для амплификации VH или VL последовательностей в scFv клонах. При использовании методов клонирования, известных специалистам в данной области, ПЦР амплифицированные VH-домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область тяжелой цепи, например человеческую $\gamma 4$ константную область, и ПЦР амплифицированные VL-домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область легкой цепи, например человеческие κ или λ константные области. В некоторых вариантах осуществления векторы для экспрессии VH- или VL-доменов включают промотор EF-1 α , сигнал секреции, сайт клонирования для варибельной области, константные домены и селективный маркер, такой как неомицин. Также VH- и VL-домены можно клонировать в один вектор, экспрессирующий необходимые константные области. Векторы конверсии тяжелой цепи и векторы конверсии легкой цепи затем котрансфицируют в линии клеток с получением стабильных или трензиентных линий клеток, которые экспрессируют полноразмерные антитела, например IgG, при использовании способов, известных специалистам в данной области.

ДНК также может быть модифицирована, например, посредством замены мышинных последовательностей кодирующей последовательностью человеческих константных доменов тяжелой и легкой цепи или путем ковалентного соединения с кодирующей иммуноглобулин последовательностью всей или части кодирующей последовательности неиммуноглобулинового полипептида.

Также предложены полинуклеотиды, которые гибридизуются при условиях гибридизации высокой строгости, промежуточной или более низкой строгости с полинуклеотидами, которые кодируют антитело, описанное в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, описанные в настоящей заявке, гибридизуются при условиях гибридизации высокой строгости, промежуточной или более низкой строгости с полинуклеотидами, кодирующими VH-домен и/или VL-домен, предложенные в настоящей заявке.

Условия гибридизации были описаны в уровне техники и известны специалисту в данной области. Например, гибридизация при строгих условиях может включать гибридизацию со связанной на фильтре ДНК в 6 $\times$ растворе хлорида натрия/цитрата натрия (SSC) приблизительно при 45°C, сопровождаемую одной или более промывками в 0,2 $\times$ SSC/0,1% SDS приблизительно при 50-65°C; гибридизация при условиях высокой строгости может включать гибридизацию со связанной на фильтре нуклеиновой кислотой в 6 $\times$ SSC приблизительно при 45°C, сопровождаемую одной или более промывками в 0,1 $\times$ SSC/0,2% SDS приблизительно при 68°C. Гибридизация при условиях гибридизации другой строгости известна специалистам в данной области и была описана, например, в Ausubel F.M. et al., eds., (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York, на стр. 6.3.1-6.3.6 и 2.10.3.

В некоторых аспектах в настоящей заявке предложены клетки (например, клетки-хозяева), экспрессирующие (например, рекомбинантно) антитела, описанные в настоящей заявке (или их антигенсвязывающий фрагмент), которые специфично связываются с CTLA-4 (например, человеческим CTLA-4), а также соответствующие полинуклеотиды и векторы экспрессии. В настоящей заявке предложены векторы (например, векторы экспрессии), включающие полинуклеотиды, включающие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела против CTLA-4 или фрагмент, для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, предпочтительно в клетках млекопитающих. Также в настоящей заявке предложены клетки-хозяева, включающие такие векторы, для рекомбинантной экспрессии антител против CTLA-4, описанных в настоящей заявке (например, человеческого или гуманизированного антитела). В определенном аспекте в настоящей заявке предложены способы получения антитела, описанного в настоящей заявке, включающие экспрессию такого антитела из клетки-хозяина.

Рекомбинантная экспрессия антитела, описанного в настоящей заявке (например, полноразмерного антитела, тяжелой и/или легкой цепи антитела или одноцепочечного антитела, описанного в настоящей заявке), которое специфично связывается с CTLA-4 (например, человеческим CTLA-4), включает конструирование вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, который кодирует антитело. После получения полинуклеотида, кодирующего молекулу антитела, тяжелую и/или легкую цепь антитела или их фрагмент (например, варибельные области тяжелой и/или легкой цепи), описанные в настоящей заявке, вектор для продукции молекулы антитела может быть получен с помощью технологии рекомбинантных ДНК с применением способов, известных в уровне техники. Таким образом, способы получения белка,

экспрессирующего полинуклеотид, содержащий кодирующую антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь) нуклеотидную последовательность, описаны в настоящей заявке. Способы, которые известны специалистам в данной области техники, могут применяться для конструирования векторов экспрессии, содержащих кодирующие антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь) последовательности и соответствующие сигналы регуляции транскрипции и трансляции. Такие способы включают, например, методики рекомбинантных ДНК *in vitro*, методики синтеза и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Также предложены реплицирующиеся векторы, включающие нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, описанного в настоящей заявке, тяжелую или легкую цепь антитела, вариабельную область тяжелой или легкой цепи антитела или их фрагмент, или CDR тяжелой или легкой цепи, функционально связанные с промотором. Такие векторы могут, например, включать нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область молекулы антитела (см., например, публикации международных заявок WO 86/05807 и WO 89/01036; и патент США 5122464), при этом вариабельные области антитела можно клонировать в такой вектор для экспрессии полноразмерной тяжелой, полноразмерной легкой цепи или полноразмерных тяжелой и легкой цепей.

Вектор экспрессии можно переносить в клетку (например, клетку-хозяина) с помощью стандартных способов, и полученные клетки затем можно культивировать стандартными способами с получением антитела, описанного в настоящей заявке, или его фрагмента. Таким образом, в настоящей заявке предложены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий антитело, описанное в настоящей заявке, или его фрагменты, или его тяжелую или легкую цепь, или их фрагмент, или одноцепочечное антитело, описанное в настоящей заявке, функционально связанные с промотором для экспрессии таких последовательностей в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления для экспрессии двухцепочечных антител векторы, кодирующие тяжелую и легкую цепи отдельно, можно коэкспрессировать в клетке-хозяине для экспрессии всей молекулы иммуноглобулина, как подробно описано ниже. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь антитела, описанного в настоящей заявке, или их фрагмент. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит два разных вектора, причем первый вектор включает полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или вариабельную область тяжелой цепи антитела, описанного в настоящей заявке, или ее фрагмент, а второй вектор включает полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или вариабельную область легкой цепи антитела, описанного в настоящей заявке, или ее фрагмент. В других вариантах осуществления первая клетка-хозяин включает первый вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или вариабельную область тяжелой цепи антитела, описанного в настоящей заявке, или ее фрагмент, а вторая клетка-хозяин включает второй вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или вариабельную область легкой цепи антитела, описанного в настоящей заявке. В определенных вариантах осуществления тяжелая цепь/вариабельная область тяжелой цепи, экспрессируемая первой клеткой, ассоциирует с легкой цепью/вариабельной областью легкой цепи второй клетки, с образованием антитела против CTLA-4, описанного в настоящей заявке, или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке предложена популяция клеток-хозяев, включающих такую первую клетку-хозяина и такую вторую клетку-хозяина.

В определенном варианте осуществления в настоящей заявке предложена популяция векторов, включающая первый вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь/вариабельную область легкой цепи антитела против CTLA-4, описанного в настоящей заявке, и второй вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь/вариабельную область тяжелой цепи антитела против CTLA-4, описанного в настоящей заявке.

Множество систем организмов-хозяев/векторов экспрессии может применяться для экспрессии молекул антител, описанных в настоящей заявке (см., например, патент США 5807715). Такие системы экспрессии в организмах-хозяевах представляют собой носители, с помощью которых кодирующие последовательности, представляющие интерес, можно получать и затем очищать, но также представляют собой клетки, которые при трансформации или трансфекции соответствующими кодирующими нуклеотидными последовательностями могут экспрессировать молекулу антитела, описанного в настоящей заявке, *in situ*. Они включают, без ограничения перечисленными, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E.coli* и *B.subtilis*), трансформированные векторами экспрессии на основе рекомбинантной ДНК фага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими последовательности, кодирующие антитело; дрожжи (например, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми векторами экспрессии, содержащими последовательности, кодирующие антитело; системы на основе клеток насекомых, инфицированных рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирусом), содержащими последовательности, кодирующие антитело; системы на основе растительных клеток (например, зеленых водорослей, таких как *Chlamydomonas reinhardtii*), инфицированных рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики, ВТМ) или трансформированных рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например, Ti-плазмидой), содержащими последовательности, кодирующие антитело; или

системы на основе клеток млекопитающих (например, клеток COS (например, COS1 или COS), CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NSO, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20 и BMT10), несущие рекомбинантные экспрессионные конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, металлотионеиновый промотор) или из вирусов млекопитающих (например, позднего промотора аденовируса; 7,5K промотора вируса коровьей оспы). В определенном варианте осуществления клетки для экспрессии антител, описанных в настоящей заявке, или их антигенсвязывающего фрагмента являются клетками CHO, например клетками CHO из CHO GS System™ (Lonza). В определенном варианте осуществления клетки для экспрессии антител, описанных в настоящей заявке, являются клетками человека, например, линиями клеток человека. В определенном варианте осуществления вектором для экспрессии в клетках млекопитающих является pOptiVEC™ или pcDNA3.3. В определенном варианте осуществления бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или эукариотические клетки (например, клетки млекопитающих), в особенности для экспрессии целой рекомбинантной молекулы антитела, применяются для экспрессии рекомбинантной молекулы антитела. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичников китайского хомячка (CHO), в сочетании с вектором, таким как главный предранний промоторный элемент гена из цитомегаловируса человека, являются эффективной системой экспрессии для антител (Foecking M.K. & Hofstetter H. (1986) *Gene* 45: 101-5; и Cockett M.I. et al. (1990) *Biotechnology* 8 (7): 662-7). В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящей заявке, продуцируют клетки CHO или клетки NS0. В определенном варианте осуществления экспрессию нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитела, описанные в настоящей заявке, которые специфично связывают CTLA-4 (например, человеческий CTLA-4), регулирует конститутивный промотор, индуцируемый промотор или тканеспецифический промотор.

В бактериальных системах можно с преимуществами подобрать ряд векторов экспрессии в зависимости от применения, предполагаемого для экспрессируемой молекулы антитела. Например, если требуется получить большое количество такого антитела, для создания фармацевтических композиций молекулы антитела могут потребоваться векторы, которые направляют экспрессию высоких уровней слитых белковых продуктов, которые могут быть с легкостью очищены. Такие векторы включают, без ограничения перечисленными, *E.coli* вектор экспрессии pUR278 (Ruether U & Mueller-Hill B (1983) *EMBO J* 2: 1791-1794), в котором кодирующую последовательность антитела можно отдельно лигировать в вектор в рамке считывания с кодирующей областью *lac Z*, при этом продуцируется слитый белок; векторы pIN (Inouye S & Inouye M. (1985) *Nuc. Acids. Res.* 13: 3101-3109; Van Heeke G. & Schuster S.M. (1989) *J. Biol. Chem.* 24: 5503-5509) и т.п. Например, векторы pGEX также можно применять для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион-5-трансферазой (GST). Как правило, такие слитые белки являются растворимыми и могут быть легко очищены из лизированных клеток при адсорбции и связывании с матрицей из глутатион-агарозных гранул, с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX включают участки расщепления для протеаз тромбина или фактора Ха, при этом клонированный целевой продукт гена может освобождаться от молекулы GST.

В системе на основе клеток насекомых вирус ядерного полиэдроза совки *Autographa californica* (AcNPV), например, может применяться в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов. Вирус размножается в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодирующую последовательность антитела можно клонировать индивидуально в несущественные области (например, ген полиэдрина) вируса и помещать под контроль промотора AcNPV (например, промотора полиэдрина).

В клетках млекопитающих можно использовать множество систем экспрессии на основе вирусов. В случаях, когда в качестве вектора экспрессии используется аденовирус, кодирующую последовательность антитела, представляющую интерес, можно лигировать с комплексом контроля транскрипции/трансляции аденовируса, например, последовательностью позднего промотора и тройной лидерной последовательностью. Такой химерный ген можно затем встраивать в геном аденовируса с помощью *in vitro* или *in vivo* рекомбинации. Вставка в несущественную область вирусного генома (например, область E1 или E3) дает рекомбинантный вирус, который жизнеспособен и способен экспрессировать молекулу антитела в инфицированных клетках-хозяевах (например, см. Logan J. & Shenk T. (1984) *PNAS* 81 (12): 3655-9). Специфические сигналы инициации также могут требоваться для эффективной трансляции встроенных кодирующих последовательностей антитела. Такие сигналы включают иницирующий кодон ATG и смежные последовательности. Кроме того, иницирующий кодон должен совпадать с рамкой считывания нужной кодирующей последовательности, чтобы гарантировать трансляцию всей вставки. Такие экзогенные сигналы контроля трансляции и иницирующие кодоны могут происходить из различных источников, как природных, так и синтетических. Эффективность экспрессии можно повышать при включении подходящих энхансерных элементов транскрипции, терминаторов транскрипции и т.д. (см., например, Bitter G. et al. (1987) *Methods Enzymol.* 153: 516-544).

Кроме того, может быть выбран штамм клеток-хозяев, которые модулируют экспрессию введенных последовательностей или модифицируют и процессируют продукт гена требуемым специфичным образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белко-

вых продуктов могут быть важными для функции белка. Различные клетки-хозяева имеют характерные и специфические механизмы посттрансляционного процессинга и модификации белков и продуктов генов. Подходящие линии клеток или системы клеток-хозяев могут быть выбраны для гарантии правильной модификации и процессинга экспрессируемого чужеродного белка. С этой целью могут применяться эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным аппаратом для правильного процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования продукта гена. Такие клетки млекопитающих включают, без ограничения перечисленными, клетки CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NS0 (линию клеток миеломы мыши, которые эндогенно не продуцируют цепи иммуноглобулинов), CRL7030, COS (например, COS1 или COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 и HsS78Bst. В некоторых вариантах осуществления, антитела против CTLA-4, описанные в настоящей заявке, продуцируются в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO.

В определенном варианте осуществления антитела, описанные в настоящей заявке, или их антигенсвязывающие фрагменты имеют пониженное содержание фукозы или не содержат фукозу. Такие антитела могут быть получены с применением способов, известных специалисту в данной области техники. Например, антитела могут экспрессироваться в клетках с дефицитом или отсутствием способности к фукозилированию. В определенном примере линии клеток с нокаутом обоих аллелей α 1,6-фукозилтрансферазы могут применяться для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов с пониженным содержанием фукозы. Система Potelligent® (Lonza) является примером такой системы, которая может применяться для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов с пониженным содержанием фукозы.

Для длительной продукции рекомбинантных белков с высоким выходом могут быть получены стабильные экспрессирующие клетки. Например, могут быть созданы линии клеток, которые стабильно экспрессируют антитело против CTLA-4, описанное в настоящей заявке, или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке предложена клетка, которая стабильно экспрессирует легкую цепь/вариабельную область легкой цепи и тяжелую цепь/вариабельную область тяжелой цепи, которые ассоциируют с образованием антитела, описанного в настоящей заявке, или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых аспектах вместо применения векторов экспрессии, которые содержат вирусные точки начала репликации, клетки-хозяева можно трансформировать ДНК, находящейся под контролем соответствующих элементов контроля экспрессии (например, промотора, энхансера, последовательностей, терминаторов транскрипции, сайтов полиаденилирования и т.д.) и селективного маркера. После введения чужеродной ДНК/полинуклеотида, рекомбинантные клетки могут расти в течение 1-2 дней в обогащенных средах, а затем среды заменяют селективной средой. Селективный маркер в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость к селекции и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в свои хромосомы и расти, формируя бляшки, которые в свою очередь можно клонировать и размножать с получением линий клеток. Данный метод можно с преимуществом применять для создания линий клеток, которые экспрессируют антитело против CTLA-4, описанное в настоящей заявке, или его фрагмент. Такие рекомбинантные линии клеток могут быть особенно полезными при скрининге и оценке композиций, которые напрямую или опосредованно взаимодействуют с молекулой антитела.

Можно использовать ряд систем селекции, включающих, без ограничения перечисленными, гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler M. et al. (1977) Cell 11(1): 223-32), гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (Szybalska EH & Szybalski W. (1962) PNAS 48(12): 2026-2034) и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy I. et al. (1980) Cell 22(3): 817-23) в tk-, hgprrt- или aprt- клетках соответственно. Кроме того, устойчивость к антиметаболитам может использоваться в качестве основания для селекции по следующим генам: dhfr, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler M. et al. (1980) PNAS 77(6): 3567-70; O'Hare K et al. (1981) PNAS 78: 1527-31); gpt, который придает устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan R.C. & Berg P. (1981) PNAS 78(4): 2072-6); neo, который придает устойчивость к аминогликозиду G-418 (Wu G.Y. & Wu C.H. (1991) Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev P. (1993) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596; Mulligan R.C. (1993) Science 260: 926-932; и Morgan R.A. & Anderson W.F. (1993) Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217; Nabel G.J. & Feigner P.L. (1993) Trends Biotechnol. 11(5): 211-5); и hygro, который придает устойчивость к гигромицину (Santerre R.F. et al. (1984) Gene 30(1-3): 147-56). Методы, общеизвестные в области технологии рекомбинантных ДНК, могут стандартно применяться для отбора нужного рекомбинантного клона, и такие методы описаны, например, в Ausubel F.M. et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Krieglner M., Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); а также в Главах 12 и 13, Dracopoli N.C. et al. (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colbere-Garapin F. et al. (1981) J. Mol. Biol. 150: 1-14, которые включены в настоящую заявку посредством отсылки в полном объеме.

Уровни экспрессии молекулы антитела могут быть повышены путем увеличения копийности вектора (см. обзор Bebbington C.R. & Hentschel C.C.G. The use of vectors based on gene amplification for the ex-

pression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)). Если маркер в векторной системе экспрессии антитела будет амплифицируемым, увеличение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина, будет увеличивать число копий маркерного гена. Поскольку амплифицированная область связана с геном антитела, продукция антитела также повысится (Crouse G.F. et al. (1983) *Mol. Cell. Biol.* 3: 257-66).

Клетку-хозяина можно котрансфицировать двумя или более векторами экспрессии, описанными в настоящей заявке, причем первый вектор кодирует полипептид, полученный из тяжелой цепи, а второй вектор кодирует полипептид, полученный из легкой цепи. Два указанных вектора могут содержать идентичные селективные маркеры, которые обеспечивают равную экспрессию полипептидов тяжелой и легкой цепи. Клетки-хозяева можно котрансфицировать разными количествами указанных двух или более векторов экспрессии. Например, клетки-хозяева можно трансфицировать при любом из следующих соотношений первого вектора экспрессии и второго вектора экспрессии: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 или 1:50.

В альтернативе можно использовать один вектор, который кодирует, и способен к экспрессии, полипептиды тяжелой и легкой цепи. В таких ситуациях легкую цепь нужно поместить перед тяжелой цепью, чтобы избежать избытка токсичной свободной тяжелой цепи (Proudfoot N.J. (1986) *Nature* 322: 562-565; и Kohler G. (1980) *PNAS* 77: 2197-2199). Последовательности, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут включать кДНК или геномную ДНК. Вектор экспрессии может быть моноцистронным или мультицистронным. Мультицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может кодировать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше, или в диапазоне 2-5, 5-10 или 10-20, генов/нуклеотидных последовательностей. Например, бицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может включать, в следующем порядке, промотор, первый ген (например, тяжелую цепь антитела, описанного в настоящей заявке) и второй ген (например, легкую цепь антитела, описанного в настоящей заявке). В таком векторе экспрессии транскрипцию обоих генов может направлять промотор, при этом трансляция мРНК с первого гена может проходить по кэп-зависимому механизму сканирования, а трансляция мРНК со второго гена может проходить по кэп-независимому механизму, например, с помощью IRES.

После получения молекулы антитела, описанного в настоящей заявке, в результате рекомбинантной экспрессии она может быть очищена с помощью любого способа, известного в данной области для очистки молекулы иммуноглобулина, например с помощью хроматографии (например, ионообменной, аффинной, в особенности на основе аффинности к специфическому антигену белка А, и колоночной хроматографии с разделением по размеру), центрифугирования, дифференциальной растворимости или любой другой стандартной методики очистки белков. Кроме того, антитела, описанные в настоящей заявке, могут быть слиты с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в настоящей заявке или иным образом известными в уровне техники, для облегчения очистки.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящей заявке, выделены или очищены. Как правило, выделенное антитело является таким антителом, которое, по существу, не содержит других антител с другой антигенной специфичностью, нежели у выделенного антитела. Например, в определенном варианте осуществления препарат антитела, описанного в настоящей заявке, по существу, не содержит клеточный материал и/или химических предшественников. Выражение "по существу, не содержит клеточный материал" включает препараты антитела, в которых антитело отделено от клеточных компонентов клеток, из которых оно выделено или рекомбинантно получено. Таким образом, антитело, которое по существу не содержит клеточный материал, включает препараты антитела, содержащие меньше чем приблизительно 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5 или 0,1% (в расчете на сухой вес) гетерологичного белка (также указанного в настоящем описании как "контаминирующий белок") и/или варианты антитела, например, другие посттрансляционно модифицированные формы антитела или другие отличные варианты антитела (например, фрагменты антитела). В случае, когда антитело получено рекомбинантно, оно также, как правило, по существу, не содержит среды культивирования, т.е. среда культивирования составляет меньше чем приблизительно 20, 10, 2, 1, 0,5 или 0,1% от объема препарата белка. В случае, когда антитело получено с помощью химического синтеза, оно обычно по существу не содержит химических предшественников или других химических соединений, т.е. оно отделено от химических предшественников или других химических соединений, которые участвуют в синтезе белка. Таким образом, подобные препараты антитела содержат меньше чем приблизительно 30, 20, 10 или 5% (в расчете на сухой вес) химических предшественников или других соединений помимо представляющего интерес антитела. В определенном варианте осуществления антитела, описанные в настоящей заявке, выделены или очищены.

Антитела или их фрагменты, которые специфично связываются с CTLA-4 (например, человеческим CTLA-4), могут быть получены с помощью любого способа, известного в области синтеза антител, например с помощью химического синтеза или методов рекомбинантной экспрессии. В способах, описанных в настоящей заявке, применяются, если не указано иное, стандартные методы молекулярной биологии, микробиологии, генетического анализа, геной инженерии, органической химии, биохимии, ПЦР, синтеза и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот, а также из смежных областей в уровне техники. Такие способы описаны, например, в источниках, цитируемых в настоящей

заявке, и полностью раскрыты в литературе. См., например, Maniatis T. et al. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J. et al. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J. et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 и ежегодные редакции); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 и ежегодные редакции) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B et al. (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

В определенном варианте осуществления антитело, описанное в настоящей заявке, является антителом (например, рекомбинантным антителом), полученным, экспрессированным, созданным или выделенным каким-либо способом, который включает создание, например посредством синтеза, генной инженерии, последовательностей ДНК. В некоторых вариантах осуществления такое антитело включает последовательности (например, последовательности ДНК или аминокислотные последовательности), которые обычно не существуют в репертуаре антител зародышевой линии животного или млекопитающего (например, человека) *in vivo*.

В одном аспекте в настоящей заявке предложен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с CTLA-4 (например, человеческим CTLA-4), включающий культивирование клетки или клетки-хозяина, описанной в настоящей заявке. В определенном аспекте в настоящей заявке предложен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с CTLA-4 (например, человеческим CTLA-4), включающий экспрессию (например, рекомбинантную экспрессию) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с применением клетки или клетки-хозяина, описанной в настоящей заявке (например, клетки или клетки-хозяина, включающей полинуклеотиды, кодирующие антитело, описанное в настоящей заявке). В определенном варианте осуществления клетка является выделенной клеткой. В определенном варианте осуществления в клетку были введены экзогенные полинуклеотиды. В определенном варианте осуществления способ дополнительно включает этап очистки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полученных из клетки или клетки-хозяина. Предпочтительно способ проводят *in vitro*.

Способы получения поликлональных антител известны в уровне техники (см., например, Главу 11 в *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5th Ed., Ausubel F.M. et al., eds., John Wiley and Sons, New York).

Моноклональные антитела могут быть получены с применением целого ряда способов, известных в уровне техники, включающих применение гибридомы, рекомбинантных технологий и технологий фагового дисплея или их комбинации. Например, моноклональные антитела могут быть получены с применением технологий гибридом, в том числе известных в уровне техники и описанных, например в Harlow E. & Lane D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling GJ et al., в *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981). Термин "моноклональное антитело" при использовании в настоящем описании не ограничен антителами, полученными с помощью технологии гибридом. Например, моноклональные антитела могут быть получены рекомбинантно из клеток-хозяев, экзогенно экспрессирующих антитело, описанное в настоящей заявке, или его фрагмент, например, легкую цепь и/или тяжелую цепь такого антитела.

В некоторых вариантах осуществления "моноклональное антитело" при использовании в настоящем описании является антителом, продуцируемым одной клеткой (например, гибридомой или клеткой-хозяином, продуцирующей рекомбинантное антитело), где антитело специфично связывается с CTLA-4 (например, человеческим CTLA-4), как определено, например, с помощью ELISA или другого анализа связывания антигена или конкурентного анализа связывания, известного в уровне техники или представленного в примерах ниже. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело может быть химерным антителом или гуманизированным антителом. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело является моновалентным антителом или мультивалентным (например, бивалентным) антителом. В определенных вариантах осуществления моноклональное антитело является моноспецифичным или мультиспецифичным антителом (например, биспецифичным антителом). Моноклональные антитела, описанные в настоящей заявке, могут быть, например, получены с помощью метода гибридом, как описано в Kohler G. & Milstein C. (1975) *Nature* 256: 495, или могут быть, например, выделены из фаговых библиотек с применением способов, как описано, например, в настоящей заявке. Другие способы получения клональных линий клеток и моноклональных антител, экспрессируемых таким образом, известны в уровне техники (см., например, Главу 11 в *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5th Ed., Ausubel FM et al., выше).

Способы получения и скрининга специфичных антител с применением технологии гибридом являются стандартными и известны в уровне техники. Например, в методе гибридом, мышь или другое подходящее животное-хозяин, такое как овца, козу, кролика, крысу, хомяка или макака, иммунизируют для индукции лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфично связываться с белком (например, CTLA-4 (например, человеческим CTLA-4)), используе-

мым для иммунизации. В альтернативе лимфоциты можно иммунизировать *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с клетками миеломы при использовании подходящего реагента, вызывающего слияние мембран, такого как полиэтиленгликоль, с получением клетки гибридомы (Goding J.W. (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Кроме того, технология RIMMS (многократная иммунизация на нескольких участках) может использоваться для иммунизации животного (Kilpatrick KE et al. (1997) *Hybridoma* 16:381-9, полностью включенная посредством отсылки).

В некоторых вариантах осуществления мыши (или другие животные, такие как крысы, обезьяны, ослы, свиньи, овцы, хомяки или собаки) могут быть иммунизированы антигеном (например, CTLA-4 (например, человеческим CTLA-4)), и после обнаружения иммунного ответа, например антитела, специфичные в отношении антигена, обнаруживают в сыворотке мыши, селезенку мыши забирают и выделяют спленоциты. Затем спленоциты сливают с помощью известных методов с мембранами любых подходящих клеток миеломы, например, клеток из линии клеток SP20, доступной от Американской коллекции типовых культур (ATCC®) (Manassas, VA), с получением гибридом. Гибридомы отбирают и клонируют методом серийных разведений. В некоторых вариантах осуществления лимфатические узлы иммунизированных мышей забирают и подвергают слиянию с клетками миеломы NS0.

Клетки гибридомы, полученные таким образом, сеют и выращивают в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или более веществ, которые ингибируют рост или выживание неслитых исходных клеток миеломы. Например, если исходные клетки миеломы не имеют фермент гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазу (HGPRT или ГФРТ), культуральная среда для гибридом, как правило, будет включать гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), вещества, которые предотвращают рост HGPRT-дефицитных клеток.

В определенных вариантах осуществления используются клетки миеломы, которые эффективно подвергаются слиянию, поддерживают стабильную продукцию высокого уровня антитела отобранными антителопродуцирующими клетками и чувствительны к среде, такой как среда HAT. Такие линии миеломных клеток включают линии миеломы мыши, такие как линию клеток NS0, или линии, полученные из мышинных опухолей MOPC-21 и MPC-11, доступные от Центра дистрибуции клеток Института Солка, Сан-Диего, Калифорния, США, и клетки SP-2 или X63-Ag8.653, доступные от Американской коллекции типовых культур, Роквилл, Мэриленд, США. Линии человеческих клеток миеломы и мышинных-человеческих гетеромиеломных клеток также были описаны для продукции человеческих моноклональных антител (Kozbor D. (1984) *J. Immunol.* 133: 3001-5; Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Культуральная среда, в которой растут клетки гибридомы, исследуют на продукцию моноклональных антител, направленных против CTLA-4 (например, человеческого CTLA-4). Специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридом, определяют с помощью способов, известных в уровне техники, например иммунопреципитации или *in vitro* анализа связывания, такого как радиоиммуноанализ (РИА) или иммуноферментный анализ (ELISA).

После идентификации клеток гибридомы, которые продуцируют антитела с требуемой специфичностью, аффинностью и/или активностью, клоны можно субклонировать методом серийных разведений и выращивать с помощью стандартных методов (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, выше). Подходящие культуральные среды для этой цели включают, например, D-MEM или среду RPMI 1640. Кроме того, клетки гибридомы могут выращивать *in vivo* в виде асцитных опухолей у животного.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, соответственно выделяют из среды культивирования, асцитной жидкости или сыворотки с помощью стандартных методик очистки иммуноглобулинов, таких как, например, белок А-сефароза, хроматография на гидроксипатите, гель-электрофорез, диализ или афинная хроматография.

Антитела, описанные в настоящей заявке, включают фрагменты антител, которые распознают специфический CTLA-4 (например, человеческий CTLA-4), и могут быть получены с помощью любой методики, известной специалистам в данной области. Например, Fab и F(ab')₂ фрагменты, описанные в настоящей заявке, могут быть получены при протеолитическом расщеплении молекул иммуноглобулинов с использованием таких ферментов, как папаин (для получения Fab-фрагментов) или пепсин (для получения F(ab')₂ фрагментов). Fab-домен соответствует одному из двух идентичных плечей молекулы антитела и содержит полную легкую цепь, соединенную с VH и CH1 доменами тяжелой цепи. F(ab')₂-фрагмент содержит два антигенсвязывающих плеча молекулы антитела, связанной дисульфидными мостиками в шарнирной области.

Кроме того, антитела, описанные в настоящей заявке, или их антигенсвязывающие фрагменты также могут быть получены с применением различных методов фагового дисплея, известных в уровне техники. В методах фагового дисплея функциональные домены антитела экспонированы на поверхности фаговых частиц, которые несут полинуклеотидные последовательности, кодирующие их. В частности, последовательности ДНК, кодирующие VH- и VL-домены, амплифицируют из библиотек кДНК животных (например, библиотек человеческих или мышинных кДНК пораженных тканей). ДНК, кодирующую VH- и VL-домены, рекомбинируют вместе с scFv линкером с помощью ПЦР и клонируют в фагмидный

вектор. Вектор вводят с помощью электропорации в *E.coli* и заражают *E.coli* хелперным фагом. Фаг, применяемый в таких способах, обычно является нитчатым фагом, в том числе fd и M13, и VH- и VL-домены обычно подвергают рекомбинантному слиянию либо с геном фага III или с геном VIII. Фаг, экспрессирующий антигенсвязывающий домен, который связывается с конкретным антигеном, может быть отобран или идентифицирован с антигеном, например, при использовании меченого антигена или антигена, связанного или фиксированного на твердой поверхности или сфере. Примеры фагового дисплея включают способы, которые могут применяться для получения антител, описанных в настоящей заявке, включают способы, раскрытые в Brinkman U. et al. (1995) *J. Immunol. Methods*. 182: 41-50; Ames R.S. et al. (1995) *J. Immunol. Methods* 184: 177-186; Kettleborough C.A. et al. (1994) *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958; Persic L. et al. (1997) *Gene* 187: 9-18; Burton D.R. & Barbas C.F. (1994) *Advan. Immunol.* 57: 191-280; заявке PCT PCT/GB91/001134; публикациях Международных заявок WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401 и WO 97/13844; и в патентах США 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743, и, 5969108.

Как описано в вышеуказанных источниках, после отбора фага кодирующие области антитела из фага можно выделить и использовать для получения полных антител, в том числе человеческих антител или любого другого требуемого антигенсвязывающего фрагмента, и экспрессировать в любом требуемом организме-хозяине, включающем клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки растений, дрожжей и бактерий, например, как описано ниже. Методики рекомбинантного получения фрагментов антител, таких как Fab, Fab' и F(ab')₂ фрагменты, также можно использовать с применением способов, известных в уровне техники, таких как способы, раскрытые в публикации PCT WO 92/22324; Mullinax R.L. et al. (1992) *BioTechniques* 12 (6): 864-9; Sawai H. et al. (1995) *Am. J. Reprod. Immunol.* 34: 26-34; и Better M. et al. (1988) *Science* 240: 1041-1043.

В некоторых вариантах осуществления для получения полных антител, ПЦР-праймеры, включающие VH или VL нуклеотидные последовательности, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты сайта рестрикции, могут применяться для амплификации VH или VL последовательностей с матрицы, например scFv клонов. При использовании методов клонирования, известных специалистам в данной области, ПЦР амплифицированные VH-домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие VH константную область, и ПЦР амплифицированные VL-домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие VL константную область, например человеческие κ или λ константные области. VH- и VL-домены также можно клонировать в один вектор, экспрессирующий нужные константные области. Векторы конверсии тяжелой цепи и векторы конверсии легкой цепи затем котрансфицируют в линии клеток с получением стабильных или транзистентных линий клеток, которые экспрессируют полно-размерные антитела, например IgG, с применением методик, известных специалистам в данной области.

Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой разные части антитела получены из разных молекул иммуноглобулинов. Например, химерное антитело может содержать вариабельную область моноклонального антитела мыши или крысы, слитую с константной областью человеческого антитела. Способы получения химерных антител известны в уровне техники. См., например, Morrison S.L. (1985) *Science* 229: 1202-7; Oi VT & Morrison S.L. (1986) *BioTechniques* 4: 214-221; Gillies S.D. et al. (1989) *J. Immunol. Methods*. 125: 191-202; и патенты США 5807715, 4816567, 4816397 и 6331415.

Гуманизированное антитело способно связываться с заданным антигеном и включает каркасную область, по существу, имеющую аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина, и CDR-области, по существу, имеющие аминокислотную последовательность нечеловеческого иммуноглобулина (например, мышинового иммуноглобулина). В определенных вариантах осуществления гуманизированное антитело также включает по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило константной области человеческого иммуноглобулина. Антитело также может включать CH1, шарнирную область, CH2, CH3 и CH4 области тяжелой цепи. Гуманизированное антитело может быть выбрано из любого класса иммуноглобулинов, в том числе IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, в том числе IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. Гуманизированные антитела могут быть получены при использовании множества методов, известных в уровне техники, включающих, без ограничения, CDR-графтинг (европейский патент EP 239400; Международная публикация WO 91/09967; и патенты США 5225539, 5530101 и 5585089), винирование или перекладку (европейские патенты EP 592106 и EP 519596; Padlan E.A. (1991) *Mol. Immunol.* 28 (4/5): 489-498; Studnicka G.M. et al. (1994) *Prot. Engineering* 7(6): 805-814; и Roguska M.A. et al. (1994) *PNAS* 91: 969-973), перестановка цепей (патент США 5565332), а также способы, раскрытые, например, в патенте США 6407213, патенте США 5766886, Международной публикации WO 93/17105; Tan P. et al. (2002) *J. Immunol.* 169: 1119-25; Caldas C. et al. (2000) *Protein Eng.* 13(5): 353-60; Morea V. et al. (2000) *Methods* 20(3): 267-79; Baca M. et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272(16): 10678-84; Roguska M.A. et al. (1996) *Protein Eng.* 9(10): 895 904; Couto J.R. et al. (1995) *Cancer Res.* 55 (23 Supp) : 5973s-5977s; Couto J.R. et al. (1995) *Cancer Res.* 55(8): 1717-22; Sandhu J.S. (1994) *Gene* 150(2): 409-10 и Pedersen J.T. et al. (1994) *J. Mol. Biol.* 235(3): 959-73. См. также публикацию заявки на патент США US 2005/0042664 A1 (24 февраля 2005 года), которая в полном объеме включена в настоящую заявку посредством отсылки.

Способы получения мультиспецифичных (например, биспецифичных) антител были описаны, например, в патентах США 7951917; 7183076; 8227577; 5837242; 5989830; 5869620; 6132992 и 8586713.

Однодоменные антитела, например антитела, не имеющие легких цепей, могут быть получены с помощью способов, известных в уровне техники. См. Riechmann L. & Muyldermans S. (1999) *J. Immunol.* 231: 25-38; Nuttall S.D. et al. (2000) *Curr. Pharm. Biotechnol.* 1 (3): 253-263; Muyldermans S., (2001) *J. Biotechnol.* 74(4): 277-302; патент США 6005079; и Международные публикации WO 94/04678, WO 94/25591 и WO 01/44301.

Кроме того, антитела, которые специфично связываются с антигеном CTLA-4, могут, в свою очередь, применяться для получения антиидиотипических антител, которые "имитируют" антиген, с использованием методик, известных специалистам в данной области техники. См., например, Greenspan N.S. & Bona C.A. (1989) *FASEB J.* 7 (5): 437-444; и Nissinoff A. (1991) *J. Immunol.* 147 (8): 2429-2438.

В определенных вариантах осуществления антитело, описанное в настоящей заявке, которое связывается с тем же эпитопом CTLA-4 (например, человеческого CTLA-4), что и антитело против CTLA-4, описанное в настоящей заявке, является человеческим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В определенных вариантах осуществления антитело, описанное в настоящей заявке, которое конкурентно блокирует (например, дозозависимым образом) связывание любого из антител, описанных в настоящей заявке, с CTLA-4 (например, человеческим CTLA-4), является человеческим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Человеческие антитела могут быть получены с применением любого способа, известного в уровне техники. Например, могут применяться трансгенные мыши, которые не способны к экспрессии функциональных эндогенных иммуноглобулинов, но которые могут экспрессировать человеческие иммуноглобулиновые гены. В частности, комплексы человеческих генов тяжелой и легкой цепи иммуноглобулинов могут быть рандомизированно или посредством гомологичной рекомбинации введены в эмбриональные стволовые клетки мыши. В альтернативе человеческая вариационная область, константная область и область разнообразия могут быть введены в эмбриональные стволовые клетки мыши в дополнение к человеческим генам тяжелой и легкой цепи. Мышиные гены тяжелой и легкой цепи иммуноглобулинов можно сделать нефункциональными отдельно или одновременно с введением человеческих локусов иммуноглобулинов при гомологичной рекомбинации. В частности, гомозиготная делеция J_H области препятствует продукции эндогенных антител. Модифицированные эмбриональные стволовые клетки размножают и вводят посредством микроинъекции в бластоцисты с получением химерных мышей. Затем химерных мышей разводят с получением гомозиготного потомства, которое экспрессирует человеческие антитела. Трансгенных мышей иммунизируют выбранным антигеном нормальным путем, например полным антигеном или частью антигена (например, CTLA-4). Моноклональные антитела, направленные против антигена, можно получать из иммунизированных трансгенных мышей при использовании стандартной технологии гибридом. Человеческие трансгены иммуноглобулинов, которые несут трансгенные мыши, перестраиваются в процессе дифференцировки В-клеток и затем подвергаются переключению класса и соматической мутации. Таким образом, при использовании такой методики можно получать терапевтически полезные IgG, IgA, IgM и IgE антитела. Для получения обзора по данной технологии получения человеческих антител см. Lonberg N & Huszar D (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93. По поводу подробного обсуждения данной технологии получения человеческих антител и человеческих моноклональных антител, а также методик получения таких антител, см., например, Международные публикации WO 98/24893, WO 96/34096 и WO 96/33735; и патенты США 5413923, 5625126, 5633425, 5569825, 5661016, 5545806, 5814318 и 5939598, 5569825. Примеры мышей, способных продуцировать человеческие антитела, включают Xenomouse™ (Abgenix, Inc.; патенты США 6075181 и 6150184), HuAb-Mouse™ (Mederex, Inc./Gen Pharm; патенты США 5545806 и 5569825), Trans Chromo Mouse™ (Kirin) и KM Mouse™ (Medarex/Kirin).

Человеческие антитела, которые специфично связываются с CTLA-4 (например, человеческим CTLA-4), могут быть получены множеством способов, известных в уровне техники, включающих методы фагового дисплея, описанные выше, с использованием библиотек антител, полученных из человеческих иммуноглобулиновых последовательностей. См. также патенты США 4444887, 4716111 и 5885793; и Международные публикации WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741.

В некоторых вариантах осуществления человеческие антитела могут быть получены с применением мышиных-человеческих гибридом. Например, человеческие лимфоциты периферической крови, трансформированные вирусом Эпштейна-Барр (EBV), могут быть слиты с клетками миеломы мыши, с получением мышиных-человеческих гибридом, секретирующих человеческие моноклональные антитела, и такие мышиные-человеческие гибридомы можно подвергать скринингу с целью определения гибридом, которые секретируют человеческие моноклональные антитела, которые специфично связываются с антигеном-мишенью (например, CTLA-4 (например, человеческим CTLA-4)). Такие способы известны и описаны в уровне техники, например, в Shinmoto H. et al. (2004) *Cytotechnology* 46: 19-23; Naganawa Y. et al. (2005) *Human Antibodies* 14: 27-31.

5.6. Наборы.

Также предложены наборы, включающие одно или более антител, описанных в настоящей заявке, или их фармацевтическая композиция или конъюгат. В определенном варианте осуществления в настоящей заявке предложена фармацевтическая упаковка или набор, включающие один или несколько контейнеров, наполненных одним или более компонентами фармацевтических композиций, описанных в настоящей заявке, такими как одно или более антител, предложенных в настоящей заявке, или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления наборы содержат фармацевтическую композицию, описанную в настоящей заявке, и какое-либо профилактическое или терапевтическое средство, такое как описанные в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления наборы могут содержать Т-клеточный митоген, такой как, например, фитогемагглютинин (ФГА) и/или форболмиристат-ацетат (ФМА), или стимулирующее ТКР-комплекс антитело, такое как антитело против CD3 и антитело против CD28. Необязательно такой контейнер(ы) может быть ассоциирован с уведомлением в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, где такое уведомление отражает разрешение государственным органом производства, применения или продажи для применения человеком.

Также предложены наборы, которые могут применяться в вышеуказанных способах. В одном варианте осуществления набор включает антитело, описанное в настоящей заявке, предпочтительно очищенное антитело, в одном или более контейнерах. В определенном варианте осуществления наборы, описанные в настоящей заявке, содержат, по существу, выделенный антиген CTLA-4 (например, человеческий CTLA-4) в качестве контроля. В другом определенном варианте осуществления наборы, описанные в настоящей заявке, дополнительно включают контрольное антитело, которое не реагирует с антигеном CTLA-4. В другом определенном варианте осуществления наборы, описанные в настоящей заявке, содержат один или более элементов для обнаружения связывания антитела с антигеном CTLA-4 (например, антитело может быть конъюгировано с детектируемым субстратом, таким как флуоресцентное соединение, ферментный субстрат, радиоактивное соединение или люминесцентное соединение, или второе антитело, которое распознает первое антитело, может быть конъюгировано с детектируемым субстратом). В некоторых вариантах осуществления набор, предложенный в настоящей заявке, может включать рекомбинантно полученный или химически синтезированный антиген CTLA-4. Антиген CTLA-4, представленный в наборе, также может быть присоединен к твердой подложке. В более конкретном варианте осуществления средство обнаружения в вышеописанном наборе включает твердую подложку, к которой прикреплен антиген CTLA-4. Такой набор может также включать неприкрепленное, меченное репортером антитело против антитела человека или антитело против антитела мыши/крысы. В данном варианте осуществления связывание антитела с антигеном CTLA-4 может быть обнаружено при связывании указанного меченого репортером антитела.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению набора согласно настоящему изобретению для *in vitro* анализа и/или обнаружения человеческого CTLA-4 в биологическом образце.

6. Примеры

Примеры в данном разделе (т.е. Разделе 6) предложены в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

6.1. Пример 1. Анализ антитела против CTLA-4.

В данном примере описано исследование антител, которые связываются с человеческим CTLA-4. В частности, антитело, обозначенное AGEN1884, исследовали в ряде анализов, описанных ниже. Антитело против CTLA-4, AGEN1884, включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. Антитело AGEN1884 представляет собой человеческое антитело IgG₁, содержащее замену T109S (т.е. замену треонина серином в положении 109 по сравнению с Fc последовательностью дикого типа), при нумерации согласно Кэбату, в константном домене легкой цепи, которая облегчает клонирование вариабельной области в рамке считывания с константной областью. Данная мутация является консервативной модификацией, которая не затрагивает связывание или функцию антитела. Также был получен аналог дикого типа, обозначенный AGEN1884w, который содержит треонин в положении 109, при нумерации согласно Кэбату. Антитело AGEN1884w является человеческим антителом IgG₁, включающим тяжелую цепь SEQ ID NO: 93 и легкую цепь SEQ ID NO: 13.

6.1.1. Кинетический анализ с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

Поверхностный плазмонный резонанс использовали для определения аффинности антитела против CTLA-4, AGEN1884 и референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 (система с повышенной чувствительностью BIAcore® T100/T200 (GE Healthcare) и анализ с Fab-захватом). Все взаимодействия анализировали при 25°C с использованием 1×DPBS (PAA, H15-002) плюс P20 (0,05%, Pierce, 28320) в качестве рабочего буфера. Антитела против CTLA-4 (8 мкг/мл в рабочем буфере) захватывали на поверхности сенсорного чипа CM5 (GE Healthcare, Series S CM5, BR-1005-30) посредством иммобилизованного антитела против Fab человека (GE Healthcare, Fab Capture Kit, 28958325). Для обнаружения неспецифических взаимодействий антигена CTLA-4, захват антитела производили только в проточной кювете 2, тогда как в

проточной кювете 1 было только иммобилизовано захватывающее антитело. После захвата антител против CTLA-4 антигены CTLA-4 пропускали через обе проточные кюветы в различных количествах. В частности, рекомбинантный человеческий CTLA-4-Fc (R&D Systems, # 7268-CT), рекомбинантный человеческий CTLA-4 (Sino Biological, # 11159-H08H), рекомбинантный CTLA-4-Fc яванского макака (Sino Biological, # 90213-C02H) и рекомбинантный CTLA-4 яванского макака (Sino Biological, # 90213-C08H) пропускали в количестве 100, 25 и 6,25 нМ; и рекомбинантный мышинный CTLA-4-Fc (R&D, # 434-CT), рекомбинантный крысиный CTLA-4-Fc (Sino Biological, # 81069-R02H) и рекомбинантный крысиный CTLA-4 (Sino Biological, # 81069-R08H) пропускали в количестве 400, 100 и 25 нМ. Нулевую кривую (только рабочий буфер) также включали в каждый анализ. Ассоциацию проводили в течение 90 с, а диссоциацию в течение 600 с, при скорости потока 10 мкл/мин. После каждого анализа проводили этап регенерации 10 мМ глицина, pH 2,0 (GE Healthcare, BR-1003-55), в течение 60 с при 30 мкл/мин. Кривые связывания оценивали при помощи программы для оценки BIAcore® T200 версии 2.0.1 с применением модели Ленгмюра 1:1 с глобальной аппроксимацией R_{max}. На основе этих значений вычисляли аффинности (K_D) AGEN1884 и референсного антитела против CTLA-4 к различным антигенам, которые показаны на фиг. 1А. Рекомбинантный мономерный CTLA-4 яванского макака, мышинный CTLA-4-Fc и мономерный крысиный CTLA-4, используемые в данном исследовании, не прошли оценку контроля качества.

Связывание антител против CTLA-4 с рекомбинантным мышинным белком CTLA-4-Fc, который демонстрировал 50% агрегацию, происходило, по-видимому, вследствие неспецифических взаимодействий. Анализ методом поверхностного плазмонного резонанса позже повторяли дважды с использованием рекомбинантного мышинного CTLA-4-Fc (Sino Biological, # 81069-R02H), который прошел оценку контроля качества, при 360, 120, 40 и 13,3 нМ для AGEN1884w. AGEN1884w не показало поддающегося обнаружению связывания с мышинным CTLA-4.

6.1.2. Связывание антитела с клетками, сверхэкспрессирующими CTLA-4.

Клетки Jurkat, сверхэкспрессирующие человеческий (Promega) CTLA-4, поддерживали в RPMI1640 (Life Technologies), содержащей 10% FBS (Gemini Bio Products), 100 мкг/мл гигромицина В (Gibco) и 500 мкг/мл G418 (Promega). Перед окрашиванием антителами клетки один раз промывали в FACS буфере (PBS с 2% FBS). Серийные разведения AGEN1884w, референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 и изотипического контрольного IgG₁, начиная с 10 мкг/мл, добавляли в лунки 96-луночных планшетов с круглодонными лунками в двойной повторности, в объеме 100 мкл и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Клетки три раза промывали 150 мкл FACS буфера и окрашивали в 100 мкл FACS буфера, содержащего 0,25 мкл ФЭ-конъюгированного мышинного антитела против к-цепи человека (Invitrogen), в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки два раза промывали и ресуспендировали в 100 мкл FACS буфера. Образцы анализировали на LSRFortessa (BD Biosciences). Средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) анализировали при помощи программы FlowJo (FlowJo, LLC) и наносили на график при использовании Prism 6 (программа GraphPad). Как показано на фиг. 1В, антитело AGEN1884w, связанное с человеческим CTLA-4, экспрессировалось на поверхности клеток Jurkat.

6.1.3. Анализ селективности антитела к CTLA-4.

Селективность AGEN1884 в отношении CTLA-4 оценивали по сравнению с другими представителями суперсемейства иммуноглобулинов при использовании технологии суспензионных чипов в качестве мультиплексного анализа. Ряд представителей суперсемейства иммуноглобулинов химически соединяли с микросферами Luminex® при использовании стандартной NHS-сложноэфирной химии. Очищенные материалы AGEN1884, референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 и изотипического контрольного IgG₁ разводили в буфере для анализа (Roche 1112589001) до 10, 100 и 1000 нг/мл. Коротко, по 25 мкл каждого разведения инкубировали в темноте (20°C, 650 об/мин) с микросферами 1500 Luminex® в 5 мкл буфера для анализа, в течение 1 ч в 96-луночных планшетах с фильтрующей мембраной (Millipore, MABVN1250). Микросферы Luminex® сшивали с рекомбинантным человеческим CTLA-4-Fc (R&D Systems, # 7268-CT), рекомбинантным CTLA-4-Fc яванского макака (Sino Biological, # 90213-C02H), rhCD28-Fc (R&D, # 342-CD-200), rhICOS-Fc (R&D, # 169-CS-050), rhBTLA-Fc (Sino Biological, # 11896-H02H), rhPD-1-Fc (R&D Systems, # 1086-PD) или рекомбинантным PD-1-Fc яванского макака (полученным в собственной лаборатории) посредством связывания аминокислот с COOH на поверхности сфер. Стандартные кривые получали при использовании в двойной повторности стандарта 25 мкл человеческого IgG₁ (Sigma, I5154) в серии разведений 1:3 (0,08-540 нг/мл). Детектирование выполняли при использовании 60 мкл антитела козы против человеческого F(ab)₂ IgG, меченного R-PE (2,5 мкг/мл; JIR 109-116-098, AbDSerotec Rapid RPE Antibody Conjugation Kit, LNK022RPE) при инкубировании в течение еще одного часа (20°C, 650 об/мин). Планшеты анализировали при использовании системы Luminex® 200 (Millipore). В общей сложности 100 сфер подсчитывали в каждой лунке в объеме образца 48 мкл. Значения MFI ФЭ использовали для определения специфического или неспецифического связывания с рекомбинантными белками, указанными выше.

Как показано на фиг. 1С и 1D, антитело AGEN1884 демонстрировало специфичное связывание с CTLA-4 человека и яванского макака. Никакого значимого связывания с другими перечисленными представителями суперсемейства иммуноглобулинов не наблюдали при тестируемых концентрациях.

6.1.4. Связывание антитела с CTLA-4, экспрессируемым активированными Т-клетками.

Следующим шагом исследовали связывание AGEN1884w с CTLA-4, экспрессируемым на поверхности активированных человеческих Т-клеток. Человеческие МКПК, выделенные при разделении в градиенте плотности фиколл из лейкоценок здоровых доноров (Research Blood Components, LLC), обогащали интактными CD4⁺ Т-клетками при помощи магнитных гранул (Stemcell Technologies). Обогащенную популяцию CD4⁺ Т-клеток затем ресуспендировали в среде RPMI1640 с добавкой 10% человеческой АВ сыворотки (Sigma) при плотности 1×10^6 /мл. По 1×10^5 клеток в 100 мкл сеяли в каждую лунку 96-луночных планшетов с плоскодонными лунками, предварительно покрытых антителом против CD3 (3 мкг/мл, BD Biosciences) и антителом против CD28 (10 мкг/мл, BD Biosciences), и культивировали при 37°C и 5% CO₂. В день 5 клетки объединяли в пулы и подсчитывали на Muse Cell Analyzer (Millipore EMD). 50000 клеток окрашивали 100 мкл AGEN1884w, референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 и изотипического контрольного IgG₁ в серийных разведениях от 10 мкг/мл в 96-луночных планшетах с круглодонными лунками в течение 30 мин при 4°C. Клетки три раза промывали 150 мкл FACS буфера и окрашивали в 100 мкл FACS буфера, содержащего 0,25 мкл ФЭ-меченного мышиного антитела против каппа-цепи человека (Invitrogen) и 1 мкл APC-CD4 (BD Biosciences), в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки два раза промывали и ресуспендировали в 100 мкл FACS буфера. Образцы анализировали на FAC-SCanto II System (BD Biosciences). Средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) ФЭ в CD4⁺ Т-клетках анализировали при использовании программы FlowJo (FlowJo, LLC). Как показано на фиг. 2А, AGEN1884w связывался с CTLA-4, экспрессируемым на поверхности активированных человеческих CD4⁺ Т-клеток.

Характеристики связывания антитела AGEN1884 с CTLA-4 яванского макака (*Macaca fascicularis*) исследовали с помощью проточного цитометрического анализа. МКПК яванского макака (Биомедицинский исследовательский центр приматов, Нидерланды), выделенные в градиенте фиколл, активировали при использовании связанных на планшете антител против CD3 (8 мкг/мл, BD, 557 052) и против CD28 (0,1 мкг/мл, eBioscience, кат. 16-0289-85) в присутствии 50 Ед/мл IL-2 (BioLegend, 589106) в течение 3 дней в среде RPMI-1640 с добавкой 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 10 mM HEPES и $1 \times$ Pen/Strep глутамин при 37°C и 5% CO₂. После активации, клетки инкубировали с антителом против CD8a (eBioscience, 9043-0087-120), разведенным 1:100 в FACS буфере (PBS с 2% FBS), в течение 30 минут при 4°C. Затем клетки два раза промывали FACS буфером и применяли методику Cytofix/Сytoperm для набора BD Bioscience (51-2090KZ) согласно протоколу производителя. Серийные разведения 1:3 от 9 до 0,037 мкг/мл AGEN1884, референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 и изотипического контрольного IgG₁ добавляли к клеткам. Образцы суспендировали в 200 мкл FACS буфера и анализировали при использовании проточного цитофлуориметра FACS Diva (BD Biosciences). При использовании для внутриклеточного окрашивания, антитело против CTLA-4 AGEN1884 показало связывание с активированными CD8⁺Т-клетками яванского макака (фиг. 2В).

Затем мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека, яванского макака (индокитайский), крысы или мыши вносили в лунки 96-луночного планшета для культур тканей с круглодонными лунками (1×10^5 клеток/лунка) и стимулировали в течение 4 дней в RPMI-1640 с добавкой 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 15 mM HEPES, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамин, 100 МЕ/мл IL-2 (Peprotech) и 1 мкг/мл фитогемагглютинаина (ФГА) (Roche) при 37°C и 5% CO₂. После стимуляции клетки промывали и добавляли 5% термоинактивированной человеческой АВ сыворотки (Sigma-Aldrich) для блокирования Fc-рецепторов и предотвращения неспецифического связывания антител. Клетки снова промывали и ресуспендировали в 100 мкл разбавленного АФЦ-конъюгированного антитела против CD4 (клон ОКТ4, GK15 или W3/25; Biolegend). После инкубирования в течение 45 минут в темноте, клетки три раза промывали и пермеабелизировали при использовании набора FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience) согласно инструкциям производителя. После пермеабелизации клетки инкубировали с серийными разведениями флуоресцентно меченного (Pacific Blue™) AGEN1884w или изотипического контрольного антитела при концентрациях от 0,00003 мкг/мл до 10 мкг/мл в течение 45 мин при 4°C в темноте. Клетки два раза промывали перед проточным цитометрическим анализом при использовании Becton Dickinson LSRFortessa™. Данные анализировали при использовании программы FlowJo (Version 10). Как показано на фиг. 2С, антитело AGEN1884w связывалось с ФГА-стимулированными CD4⁺ Т-клетками человека и яванского макака, но не с Т-клетками крысы или мыши.

6.1.5. Активность блокирования лиганда.

Для определения, блокируют ли антитела против CTLA-4 связывание лигандов CD80 и CD86, проводили подготовку к анализу ранжирования при использовании технологии суспензионных чипов (схематически показанной на фиг. 3А). Сферы 1200 Luminex® в 5 мкл буфера для анализа (Luminex Corp., #14 LC10014-01) добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета с половинным объемом лунок (Corning, Inc., 3884). Сферы сшивали с антигеном CTLA-4 (rhCTLA-4-Fc, R&D, # 7268-CT) посредством связывания аминокислот с COOH на поверхности сфер. Реакцию сшивания проводили при использовании 50 мкг/мл антигена CTLA-4 и 1×10^7 сфер Luminex в мл. Стандартную NHS-сложноэфирную химию ис-

пользовали для образования карбодиимидных связей между первичными аминогруппами антигена и карбоксильными группами на поверхности сфер (глава 3 руководства Luminex Xmap).

Связывание антигена в случае белков является простой двухстадийной карбодиимидной процедурой, в ходе которой карбоксильные группы микросфер сначала активируют реагентом EDC (гидрохлоридом 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимида) в присутствии сульфо-NHS (N-гидрокисульфосукцинимид) с получением промежуточного сложного сульфо-NHS-эфира. Затем реакционно-способное промежуточное соединение подвергается замещению в реакции с первичным амином целевой молекулы (антитела, белка или пептида), с образованием ковалентной амидной связи. Связанные сферы инкубировали с разными концентрациями антител против CTLA-4 (концентрациями от 9000 до 12 нг/мл в 25 мкл буфера для анализа на лунку, перед добавлением сфер) в течение 1 ч при 20°C и 650 об/мин. В тесте использовали следующие антитела против CTLA-4: AGEN1884, референсное IgG₁ антитело против CTLA-4 и изотипическое контрольное IgG₁ антитело. После этого по 30 мкл R-PE меченного CD80 (R&D Systems, # 140-B1) или CD86 (R&D Systems, # 141-B2) в концентрации 1 нМ добавляли в каждую лунку с получением общего объема 60 мкл в лунке (1200 бусинок в лунке и конечная концентрация 0,5 нМ меченого CD80 или CD86). Мечение лиганда выполняли в собственной лаборатории при использовании наборов для R-PE мечения (AbDSerotec, LYNX Rapid RPE Antibody Conjugation Kit, LNK023RPE) согласно протоколу производителя. Планшеты анализировали при использовании системы Luminex® 200 (Millipore). По 100 сфер подсчитывали в лунке в объеме образца 50 мкл. Активность блокирования лиганда вычисляли при использовании значений MFI неконкурентного сигнала (100% связывание) контроля, содержащего только лиганд. Поддающийся обнаружению сигнал ФЭ показывал связывание лиганда с антигеном. AGEN1884 ингибировало связывание CD80 (фиг. 3B) и CD86 (фиг. 3C) с CTLA-4 с расчетным значением IC₅₀ 56 нг/мл.

Затем исследовали способность антител против CTLA-4 блокировать связывание рекомбинантного CD80-Fc и CD86-Fc с CTLA-4, экспрессируемым на клеточной поверхности. Коротко, CTLA-4 экспрессирующие Т-клетки (Jurkat) инкубировали с повышаемыми концентрациями AGEN1884w, референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 или изотипического контрольного IgG₁ антитела (0, 0,001, 0,004, 0,012, 0,037, 0,11, 0,33, 0,99 и 2,96 мкг/мл) с последующим добавлением фиксированной концентрации (0,625 мкг/мл) флуоресцентно меченного CD80-Fc или CD86-Fc. Процент клеток, связавшихся с CD80-Fc или CD86-Fc, определяли с помощью проточной цитометрии. Как показано на фиг. 3D, AGEN1884w и референсное IgG₁ антитело против CTLA-4 ингибировали связывание CD80-Fc и CD86-Fc с клетками Jurkat, экспрессирующими CTLA-4.

После этого антитело против CTLA-4, AGEN1884w, исследовали на его способность разрушать предварительно образованные комплексы экспрессируемого на клеточной поверхности CTLA-4 и рекомбинантного CD80 или CD86. Коротко, рекомбинантные клетки Jurkat, конститутивно экспрессирующие CTLA-4 на клеточной поверхности, инкубировали с серийными разведениями CD80-Fc или CD86-Fc (R&D Systems) (от 10 до 0,0002 мкг/мл) в течение 30 мин при 4°C, в 96-луночном планшете с круглыми лунками. После промывки добавляли фиксированную концентрацию (67 нМ) флуоресцентно меченного (PerCP-CY5.5) AGEN1884w или референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 и инкубировали планшет в течение 30 мин при 4°C. Планшет снова промывали и клетки ресуспендировали в 100 мкл 1% параформальдегида (Alfa Aear) в PBS. Образцы анализировали при использовании проточного цитофлуориметра Becton Dickinson FACSCanto™, и данные анализировали при использовании программы FlowJo (Version 10). Антитело AGEN1884w разрушало предварительно образованные комплексы CTLA-4 и CD80 или CD86 дозозависимым образом (фиг. 3E).

6.1.6. Действие антител против CTLA-4 на человеческие Т-клетки после стимуляции стафилококковым энтеротоксином А (SEA).

Функциональная активность антител против CTLA-4 в отношении первичных человеческих Т-клеток оценивали после стимуляции стафилококковым энтеротоксином А (SEA).

Криоконсервированные МКПК (10⁵ клеток/лунка) в RPMI1640 с добавкой пенициллина, стрептомицина и 10% FBS (Hyclone) добавляли в 96-луночные планшеты NUNCLON с поверхностью Delta (NUNC™). Клетки культивировали в присутствии повышаемых концентраций антитела 3,2, 16, 80, 400, 2000, 10000 и 50000 и 100 нг/мл SEA (Toxin Technologies) в течение 5 дней при 37°C, 5% CO₂ и 97% влажности. В тестировании использовали следующие антитела: AGEN1884w, референсное IgG₁ антитело против CTLA-4 и изотипическое контрольное IgG₁. Осветленный супернатант собирали и хранили при -80°C до анализа. Титры IL-2 получали с помощью электрохемилюминесценции (MSD).

Как показано на фиг. 4A, AGEN1884w повышало продукцию IL-2 Т-клетками в присутствии стимуляции SEA.

6.1.7. Действие антитела против CTLA-4 на линию клеток с IL-2-люциферазным репортером.

Функциональную активность антитела против CTLA-4 AGEN1884w дополнительно исследовали при использовании анализа с IL-2-люциферазным репортером. Коротко, линию человеческих Т-клеток (Jurkat), которые эндогенно экспрессировали CD28, создавали с возможностью конститутивной экспрессии CTLA-4 на клеточной поверхности и репортерного гена люциферазы под контролем промотора IL-2.

Рекомбинантную линию клеток Jurkat совместно культивировали с линией антигенпрезентирующих клеток (Raji), которые экспрессировали CD80 и CD86. Активацию Т-клеточного рецептора (ТКР) (Сигнал 1) обеспечивали посредством мышиного антитела против CD3 человека и антитела козы против мышиного IgG (H+L); и костимулирующую сигнализацию (Сигнал 2) обеспечивали при транс-активации CD80 и CD86, экспрессируемые на клетках Raji. Экспрессию CD80 и CD86 на клетках Raji подтверждали с помощью проточной цитометрии (фиг. 4B). Перекрестное сшивание ТКР на линии Т-клеток Jurkat вызывало экспрессию IL-2, приводящую к продукции люциферазы, суррогатного маркера активации Т-клеток. Совместное культивирование двух указанных клеточных линий приводило к захвату ингибиторного корепрецептора CTLA-4 (экспрессируемого на клетках Jurkat) его естественными лигандами CD80 и CD86 (экспрессируемые на клетках Raji), вызывая ингибирование активации Т-клеток, демонстрируемую при отсутствии экспрессии люциферазы. Такое ингибирование снималось при добавлении повышаемых концентраций AGEN1884w (от 0 до 300 мкг/мл) вследствие блокирования AGEN1884w взаимодействия CTLA-4 с его лигандами, CD80 и CD86, и смещению взаимодействия этих лигандов с костимулирующим корепрецептором Т-клеток, CD28. Экспрессию люциферазы определяли количественно при использовании реактива Bio-Glo™ и использовали полученные данные для определения максимальных кратных значений ответа (кратного увеличения в присутствии AGEN1884w по сравнению с изотипическим контрольным IgG₁ антителом).

Как показано на фиг. 4C, антитело против CTLA-4 дозозависимо AGEN1884w снимало опосредованное CTLA-4 ингибирование Т-клеток в данном анализе с IL-2-люциферазным репортером.

6.1.8. Отсутствие агонистической активности у антитела против CTLA-4.

Оценивали способность AGEN1884w опосредовать прямую сигнализацию CTLA-4. Первичные CD3-экспрессирующие человеческие Т-клетки выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови при использовании набора микросфер Miltenyi Pan T cell и культивировали со связанным на планшете антителом против CD3 (клон SP34, 10 мкг/мл) для активации сигнализации ТКР. AGEN1884w или изотипическое контрольное IgG₁ антитело включали в формат активации ТКР либо в растворимой, либо в иммобилизованной на планшетах форме (0,003-50 мкг/мл). Через четыре дня культивирования и конечного 6-часового инкубирования с Брефельдином А (BD GolgiPlug™), клетки окрашивали конъюгированными с флуорохромом антителами против поверхностных маркеров линии дифференцировки, включающими антитело против CD3 (АФИ Cy7, клон SP34), антитело против CD8 (ФЭ Cy7, клон SK1) и антитело против CD4 (PercP Cy5.5, клон L200) с последующей пермеабиллизацией клеток при использовании Cytofix-Cytoperm™ (Beckton Dickinson). Для оценки внутриклеточной продукции цитокинов, клетки окрашивали антителом против ИФНγ (Alexa fluor 647, клон B27) и антителом против ФНОα (ФЭ, клон Mab11). Клетки собирали для проточной цитометрии при использовании FACSCanto II, и анализ данных выполняли с помощью Flowjo версии 10.

Повышаемые концентрации растворимого (фиг. 4D) или иммобилизованного на планшете (фиг. 4E) AGEN1884w не оказывали влияния на процент CD8+ ИФНγ+ Т-клеток по сравнению с изотипическим контрольным IgG₁ антителом. При концентрациях до 50 мкг/мл AGEN1884w не действовало как агонистическое антитело к CTLA-4.

6.1.9. Комбинация с антителом против LAG-3 или антителом против PD-1.

Следующим шагом антитело против CTLA-4, AGEN1884w, исследовали на его синергию с антагонистическим антителом против LAG-3 или антагонистическими антителами против PD-1 при использовании МКПК, субоптимально стимулированных стафилококковым энтеротоксином А (SEA). Коротко, криоконсервированные человеческие МКПК (Research Blood Components) сеяли при плотности 10⁵ клеток/лунка, в RPMI1640 с добавкой Normocin™ (Invivogen #ant-nr) и 10% термоинактивированной FBS (Gibco, Invitrogen Corporation), в 96-луночные планшеты NUNC LON с Delta поверхностью (NUNC™). Клетки культивировали с 100 нг/мл SEA (Toxin Technologies) в присутствии 10 мкг/мл растворимого AGEN1884w или изотипического контрольного IgG₁ вместе с 5 мкг/мл антитела против LAG-3 AGEN1746, Ниволумаба (партия AAB5719, Myoderm), Пембролизумаба (партия 7002688300, Myoderm), изотипического контрольного IgG₁ или изотипического контрольного IgG₄ в течение 5 дней при 37°C, 5% CO₂ и 97% влажности. Протестированные антитела и их соответствующие концентрации показаны на фиг. 4F. Антитело против LAG-3 AGEN1746, используемое в данном анализе, было получено на основе вариабельных областей антитела 25F7, предложенного в публикации заявки на патент США US 2011/0150892 (включенной в настоящую заявку посредством отсылки). AGEN1746 включает тяжелую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 91 и легкую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 92 (табл. 8). Осветленные супернатанты собирали и хранили при -80°C до анализа. Обнаружение цитокина IL-2 производили при помощи AlphaLISA (Perkin Elmer). Вычисляли среднее значение и стандартное отклонение для концентрации IL-2.

Таблица 8. Последовательности антитела против LAG-3, AGEN1746

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
91	Тяжелая цепь AGEN1746	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKLEWI GEINHNNGNTNSNPSLKSRLVTLSDLT SKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCA FGYSDY EYNWFD PWQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVSVLT VLVHQLDNLNGKEYCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
92	Легкая цепь AGEN1746	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLI YDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPL TFGQGTNLEIKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Как показано на фиг. 4F, комбинация антитела против CTLA-4, AGEN1884W, с антителом против LAG-3, AGEN1746, антителом против PD-1 Ниволумабом или антителом против PD-1 Пембролизумабом повышала продукцию IL-2 в МКПК, субоптимально стимулированных суперантигеном SEA, по сравнению с обработкой одним средством.

6.2. Пример 2. Сравнение антител против CTLA-4 с константной областью IgG₁ или IgG₂.

В данном примере AGEN1884w, которое является человеческим IgG₁ антителом, превращали в человеческое антитело IgG₂, AGEN2041w. Антитело AGEN2041w имеет такую же вариабельную область тяжелой цепи и такую же легкую цепь, что и AGEN1884w, но включает человеческую константную область IgG₂. Антитело AGEN2041w включает последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 94 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 13.

Кроме того, также тестировали ряд AGEN1884w с мутантными Fc-областями для исследования влияния взаимодействия FcγR на антагонистическую активность антител против CTLA-4. AGEN1884w-N297A включает последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 95 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 13. AGEN1884w-S267E/L328F включает последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 96 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 13. AGEN1884w-S239D/A330L/I332E включает последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 97 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 13. Все остатки пронумерованы согласно системе нумерации EU.

6.2.1. Связывание, блокирование лиганда и анализ селективности антител против CTLA-4 с константной областью IgG₂.

Аффинность антитела против CTLA-4, AGEN2041w, референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 и референсного IgG₂ антитела против CTLA-4 исследовали с помощью поверхностного плазмонного резонанса, как описано в Разделе 6.1.1. Тестировали следующие CTLA-4 антигены: рекомбинантный человеческий CTLA-4-Fc (R&D Systems, # 7268-CT), рекомбинантный человеческий CTLA-4 (Sino Biological, # 11159-H08H), рекомбинантный CTLA-4-Fc яванского макака (Sino Biological, # 90213-C02H) и рекомбинантный CTLA-4 яванского макака (Sino Biological, # 90213-C08H). Значения аффинности перечислены на фиг. 5A.

Затем связывание AGEN2041w с клетками Jurkat, сверхэкспрессирующими человеческий CTLA-4, исследовали в проточном цитометрическом анализе, аналогичном анализу, описанному в Разделе 6.1.2. Коротко, клетки Jurkat, сверхэкспрессирующие человеческий CTLA-4 (Promega), сначала окрашивали серийными разведениями AGEN2041w, референсного IgG₂ антитела против CTLA-4 или изотипического контрольного IgG₂, а затем АФЦ-конъюгированным мышинным антителом против каппа-цепи человека (Invitrogen). Образцы исследовали на FACSCanto II (BD Biosciences) и средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) анализировали при использовании программы FlowJo (FlowJo, LLC). AGEN2041w связывалось с клетками Jurkat, сверхэкспрессирующими человеческий CTLA-4 (фиг. 5B).

Активность блокирования лиганда у AGEN2041w, референсного IgG₂ антитела против CTLA-4 и изотипического контрольного IgG₂ исследовали при использовании технологии суспензионных чипов, как описано в Разделе 6.1.5. Как показано на фиг. 5C, AGEN2041w ингибировало связывание CD80 и CD86 с CTLA-4.

Селективность AGEN2041w и референсного IgG₂ антитела против CTLA-4 сравнивали с изотипическим контрольным IgG₂ антителом при использовании технологии суспензионных чипов, как описано в Разделе 6.1.3. Как показано на фиг. 5D и 5E, AGEN2041w специфично связывается с CTLA-4 человека и яванского макака. Никакого значимого связывания с родственными представителями семейства (рекомбинантным человеческим CD28, ICOS, BTLA и PD-1; и рекомбинантным PD-1 яванского макака) не наблюдали.

6.2.2. Воздействие антител против CTLA-4 с IgG₁ или IgG₂ константной областью на человеческие Т-клетки после стимуляции стафилококковым энтеротоксином А (SEA).

Функциональные активности антител против CTLA-4, AGEN1884w и AGEN2041w, исследовали в

анализе с первичными человеческими МКПК на индукцию IL-2. Анализ проводили, как описано в Разделе 6.1.6. Коротко, человеческие МКПК культивировали в присутствии повышаемых концентраций антигенов: 0,016, 0,08, 0,4, 2,0, 10, 50 и 250 мкг/мл, и 100 нг/мл SEA (Toxin Technologies) в течение 5 дней. Тестировали следующие антитела: антитела против CTLA-4, AGEN1884w и AGEN2041w, изотипическое контрольное IgG₁ и изотипическое контрольное IgG₂. Титр IL-2 определяли с помощью электрохемилюминесценции (MSD).

Как показано на фиг. 6A, AGEN1884w и AGEN2041w стимулировали продукцию IL-2 после стимуляции SEA.

6.2.3. Воздействие антитела против CTLA-4 с константной областью IgG₂ на линию клеток с IL-2-люциферазным репортером.

Следующим шагом оценивали функциональную активность антитела против CTLA-4, AGEN2041w, при использовании анализа с IL-2-люциферазным репортером, аналогичного анализу, описанному выше. Вкратце, Т-клетки (Jurkat), созданные с помощью методов генной инженерии для экспрессии поверхностного CTLA-4 и репортерного гена люциферазы после промотора IL-2, добавляли в лунки, содержащие повышаемые концентрации AGEN2041w или изотипического контрольного IgG₂. Затем клетки Raji, которые эндогенно экспрессируют CD80 и CD86 и были созданы с помощью методов генной инженерии для экспрессии "активатора Т-клеток", добавляли в культуру клеток. "Активатор Т-клеток" является коммерческим рецептором клеточной поверхности, который связывает Т-клеточные рецепторы (ТКР) антиген-независимым образом, что приводит к активации Т-клеток. Стимуляция ТКР на рекомбинантной линии клеток Jurkat вызывает экспрессию IL-2, что приводит к продукции люциферазы. Добавление AGEN2041w в данном анализе блокирует связывание CTLA-4 (экспрессируемого на клетках Jurkat) с его естественными лигандами CD80 и CD86 (экспрессируемыми на клетках Raji), что усиливает продукцию люциферазы. Концентрации люциферазы определяли количественно при использовании Bio-Glo™, и полученные данные использовали для определения максимальных кратных значений ответа (кратного увеличения в присутствии AGEN2041w по сравнению с базальной активностью люциферазы без антител).

Как показано на фиг. 6B, повышаемые концентрации AGEN2041w приводили к усиленной активации Т-клеток дозозависимым образом. Напротив, изотипический контрольный IgG₂ не повышал экспрессию люциферазы даже при наиболее высокой тестируемой концентрации.

6.2.4. Анализ AGEN1884w, продуцируемого стабильным клоном.

В данном примере AGEN1884w, продуцируемое стабильным клоном 105 (AGEN1884w-105), исследовали на связывание с CTLA-4, экспрессируемым на поверхности клеток, и на функциональную активность в анализе с первичными человеческими МКПК.

Связывание AGEN1884w-105 с клетками Jurkat, сверхэкспрессирующими человеческий CTLA-4, исследовали в проточном цитометрическом анализе, аналогичном анализу, описанному в Разделе 6.1.2. Коротко, клетки Jurkat, сверхэкспрессирующие человеческий (Promega) CTLA-4, окрашивали сначала серийными разведениями AGEN1884w-105, референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 или изотипического контрольного IgG₁, а затем ФЭ-конъюгированным мышинным антителом против к-цепи человека (Invitrogen). Образцы исследовали на FACSCanto II (BD Biosciences), и средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) анализировали при использовании программы FlowJo (FlowJo, LLC). AGEN1884w-105 связывалось с клетками Jurkat, сверхэкспрессирующими человеческий CTLA-4 (фиг. 7A).

Способность AGEN1884w-105 вызывать продукцию IL-2 исследовали в анализе, аналогичном анализу, описанному в Разделе 6.1.6. Коротко, человеческие МКПК культивировали в течение 5 дней в присутствии 100 нг/мл SEA (Toxin Technologies) и 20 мкг/мл AGEN1884w-105, референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 или изотипического контрольного IgG₁. Титр IL-2 определяли с помощью электрохемилюминесценции (MSD). Как показано на фиг. 7B, AGEN1884w-105 вызывало продукцию IL-2 после стимуляции SEA.

6.2.5. Связывание антител против CTLA-4 с экспрессированными на поверхности Fcγ рецепторами.

Связывание антител против CTLA-4 с человеческими FcγRIIA, FcγRIIB и FcγRIIIA, экспрессируемыми на поверхности клеток CHO, измеряли с помощью проточной цитометрии. Коротко, клетки CHO трансфицировали кДНК, кодирующей человеческие FcγRIIAH131, FcγRIIB или FcγRIIIAV158, с получением следующих линий клеток CHO: rCHO-huFcγRIIA⁺, rCHO-huFcγRIIB⁺ и rCHO-huFcγRIIIA⁺. Связывание с титрованием дозы антител в пределах от 0,0056-1000 мкг/мл проводили и детектировали первичные антитела при использовании вторичного, конъюгированного с фикоэритрином (ФЭ) антитела против F(ab') человека (Jackson Immune Research). Образцы исследовали с помощью проточной цитометрии и значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) ФЭ анализировали и использовали для построения кривых связывания. В тестировании использовали следующие антитела: AGEN1884w, AGEN2041w, референсное IgG₁ антитело против CTLA-4 и изотипическое контрольное IgG₁ антитело. В данном исследовании использовали AGEN1884w, продуцированное в двух разных средах для выращивания клеток: среда для выращивания CD FortiCHO™ производства Life Technologies Inc./Thermo (AGEN1884w-FortiCHO) и среда для выращивания PowerCHO™ 2 производства Lonza (AGEN1884w-PowerCHO). Референсное IgG₁ антитело против CTLA-4 содержит другой IgG₁ аллотип, отличающийся от аллотипа в

AGEN1884w. Изотипическое контрольное IgG₁ антитело тестировали только в концентрации 1000 мкг/мл.

Как показано на фиг. 8А, AGEN1884w-FortiCHO, AGEN1884w-PowerCHO и AGEN2041w демонстрировали повышенное связывание с FcγRIIAH131-экспрессирующими клетками по сравнению с референсным IgG₁ антителом против CTLA-4. Аналогичным образом, связывание AGEN1884w-PowerCHO и AGEN1884w-FortiCHO с FcγRIIB-экспрессирующими клетками было более сильным, чем в случае референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 (фиг. 8В). Все IgG₁ антитела, AGEN1884w-FortiCHO, AGEN1884w-PowerCHO и референсное IgG₁ антитело против CTLA-4, одинаково связывались с FcγRIIAV158, экспрессируемым на клеточной поверхности (фиг. 8С). AGEN2041w показало более слабое связывание с FcγRIIB (фиг. 8В) и FcγRIIAV158 (фиг. 8С), чем IgG₁ антитела.

6.2.6. Связывание антител против CTLA-4 с рекомбинантными Fcγ рецепторами.

Связывание антител против CTLA-4, AGEN1884w-FortiCHO, AGEN1884w-PowerCHO, AGEN2041w и референсного IgG₁ антитела против CTLA-4, с человеческими FcγRIIA и FcγRIIA измеряли при использовании поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore® 3000).

Для связывания с FcγRIIA применяли метод прямой иммобилизации на чипе CM5 при использовании стандартной химии аминов. Рекомбинантный человеческий белок FcγRIIA-His разводили в растворе ацетата натрия, pH 4,0, до концентрации 10 мкг/мл и иммобилизовали в проточной кювете 2 и 4 при использовании ввода в течение 8 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Проточные кюветы 1 и 3, используемые в качестве референсных проточных кювет, были ложно связанными, т.е. реагенты конденсации аминов пропускали через проточные кюветы, как в проточных кюветах 2 и 4, без FcγRIIA. Функциональность поверхностей с иммобилизованным FcγRIIA проверяли при использовании 1 мг/мл Тростузамаба в рабочем буфере BIAcore HBS-EP через каждую проточную кювету при вводе в течение 0,5 мин и скорости потока 100 мкл/мин.

Для связывания с FcγRIIA метод захвата применяли с иммобилизованным антителом против тетра-His на чипе CM5. Мышиное антитело против His разводили в растворе ацетата натрия, pH 5,0, до концентрации 10 мкг/мл и иммобилизовали во всех четырех проточных кюветах при использовании 5-минутного ввода при скорости потока 10 мкл/мин с помощью стандартной химии аминов. Рекомбинантный человеческий белок FcγRIIA-His захватывали на поверхности чипа при введении раствора FcγRIIA-His в концентрации 1 мкг/мл в течение 2 мин при скорости потока 5 мкл/мин.

Все тестируемые антитела подвергали замене буфера рабочим буфером BIAcore перед анализом. Концентрации белка в образцах с замененным буфером и промежуточных стоковых растворах определяли при измерении оптической плотности при 280 нм с помощью спектрофотометра Nanodrop 1000.

Каждый образец анализировали в серии из 8 значений концентрации, начиная с 1000 мкг/мл при 2-кратном разведении. Данные собирали и обрабатывали при использовании управляющего программного обеспечения BIAcore версии 4.1 и программы BIAevaluation версии 4.1. Кривые зависимости доза-эффект аппроксимировали с применением пятипараметрической логистической модели (5PL). Для кривых использовали следующие весовые коэффициенты по умолчанию:

$$\text{Дисперсия} = 0,02 \times \text{ответ (RU)}^{1,8}$$

Данные связывания также анализировали при использовании StatLIA версии 3.2. Параллельность оценивали с помощью критерия хи-квадрат ($P < 0,01$) в StatLIA.

Средний ответ (резонансные единицы) AGEN1884w-FortiCHO, AGEN1884w-PowerCHO, AGEN2041w и референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 в отношении человеческого FcγRIIA и человеческого FcγRIIA показан на фиг. 9А и 9В, соответственно.

6.2.7. Воздействие антител против CTLA-4 на линию клеток с репортерным Fcγ рецептором IIIA.

Способность AGEN1884w к одновременному захвату CTLA-4 и передаче сигнала посредством активации Fcγ рецепторов оценивали при использовании линии клеток, экспрессирующих репортер Fcγ рецептор IIIA (FcγRIIA) (Promega), вместе с клетками-мишенями (схема анализа показана на фиг. 10А). В данном анализе клетки Jurkat, экспрессирующие человеческий CTLA-4, использовали в качестве клеток-мишеней.

Рекомбинантные клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие FcγRIIA, либо вариант V158 (высокая аффинность), либо вариант F158 (низкая аффинность), и NFAT элемент отклика, регулирующий экспрессию люциферазы светляка, использовали в качестве эффекторных клеток. Анализ проводили согласно инструкциям производителя. Коротко, 25 мкл клеток-мишеней (25000 клеток), экспрессирующих CTLA-4, смешивали с 25 мкл серийно разведенных антител, начиная с 4 мкг/мл, в 96-луночных белых планшетах с плоскодонными лунками. Затем по 150000 эффекторных клеток в 25 мкл добавляли в лунку и инкубировали планшеты при 37°C в течение ночи. Связывание комплекса антитела/антигена, где антиген расположен на поверхности клеток-мишеней, с FcγRIIA передает сигнал конструкции промотора/репортера в эффекторных клетках и приводит к транскрипции гена люциферазы. На следующий день планшеты извлекали из термостата и оставляли охлаждаться на 30 мин. В каждую лунку добавляли по 75 мкл реактива Bio-Glo (Promega) комнатной температуры, люминесценцию измеряли на многофункцио-

нальном планшетном анализаторе EnVision Multimode (Perkin Elmer) и регистрировали относительные световые единицы (RLU). Тестировали следующие антитела: AGEN1884w-105 или AGEN 1884w (AGEN1884W-105 на фиг. 10B, 10C, 10F и 10G, и AGEN1884w на фиг. 10D и 10E); AGEN1884w-N297A (фиг. 10F и 10G); AGEN2041w (фиг. 10D и 10E); референсное IgG₁ антитело против CTLA-4 (фиг. 10B и 10C); и изотипическое контрольное IgG₁ антитело (фиг. 10B-10G).

При связывании с клетками, экспрессирующими CTLA-4, IgG₁ антитело AGEN1884w-105 активировало вариант FcγRIIA V158 (фиг. 10B) и вариант FcγRIIA F158 (фиг. 10C). Как ожидали, IgG₂ антитело AGEN2041w не вызывало сигнализацию через FcγRIIA (фиг. 10D и 10E). Для подтверждения специфичности данного репортерного анализа Fc-рецептор (FcR)-молчащий вариант AGEN1884w (AGEN1884w-N297A) тестировали в таком же анализе, и такой мутант не вызывал сигнализацию ни через один FcγRIIA (фиг. 10F и 10G).

6.2.8. Воздействие антител против CTLA-4 на линию клеток с репортерным Fcγ рецептором IIА.

Следующим шагом оценивали способность AGEN2041w одновременно захватывать CTLA-4 и передавать сигнал через FcγRIIA, при использовании линии репортерных клеток, экспрессирующих FcγRIIA (Promega), вместе с клетками-мишенями (клетками Jurkat, экспрессирующими человеческий CTLA-4). Клетки Jurkat, экспрессирующие FcγRIIA с полиморфизмом 131 Н/Н высокой аффинности и NFAT элемент отклика, регулирующий экспрессию люциферазы светляка, использовали в качестве эффекторных клеток. Коротко, по 25 мкл клеток-мишеней (6×10^6 клеток/мл) смешивали с 25 мкл серийно разведенных антител, начиная с 0,1 мкг/мл, в лунках (в двойной повторности) 96-луночных белых планшетов для анализа. Тестировали следующие антитела: AGEN2041w, референсное IgG₂ антитело против CTLA-4 и изотипическое контрольное IgG₂ антитело. Затем по 25 мкл эффекторных клеток (6×10^6 клеток/мл) добавляли в каждую лунку с получением отношения эффектора к мишени 1:1. Планшеты инкубировали в течение 20 часов при 37°C и 5% CO₂. После указанного инкубирования реактив для люциферазного анализа Bio-Glo (Promega) размораживали при комнатной температуре и по 75 мкл добавляли в каждую лунку. В течение 5-10 мин измеряли люминесценцию при использовании многофункционального планшетного анализатора Envision (PerkinElmer). Фоновую люминесценцию вычитали из показания каждого образца и регистрировали приведенные относительные световые единицы (RLU).

Как показано на фиг. 11, при связывании с клетками, экспрессирующими CTLA-4, IgG₂ антитело AGEN2041w активировало FcγRIIA^{H131}.

6.2.9. Влияние связывания с Fcγ рецептором на антагонистическую активность антител против CTLA-4.

В данном примере исследовали влияние связывания с FcγR на антагонистическую активность антител против CTLA-4.

Сначала связывание AGEN1884w-105 и AGEN1884w-N297A с экспрессируемым CTLA-4 на поверхности клеток сравнивали в проточном цитометрическом анализе, аналогичном анализу, описанному в Разделе 6.1.2. Коротко, клетки Jurkat, сверхэкспрессирующие человеческий (Promega) CTLA-4, окрашивали сначала серийными разведениями AGEN1884w-105, AGEN1884w-N297A или изотипического контрольного IgG₁, а затем мышинным ФЭ-конъюгированным антителом против κ-цепи человека (Invitrogen). Образцы исследовали на FACSCanto II (BD Biosciences) и средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) анализировали при использовании программы FlowJo (FlowJo, LLC). AGEN1884w-105 и AGEN1884w-N297A показали аналогичное связывание с клетками Jurkat, сверхэкспрессирующими человеческий CTLA-4 (фиг. 12A).

Затем зависимость функциональной активности от связывания с Fc-рецептором (FcR) *in vitro* оценивали в анализе, аналогичном анализу, описанному в Разделе 6.1.6. Коротко, человеческие МКПК культивировали в течение 5 дней в присутствии 100 нг/мл SEA (Toxin Technologies) и 20 мкг/мл AGEN1884w-105, AGEN1884w-N297A или изотипического контрольного IgG₁. Титр IL-2 определяли с помощью электрохемилюминесценции (MSD).

Несмотря на аналогичное связывание с экспрессируемым на поверхности клеток CTLA-4 (фиг. 12A), AGEN1884w-N297A показало сниженное потенцирование секреции IL-2 по сравнению с AGEN1884w-105 в анализе с первичными человеческими МКПК (фиг. 12B).

В качестве дополнительного подтверждения необходимости связывания с FcR для функциональной активности, антитела против CTLA-4 тестировали на их способность вызывать секрецию IL-2 в присутствии или отсутствии блокаторов FcR.

Криоконсервированные МКПК (10^5 клеток/лунка) в RPMI1640 с добавкой пенициллина, стрептомицина и 10% FBS (Hyclone) добавляли в 96-луночные планшеты NUNCNCLON с Delta поверхностью (NUNC™). Клетки культивировали с 100 нг/мл SEA (Toxin Technologies) и 10 мкг/мл IgG₁ антитела против CTLA-4 или человеческого изотипического контрольного IgG₁, в присутствии или отсутствии блокаторов FcR, в течение 5 дней при 37°C, 5% CO₂ и 97% влажности. Тестировали следующие антитела против CTLA-4: референсное антитело IgG₁ (фиг. 13A) и AGEN1884w-105 (фиг. 13B). В качестве блокаторов FcR использовали антитела против CD16 (Biolegend # 302013), против CD32 (R&D # AF1330) и против CD64 (R&D #AF1257) (в концентрации 10 мкг/мл каждое) (фиг. 13A) или только антитело против CD32

(eBiosciences # 16-0329-81) (фиг. 13B). В контрольных группах на фиг. 13B, AGEN1884w-105 и человеческое изотипическое контрольное IgG₁ также инкубировали с мышинным изотипическим контрольным IgG₁ (Biolegend # 400124), как указано на фигуре. Осветленный супернатант собирали и хранили при -80°C до анализа. Титры IL-2 регистрировали с помощью электрохемилюминесценции (MSD).

Блокада FcR при использовании антител против CD16, CD32 и CD64 (фиг. 13A) или при использовании антитела против CD32 (фиг. 13B) снижала способность антител против CTLA-4 вызывать секрецию IL-2 в данном анализе с первичными человеческими МКПК.

Затем функциональную активность многих антител против CTLA-4 с мутантными Fc-областями исследовали при использовании МКПК. Коротко, криоконсервированные человеческие МКПК (Research Blood Components) сеяли при плотности 10^5 клеток/лунка в RPMI1640 с добавкой Normocin™ (Invivogen) и 10% термоинактивированной FBS (Gibco, Invitrogen Corporation) в 96-луночные планшеты NUNCLON с Delta поверхностью (NUNC™). Клетки культивировали в течение 5 дней при 37°C, 5% CO₂ и 97% влажности в присутствии 142 нг/мл SEA (Toxin Technologies) и 10 мкг/мл AGEN1884w, AGEN1884w-N297A, AGEN1884w-S267E/L328F, AGEN1884w-S239D/A330L/I332E, AGEN2041w, изотипического контрольного IgG1 антитела или изотипического контрольного IgG₂ антитела. Осветленный супернатант собирали и хранили при -80°C до анализа. Концентрации IL-2 измеряли с помощью ELISA.

AGEN1884W с тройной мутацией S239D/A330L/I332E в Fc-области, которая усиливает связывание с FcγRIIIA, более сильно стимулировало секрецию IL-2, чем AGEN1884w с Fc-областью IgG₁ дикого типа (фиг. 14).

6.2.10. Fc-опосредованный потенциал эффекторных клеток.

В данном примере антитело AGEN1884w исследовали на его способность опосредовать цитотоксичность NK-клеток. Вкратце, клетки Jurkat, созданные с помощью методов генной инженерии для конститутивной экспрессии CTLA-4 на клеточной поверхности (клетки-мишени), культивировали при плотности 1×10^4 клеток/лунка в 96-луночных планшетах с круглодонными лунками. К клеткам-мишеням добавляли повышаемые концентрации AGEN1884w, референсного IgG₁ антитела против CTLA-4 или изотипического контрольного антитела (все при концентрации от 0 до 10 мкг/мл) и 5×10^4 NK92-FcγRIIIA клеток (эффекторных клеток). После инкубирования в течение 6 ч при 37°C и 5% CO₂, лизис клеток-мишеней оценивали с помощью количественного фотометрического определения лактатдегидрогеназы (LDH), высвобождаемой в супернатант, при использовании набора для определения цитотоксичности (LDH) (Roche) согласно инструкциям производителя. Данные регистрировали при использовании программы SoftMax® Pro Microplate Data Acquisition & Analysis. Антитела во всех концентрациях тестировали в тройной повторности.

Как показано на фиг. 15, антитело AGEN1884w эффективно опосредовало лизис клеток-мишеней, экспрессирующих CTLA-4, в присутствии эффекторных клеток.

6.2.11. Картирование эпитопов антитела против CTLA-4.

Взаимодействие Fab-фрагмента AGEN1884w (AGEN1884w-Fab) с внеклеточным доменом человеческого CTLA-4 исследовали с помощью масс-спектрометрии водород-дейтериевого обмена (HDX). Внеклеточный домен CTLA-4, отдельно или в комбинации с AGEN1884w-Fab, в фосфатно-солевом буферном растворе при pH 7,4 разбавляли десятикратным объемом маркирующего буфера с оксидом дейтерия и инкубировали в течение различных периодов времени (0, 60, 300, 1800 и 7200 с) при комнатной температуре. Обмен водорода на дейтерий останавливали при добавлении одного объема буфера, содержащего 4М гидрохлорида гуанидина, 0,85М ТСЕР (трис(2-карбоксиэтил)фосфина), при этом конечное значение pH составило 2,5. Затем образцы подвергали расщеплению пепсином/протеазой XIII типа на колонке и ЖХ-МС анализу. Масс-спектры регистрировали только в режиме МС. Для вычисления включения дейтерия масс-спектры для данного пептида комбинировали по пику экстрагированной ионной хроматограммы и вычисляли средневзвешенное значение m/z. Увеличение массы от массы нативного пептида (0 мин) до средневзвешенной массы соответствует уровню включения дейтерия. Кривые накопления дейтерия за время обмена для всех пептидов строили для последующего анализа и сравнивали с помощью программы HDXaminer.

Большинство CTLA-4 пептидов показало идентичные или подобные уровни дейтерия в присутствии и без Fab против человеческого CTLA-4. Несколько пептидных сегментов, тем не менее, как было обнаружено, имели значимо сниженное включение дейтерия после связывания Fab. Все остатки в данном параграфе пронумерованы согласно SEQ ID NO: 77. Две области, Q⁸⁰VT⁸² (SEQ ID NO: 78) и Y¹³⁵PPYYLGIGNGTQI¹⁴⁹ (SEQ ID NO: 79), испытывали сильную защиту от дейтерия, когда человеческий CTLA-4 был связан с Fab. Самое сильное уменьшение поглощения дейтерия наблюдали в Y¹⁴⁰L¹⁴¹, что, таким образом, представляется основным признаком эпитопа AGEN1884w на CTLA-4. Просмотр последовательностей CTLA-4 человека и яванского макака, которые сильно связывает AGEN1884w, показал почти полную идентичность последовательности в этих двух областях, описанных выше, за исключением замены лейцина метионином в положении 141 (фиг. 17A). В отличие от этого, AGEN1884w не связывается в какой-либо значимой степени ни с мышинным, ни с крысиным CTLA-4 (данные не показаны), которые отличаются от человеческого CTLA-4 в Y¹⁴⁰LGI¹⁴³ (SEQ ID NO: 80) в трех из четырех

положений (фиг. 17А). Дополнительные данные по селективности показывают, что AGEN1884w связывается с высокой специфичностью с CTLA-4 человека и яванского макака, но не с другими родственными представителями семейства CD28, включая CD28, ICOS, BTLA и PD-1 (данные не показаны). Сравнение последовательностей указанных родственных белков показывает, что все не являющие CTLA-4 белки отличаются в последовательности Y¹⁴⁰LGI¹⁴³ (SEQ ID NO: 80) (фиг. 17В), что также подтверждает важность данного эпитопа для связывания AGEN1884w.

6.2.12. Исследование Т-зависимого гуморального ответа (TDAR) на яванских макаках.

Восьминедельное исследование TDAR на яванских макаках проводили с целью проверки способности AGEN1884w и AGEN2041w потенцировать Т-клеточно-зависимый гуморальный иммунный ответ на вакцину против гепатита В (ENERIX-G®) (HBsAg). Вакцину HBsAg вводили в трех подкожных инъекциях, в количестве 10 мкг на инъекцию (в общей сложности 30 мкг), в заднюю конечность в День 1 (первичная вакцинация) и День 29 (повторная вакцинация). AGEN1884w (N=6) или AGEN2041w (N=6) давали два раза с помощью внутривенной болюсной инъекции (10 мг/кг), в День 1 и День 29, вместе с вакцинными антигенами. При использовании такой же схемы введения, одной контрольной группе животных (N=3) давали HBsAg вакцину в комбинации с 3 мг/кг референсного IgG₁ антитела против CTLA-4, а другая контрольная группа животных (N=6) получала HBsAg с контрольным изделием: 20 мМ трис-гидрохлорида, 100 мМ NaCl, 1% маннита, 0,10 мМ ДТПА, 0,01% полисорбата 80, pH 7,0, но без антитела против CTLA-4. В течение восьминедельного исследования производили анализы антител к HBsAg (IgG) в образцах сыворотки, собранных в определенные моменты времени в ходе исследования (День -20, -7, День +15, +29, +43, +59 и +69). Титры в сыворотке измеряли с помощью колориметрического анализа ELISA.

Животные, получавшие AGEN1884w, AGEN2041w, референсное IgG₁ антитело против CTLA-4 или контрольное изделие, имели нормальные вторичные иммунные ответы с измеримыми титрами антител после введения второй дозы вакцины, которые достигали пика и затем уменьшались (фиг. 18А и 18В). Однако AGEN1884w, AGEN2041w и референсное IgG₁ антитело против CTLA-4, как было показано, усиливали IgG ответ против HBsAg по сравнению с контрольным изделием, которое давали без антитела против CTLA-4.

6.3. Пример 3. Анализ антител против CTLA-4.

В данном примере следующие 19 антител против CTLA-4 исследовали на связывание и блокирование лиганда: AGEN1884, AGEN1885, AGEN1886, AGEN1887, AGEN1888, AGEN1889, AGEN1890, AGEN1891, AGEN1892, AGEN1893, AGEN1894, AGEN1895, AGEN1896, AGEN1897, AGEN1898, AGEN1899, AGEN1900, AGEN1901 и AGEN1902. Последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи указанных антител были раскрыты в табл. 6. На фиг. 19А и 19В показано выравнивание последовательностей вариабельных областей тяжелых цепей и вариабельных областей легких цепей соответственно.

6.3.1. Анализ связывания и блокирования лиганда антител против CTLA-4.

Аффинность 19 антител против CTLA-4, описанных выше, исследовали с помощью поверхностного плазмонного резонанса в анализе, подобном анализу, описанному в Разделе 6.1.1. Тестируемым CTLA-4 антигеном являлся рекомбинантный человеческий CTLA-4-Fc (R&D Systems, # 7268-CT). Антитела против CTLA-4 (6 мкг/мл в рабочем буфере) захватывали на поверхности сенсорного чипа CM5. Указанные 19 антител связывались с рекомбинантным человеческим CTLA-4 с аффинностью нМ порядка (данные не показаны).

Активность блокирования лиганда 19 антител против CTLA-4 исследовали при использовании технологии суспензионных чипов в анализе, подобном анализу, описанному в Разделе 6.1.5. Блокирование лиганда тестировали в присутствии различных концентраций антител против CTLA-4 (от 3000 до 12 нг/мл, перед добавлением сфер). Как показано на фиг. 20А-20Е, все 19 антител против CTLA-4 блокировали связывание CTLA-4 с CD80 и CD86.

Объем изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Фактически, различные модификации изобретения в дополнение к описанным будут очевидными для специалистов в данной области из предыдущего описания и сопровождающих фигур. Такие модификации должны быть включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

Все ссылки (например, публикации или патенты, или заявки на патенты), приведенные в настоящем документе, полностью включены посредством отсылки и во всех отношениях в той же степени, как если бы было прямо и индивидуально указано, что каждая отдельная ссылка (например, публикация или патент, или заявка на патент) полностью включена посредством отсылки во всех отношениях. Другие варианты осуществления содержатся в следующей формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое специфически связывается с белком CTLA-4 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области

CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:

- (a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SYX₁MX₂ (SEQ ID NO: 22), где X₁ представляет собой S или A; и X₂ представляет собой N или S;
- (b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;
- (c) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность VGLMGPFXI (SEQ ID NO: 23), где X представляет собой D или N;
- (d) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность RASQSVX₁X₂YLX₃ (SEQ ID NO: 24), где X₁ представляет собой S или G; X₂ представляет собой R, S или T; и X₃ представляет собой G или A;
- (e) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность X₁X₂SX₃RAT (SEQ ID NO: 25), где X₁ представляет собой G или A; X₂ представляет собой A или T; и X₃ представляет собой T, S, R или N; и
- (f) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность QQYGX₁SPX₂T (SEQ ID NO: 26), где X₁ представляет собой S или T; и X₂ представляет собой W или F.

2. Выделенное антитело по п.1, где:

- (a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 27;
- (b) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и 28;
- (c) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 29 и 30;
- (d) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 31-35;
- (e) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 36 и 37;
- (f) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, соответственно, SEQ ID NO: 1, 2 и 3; 27, 2 и 3; или 27, 2 и 28; и/или
- (g) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3, соответственно, SEQ ID NO: 4, 5 и 6; 29, 32 и 36; 29, 33 и 37; 30, 31 и 6; 29, 34 и 6; или 29, 35 и 37.

3. Выделенное антитело по любому из п.1 или 2, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6; 1, 2, 3, 29, 32 и 36; 1, 2, 3, 29, 33 и 37; 27, 2, 3, 4, 5 и 6; 27, 2, 3, 29, 33 и 37; 1, 2, 3, 30, 31 и 6; 1, 2, 3, 29, 34 и 6; 1, 2, 3, 29, 35 и 37; 27, 2, 28, 4, 5 и 6; 27, 2, 28, 29, 32 и 36; 27, 2, 28, 29, 33 и 37; или 27, 2, 28, 29, 35 и 37 соответственно.

4. Выделенное антитело по любому из пп.1-3, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6 соответственно.

5. Выделенное антитело по любому из пп.1-4, где:

- (a) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73;
- (b) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 38-42, и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 43-47; или

(c) вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и 8; 7 и 44; 7 и 45; 38 и 8; 38 и 45; 39 и 43; 39 и 45; 39 и 46; 39 и 47; 40 и 43; 40 и 8; 40 и 44; 40 и 45; 41 и 8; 41 и 44; 41 и 45; 41 и 47; 42 и 43; или 42 и 45 соответственно.

6. Выделенное антитело по любому из пп.1-5, где вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно.

7. Выделенное антитело по любому из пп.1-6, где антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG₁ человека, необязательно, где константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, 76, 93 или 97.

8. Выделенное антитело по любому из пп.1-7, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или 93, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

9. Выделенное антитело по любому из пп.1-8, где антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG человека, которая является вариантом константной области тяжелой цепи нативного IgG человека, где вариант константной области тяжелой цепи IgG человека связывается с Fcγ рецептором человека с более высоким уровнем аффинности по сравнению со связыванием с Fcγ рецептором человека соответствующей константной области тяжелой цепи нативного IgG человека, необязательно, где вариант константной области тяжелой цепи IgG человека представляет собой вариант константной области тяжелой цепи IgG1 человека, вариант IgG2 человека или вариант константной области тяжелой цепи IgG4 человека.

10. Выделенное антитело по п.9, где Fcγ рецептор человека представляет собой FcγRIIIA или FcγRIIB, и вариант константной области тяжелой цепи IgG человека содержит:

(a) одну или несколько следующих аминокислотных мутаций согласно системе нумерации EU: G236D, P238D, S239D, S267E, L328F и L328E; или

(b) набор аминокислотных мутаций, выбранный из группы, состоящей из: S267E и L328F; P238D и L328E; P238D и одной или нескольких замен, выбранных из группы, состоящей из E233D, G237D, H268D, P271G и A330R; P238D, E233D, G237D, H268D, P271G и A330R; G236D и S267E; S239D и S267E; V262E, S267E и L328F; и V264E, S267E и L328F согласно системе нумерации EU.

11. Выделенное антитело по п.9 или 10, где Fcγ рецептор человека представляет собой FcγRIIB и вариант константной области тяжелой цепи IgG человека также содержит одну или несколько аминокислотных мутаций, которые снижают аффинность IgG в отношении FcγRIIIA человека, FcγRIIA человека или FcγRI человека.

12. Выделенное антитело по п.9, где Fcγ рецептор человека представляет собой FcγRIIIA, FcγRIIA или FcγRI и вариант константной области тяжелой цепи IgG человека содержит:

(a) одну или несколько следующих аминокислотных мутаций согласно нумерации EU: G236A, S239D, F243L, T256A, K290A, R292P, S298A, Y300L, V305I, A330L, I332E, E333A, K334A, A339T и P396L; или

(b) набор аминокислотных мутаций, выбранных из группы, состоящей из: S239D; T256A; K290A; S298A; I332E; E333A; K334A; A339T; S239D и I332E; S239D, A330L и I332E; S298A, E333A и K334A; G236A, S239D и I332E; и F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L согласно системе нумерации EU.

13. Выделенное антитело по любому из пп.1-12, где антитело содержит афукозилированную Fc-область.

14. Выделенное антитело по любому из пп.1-13, обладающее одним или несколькими следующими свойствами:

(a) антитело является антителом человека;

(b) антитело является антагонистическим по отношению к CTLA-4;

(c) антитело ингибирует связывание белка CTLA-4 человека с CD80 человека или с CD86 человека.

15. Биспецифическое выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 белком человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:

(a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SYX₁MX₂ (SEQ ID NO: 22), где X₁ представляет собой S или A; и X₂ представляет собой N или S;

(b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;

(c) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность VGLMGPFXI (SEQ ID NO: 23), где X представляет собой D или N;

(d) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность RASQSVX₁X₂YLYX₃ (SEQ ID NO: 24), где X₁ представляет собой S или G; X₂ представляет собой R, S или T; и X₃ представляет собой G или A;

(e) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность X₁X₂SX₃RAT (SEQ ID NO: 25), где X₁ представляет собой G или A; X₂ представляет собой A или T; и X₃ представляет собой T, S, R или N; и

(f) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность QQYGX₁SPX₂T (SEQ ID NO: 26), где X₁ представляет собой S или T; и X₂ представляет собой W или F.

16. Фармацевтическая композиция для лечения CTLA-4-связанного расстройства, содержащая антитело по любому из пп.1-15 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

17. Выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи антитела по любому из пп.1-14.

18. Выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельную область легкой цепи антитела по любому из пп.1-14.

19. Выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела по любому из пп.1-14.

20. Выделенный полинуклеотид, кодирующий легкую цепь антитела по любому из пп.1-14.

21. Выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи антитела по любому из пп.1-14.

22. Выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь антитела по любому из пп.1-14.

23. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по любому из пп.17-22.

24. Способ получения антитела, которое связывается с CTLA-4 человека, где способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей:

(a) выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи антитела по любому из пп.1-14, и выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельную область легкой цепи антитела по любому из пп.1-14; или

(b) выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела по любому из пп.1-9, и выделенный полинуклеотид, кодирующий легкую цепь антитела по любому из пп.1-14, в условиях, обеспечивающих экспрессию полинуклеотида и продукцию антитела.

25. Применение выделенного антитела по любому из пп.1-15 для повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у индивида.

26. Применение выделенного антитела по любому из пп.1-15 для лечения рака.

27. Применение выделенного антитела по любому из пп.1-15 для лечения инфекционного заболевания.

28. Применение фармацевтической композиции по п.16 для повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у индивида.

29. Применение фармацевтической композиции по п.16 для лечения рака.

30. Применение фармацевтической композиции по п.16 для лечения инфекционного заболевания.

31. Применение по любому из пп.25-30, дополнительно включающее введение дополнительного терапевтического средства индивиду, необязательно, где дополнительное средство вводят системно.

32. Применение по п.31, где индивид страдает солидным раком и где дополнительное терапевтическое средство представляет собой анти-PD-1 антитело, необязательно, где анти-PD-1 антитело представляет собой пембролизумаб или ниволумаб.

33. Применение по п.31, где индивид страдает сквамозно-клеточной карциномой головы и шеи и где дополнительное терапевтическое средство представляет собой анти-EGFR антитело, необязательно, где анти-EGFR антитело представляет собой цетуксимаб, необязательно, где применение дополнительно включает введение химиотерапевтического средства индивиду, необязательно, где химиотерапевтическое средство вводят системно, необязательно, химиотерапевтическое средство представляет собой гемцитабин.

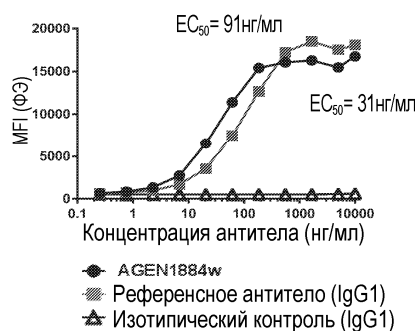
34. Применение по п.31, где индивид страдает раком молочной железы HER2+ и где дополнительное терапевтическое средство представляет собой анти-HER2 антитело, необязательно, где анти-HER2 антитело представляет собой трастузумаб, необязательно, где применение дополнительно включает введение химиотерапевтического средства индивиду, необязательно, где химиотерапевтическое средство вводят системно, необязательно, химиотерапевтическое средство представляет собой гемцитабин.

Поверхностный плазмонный резонанс (K_D)

	Человек		Яванский макак		Мышь	Крыса	
	CTLA-4		CTLA-4		CTLA-4	CTLA-4	
	димер	мономер	димер	мономер	димер	димер	мономер
AGEN1884	0,6нМ	0,8нМ	6,2нМ	1,6нМ	9,9нМ	нет связывания	нет связывания
Референсное антитело (IgG1)	0,54нМ	1,2нМ	1,2нМ	0,75нМ	1,2нМ	26нМ	22нМ

Фиг. 1А

Клетки, экспрессирующие CTLA-4



Фиг. 1В

Анализ селективности к CTLA-4

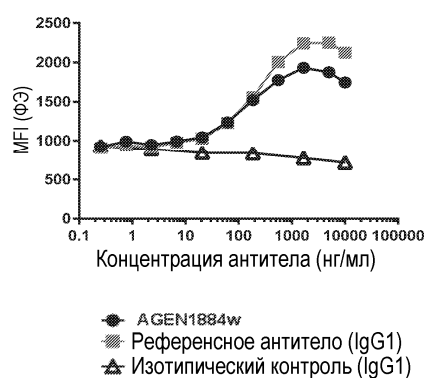
	Конц. в нг/мл	rhCTLA-4 Fc (R&D)	rcCTLA-4 Fc (Sino)	rhCD28 Fc (R&D)	rhICOS Fc (R&D)	rhBTLA Fc (Sino)	rhPD-1 Fc (R&D)	rcPD-1 Fc (4AB)
AGEN1884	1000	22729	16557	45	43	87	15	32
	100	20859	12676	48	47	115	25	41
	10	7820	4096	77	60	95	32	46
Референсное антитело (IgG1)	1000	20845	21580	52	46	97	24	40
	100	19131	19810	55	53	87	28	41
	10	6825	7245	65	57	92	35	41
Изотипиче- ский контроль (IgG1)	1000	79	154	57	34	73	31	49
	100	75	166	67	67	123	39	45
	10	88	175	52	48	91	31	30

Фиг. 1С

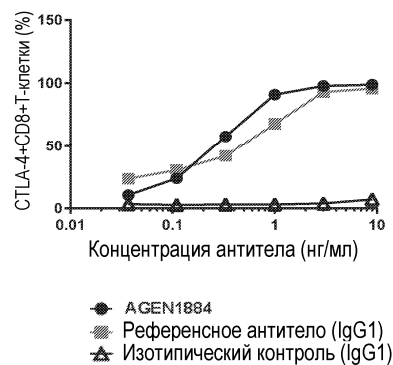
Относительная аффинность связывания

	AGEN1884	Референсное антитело (IgG1)	Изотипический контроль (IgG1)
rhCTLA-4	+++	+++	---
rcCTLA-4	+++	+++	---
rhCD28	---	---	---
rhICOS	---	---	---
rhBTLA	---	---	---
rhPD-1	---	---	---
rcPD-1	---	---	---

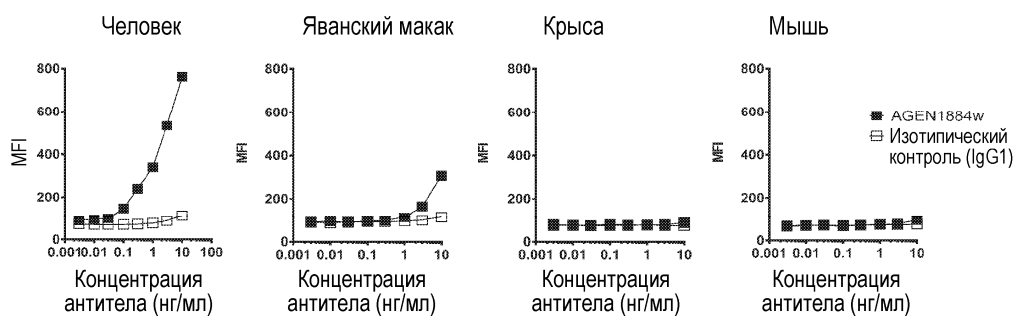
Фиг. 1D

Первичные человеческие Т-клетки
(поверхностное)

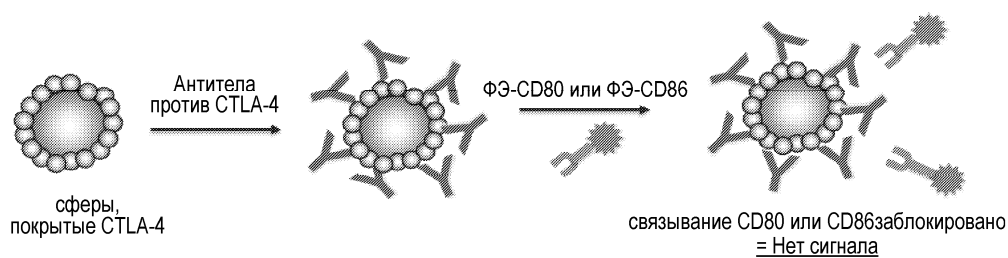
Фиг. 2A

Первичные Т-клетки яванского
макака (внутриклеточное)

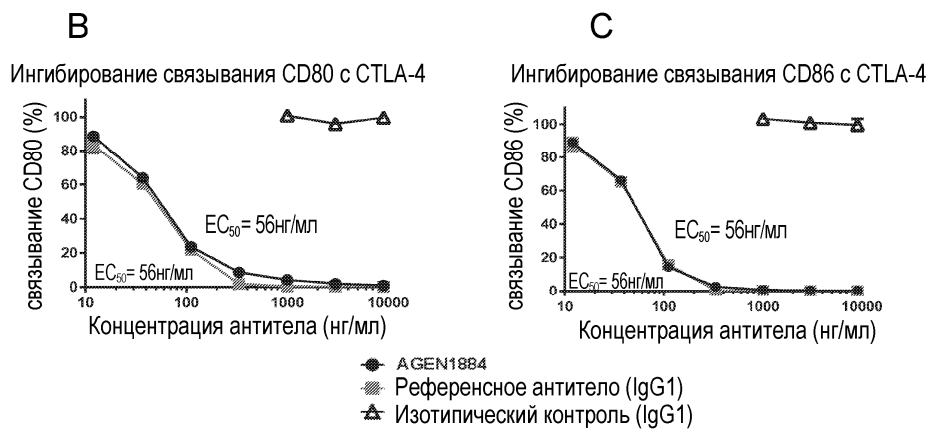
Фиг. 2B



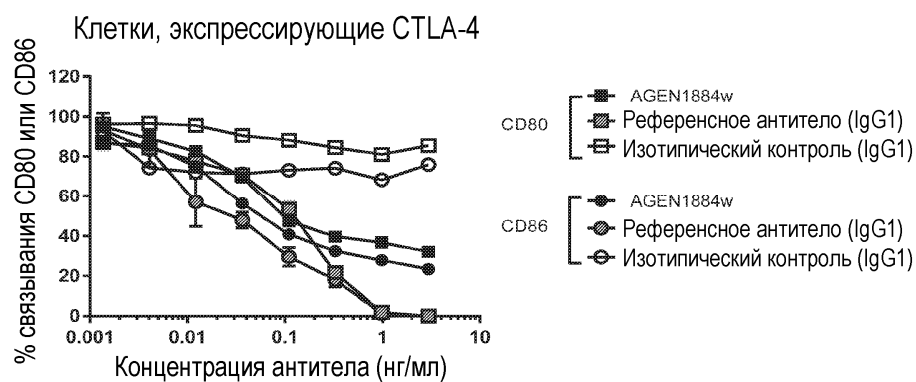
Фиг. 2C



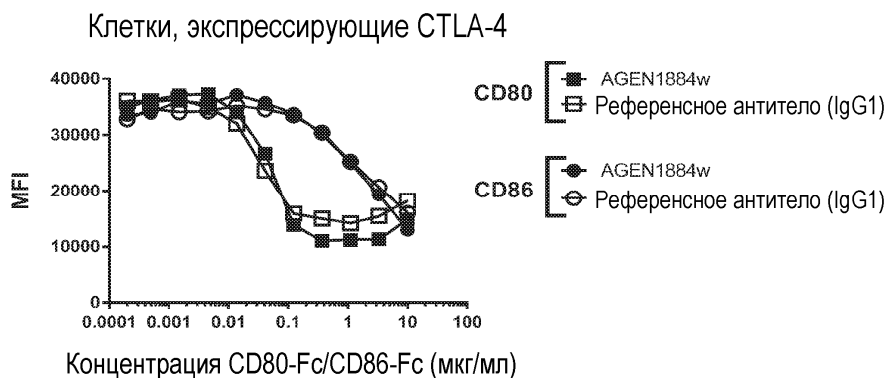
Фиг. 3А



Фиг. 3В, С

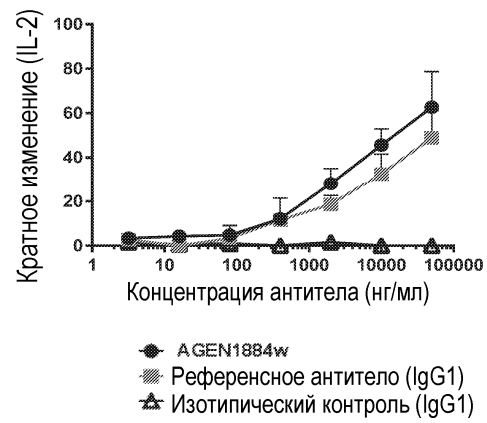


Фиг. 3D

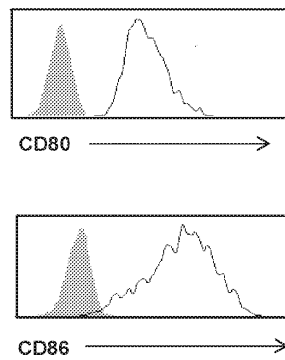


Фиг. 3Е

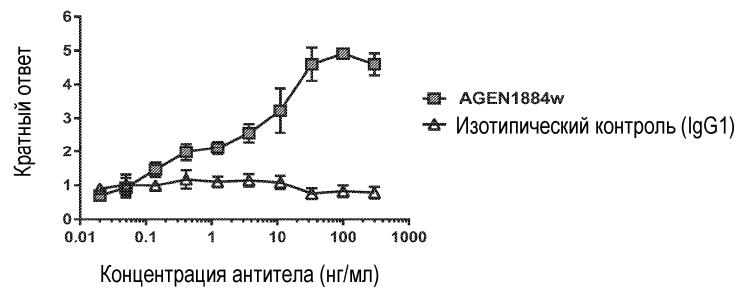
Увеличенная функция Т-клеток



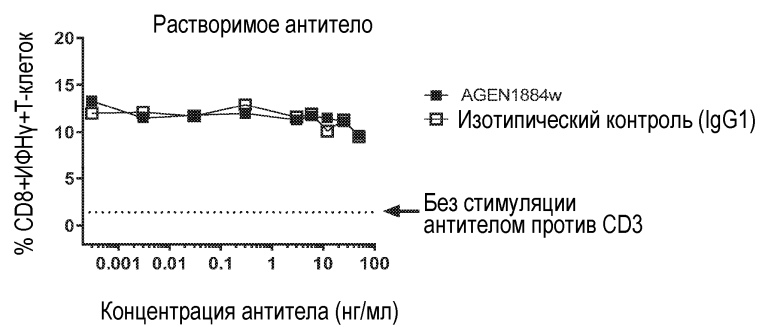
Фиг. 4А



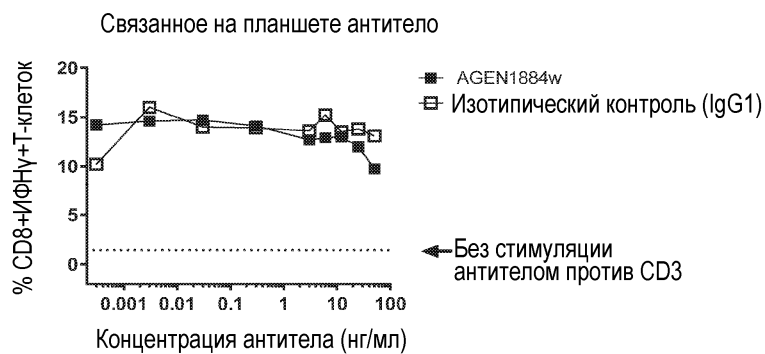
Фиг. 4В



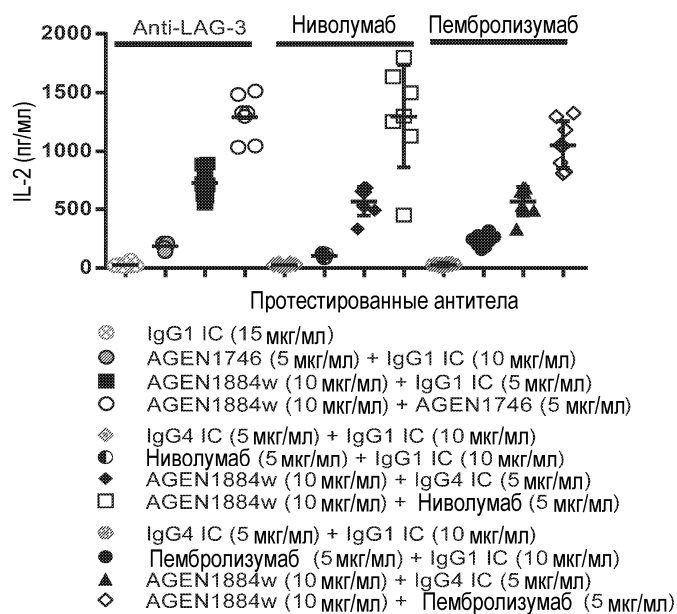
Фиг. 4С



Фиг. 4D



Фиг. 4Е



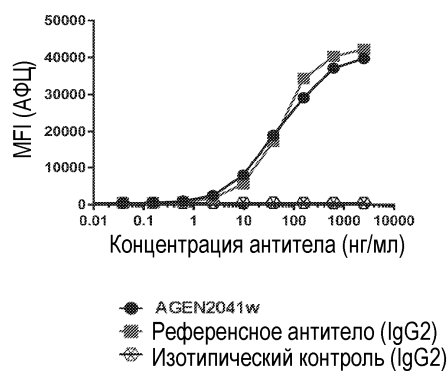
Фиг. 4F

Поверхностный плазмонный резонанс (K_D)

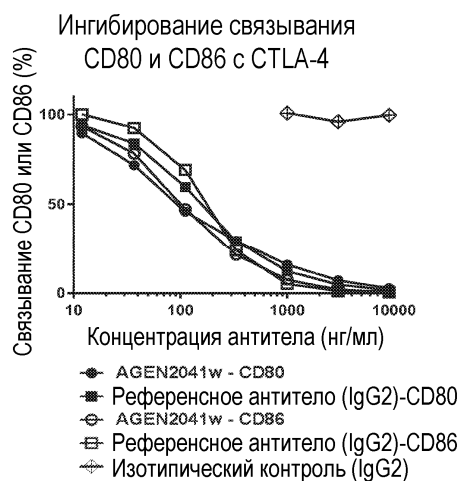
	Человек		Яванский макак	
	CTLA-4		CTLA-4	
	димер	мономер	димер	мономер
AGEN2041w	1,7нМ	2,0нМ	4,4нМ	2,1нМ
Референсное антитело (IgG1)	0,5нМ	1,2нМ	1,2нМ	0,8нМ
Референсное антитело (IgG2)	1,5нМ	1,6нМ	3,1нМ	,5нМ

Фиг. 5А

Клетки, экспрессирующие CTLA-4



Фиг. 5В



Фиг. 5С

Анализ селективности к CTLA-4

	Конц. в нг/мл	rhCTLA-4 Fc (R&D)	rcCTLA-4 Fc (Sino)	rhCD28 Fc (R&D)	rhICOS Fc (R&D)	rhBTLA Fc (Sino)	rhPD-1 Fc (R&D)	rcPD-1 Fc (4AB)
AGEN2041w	1000	16693	13885	58	48	95	30	31
	100	15890	9949	42	43	104	19	27
	10	7737	3684	73	55	89	32	29
Референсное антитело (IgG2)	1000	17288	16442	58	49	106	33	39
	100	13932	13721	62	47	102	43	50
	10	4846	5143	71	59	111	36	60
Изотипический контроль (IgG2)	1000	79	158	64	41	93	36	41
	100	83	184	52	57	88	94	96
	10	80	187	55	58	99	79	70

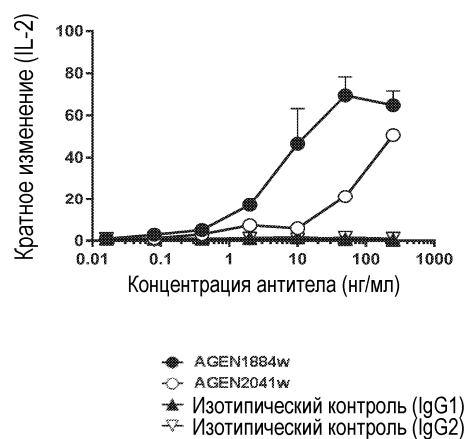
Фиг. 5D

Относительная аффинность связывания

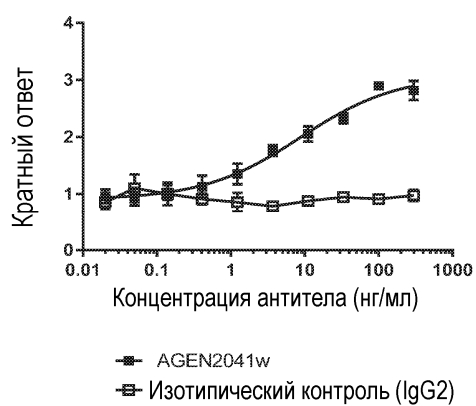
	AGEN2041w	Референсное антитело (IgG2)	Изотипический контроль (IgG2)
rhCTLA-4	+++	+++	—
rcCTLA-4	+++	+++	—
rhCD28	—	—	—
rhICOS	—	—	—
rhBTLA	—	—	—
rhPD-1	—	—	—
rcPD-1	—	—	—

Фиг. 5Е

IgG1 в сравнении с IgG2

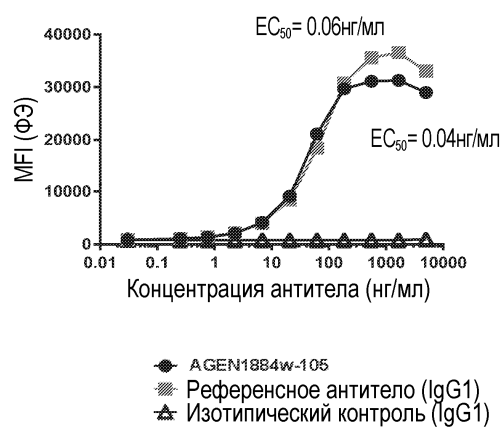


Фиг. 6А



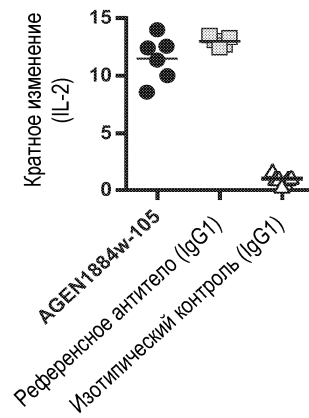
Фиг. 6В

Клетки, экспрессирующие CTLA-4

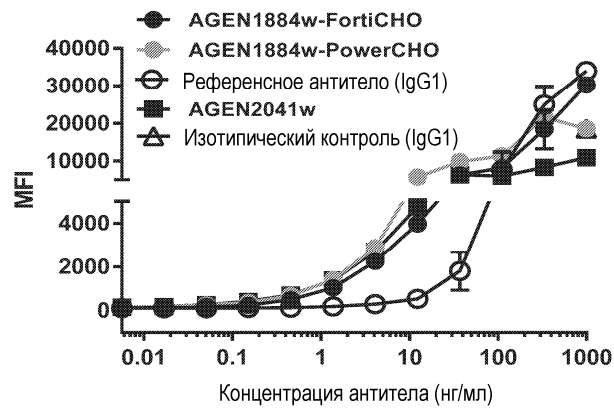


Фиг. 7А

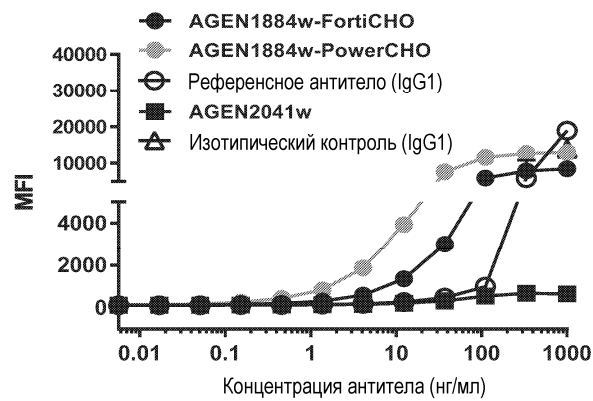
Увеличенная функция Т-клеток



Фиг. 7В

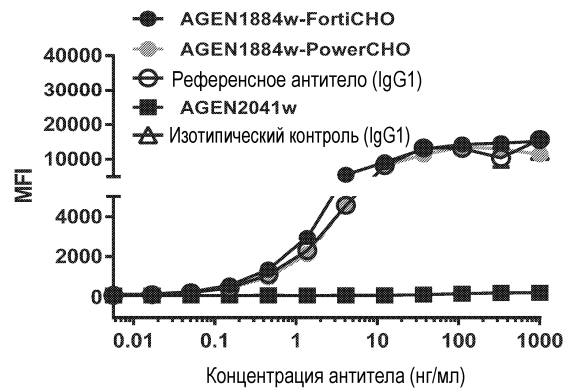
Связывание с rCHO-huFc γ RIIA $^{+}$ клетками

Фиг. 8А

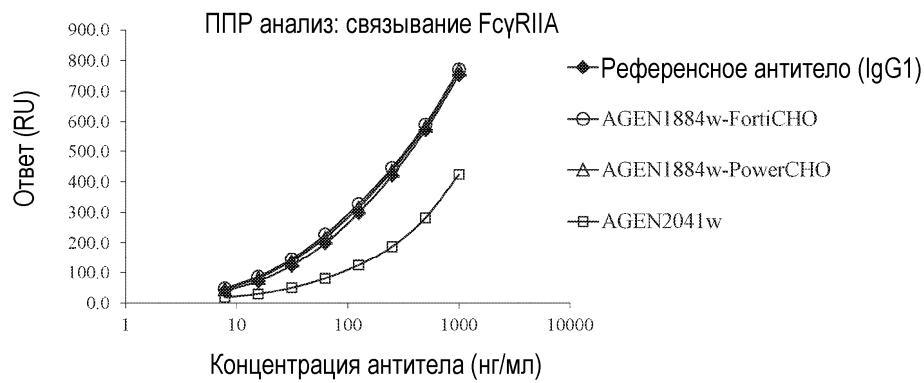
Связывание с rCHO-huFc γ RIIB $^{+}$ клетками

Фиг. 8В

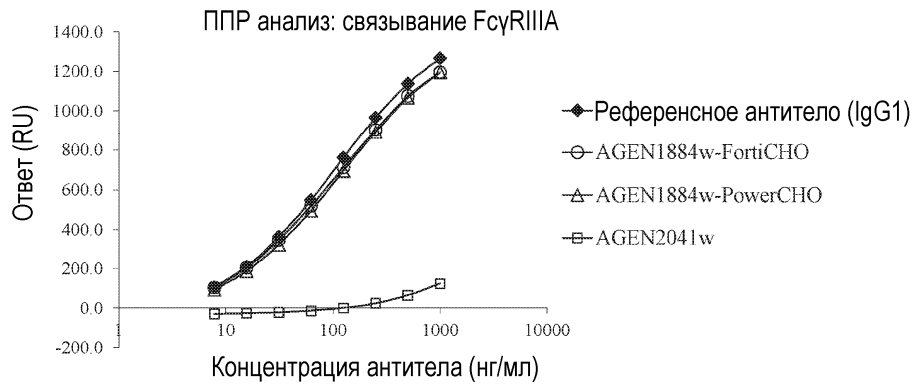
Связывание с rCHO-huFcγRIIIA+ клетками



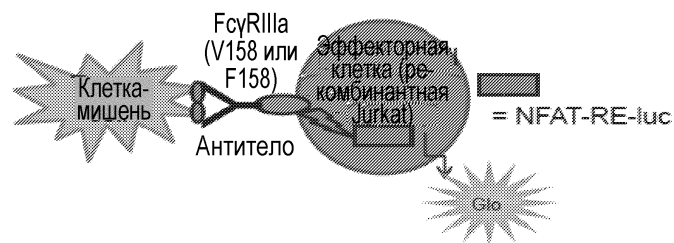
Фиг. 8С



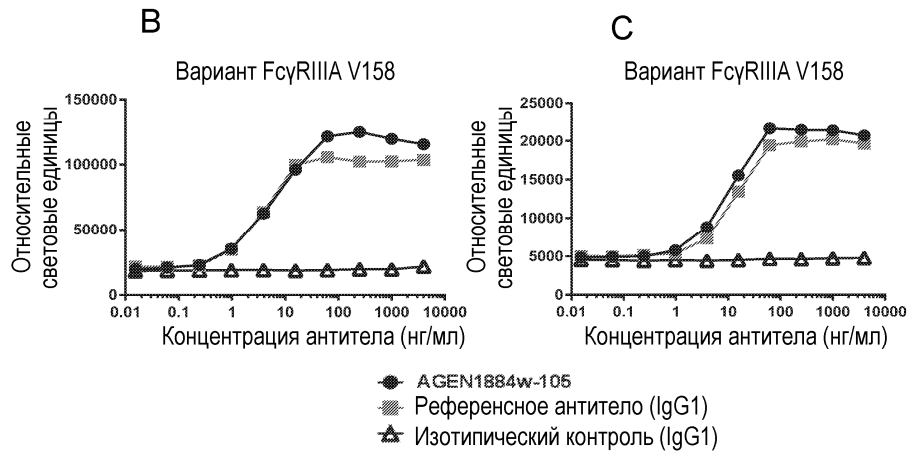
Фиг. 9А



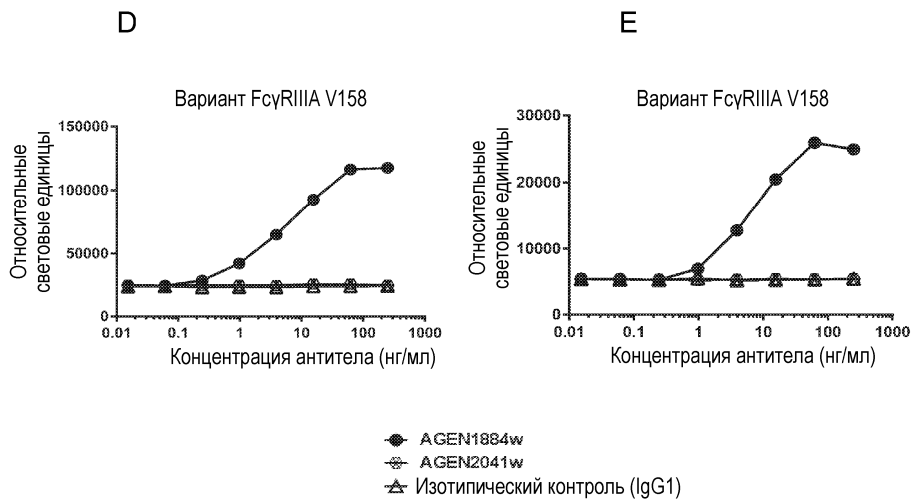
Фиг. 9В



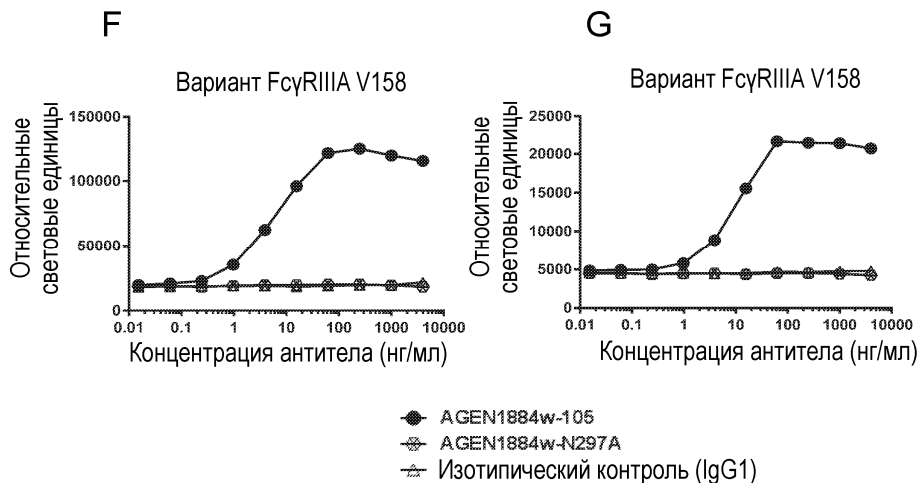
Фиг. 10А



Фиг. 10В, С

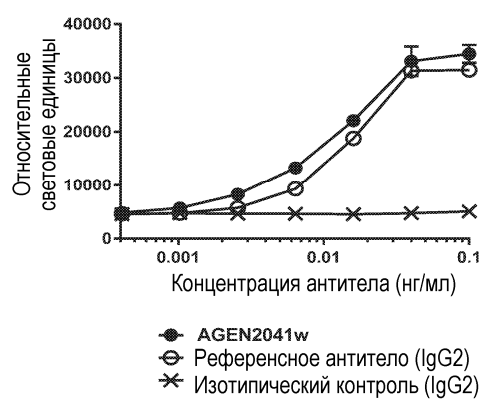


Фиг. 10Д, Е

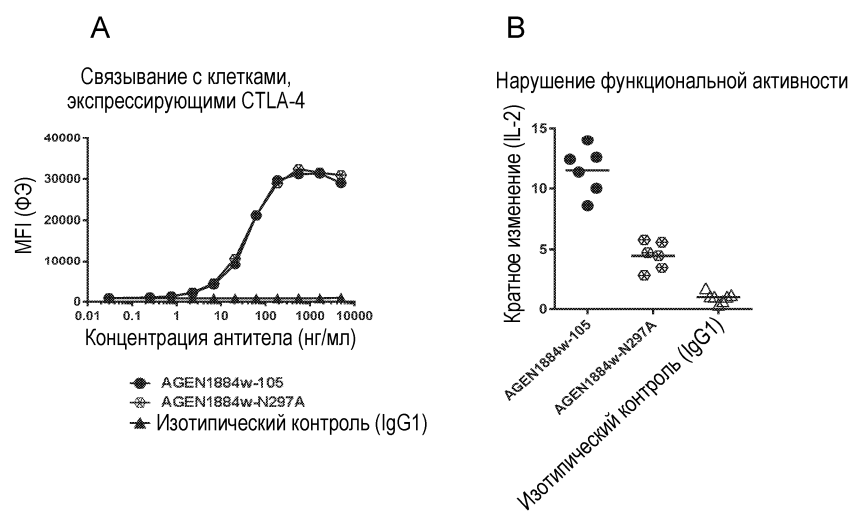


Фиг. 10F, Г

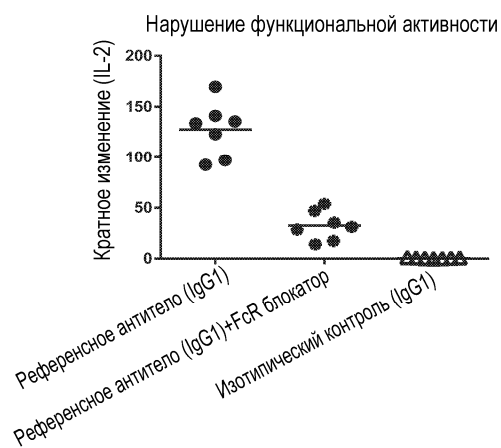
Вариант FcγRIIA H131



Фиг. 11

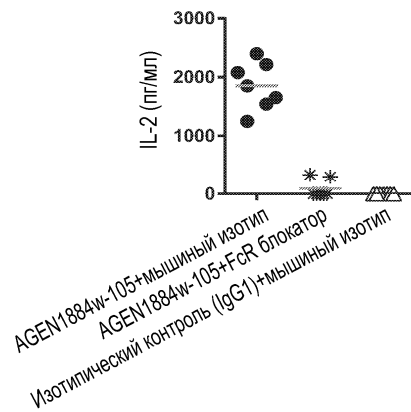


Фиг. 12А, В

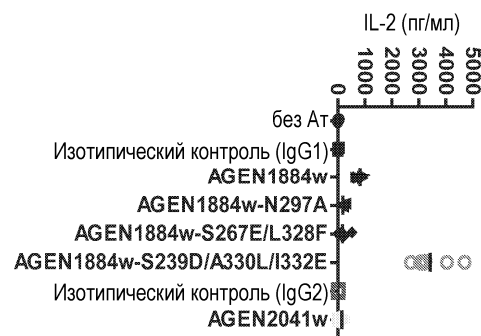


Фиг. 13А

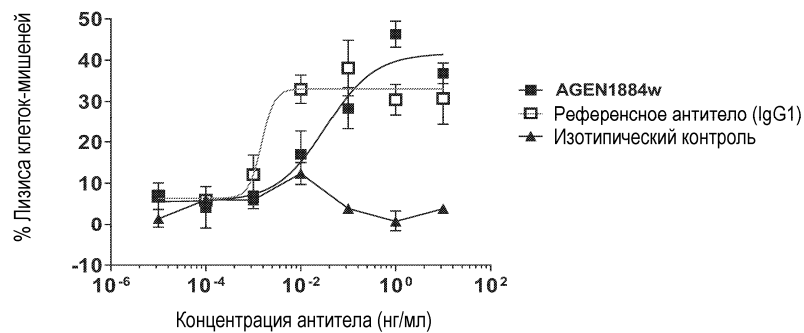
Нарушение функциональной активности



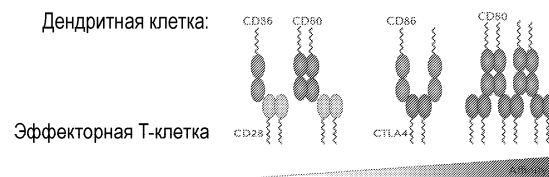
Фиг. 13В



Фиг. 14



Фиг. 15



Walker and Sansom Nat. Rev. Immunology 2011

CTLA-4-Ig	K _D (нМ)
CD80-Fc-His*	0.3 (нМ)
CD86-Fc-His*	3.6 (нМ)
Референсное антитело (IgG1)	0.5 (нМ)
AGEN1884	0.6 (нМ)

*Модифицировано из: Xu et al., JI 2012

Фиг. 16

```

P16410 CTLA4_HUMAN 1 MACLGFORHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEY 60
G7PL88 CTLA4_MACFA 1 .....R.....R.Y....S.....N..... 60
P09793 CTLA4_MOUSE 1 ....LR.Y....Q.PS....FVA.LT.....SE.IQ.T..S.....H.V...P... 60
Q62859 CTLA4_RAT 1 ....L..Y.TH.Q.PS....FGV.LS.....I.SE.IQ.T..S.....H.V...P... 60
*****::*:::*: * * * : *****:~::~*:~::~*:~::~*:~::~*:~::~*

P16410 CTLA4_HUMAN 61 ASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLR 120
G7PL88 CTLA4_MACFA 61 ..... 120
P09793 CTLA4_MOUSE 61 SPSHNTD.....TND.M....T.FTEK.TVG...YPF.S..FNESR..... 120
Q62859 CTLA4_RAT 61 ..SHNTD.....TND.....T.FTVK.T.G...PF.S..FNESR..... 120
: : *****:~::~*:~::~*:~::~*:~::~*:~::~*

P16410 CTLA4_HUMAN 121 AMDTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDSDFLWLILAAVSSGLFFYSFL 180
G7PL88 CTLA4_MACFA 121 .....M..... 180
P09793 CTLA4_MOUSE 121 .V.....L.....FV.M.....V...L..... 180
Q62859 CTLA4_RAT 121 .A.....F.....FV.M..... 180
* *****:~::~*:~::~*:~::~*:~::~*:~::~*

P16410 CTLA4_HUMAN 181 LTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN 223
G7PL88 CTLA4_MACFA 181 ..... 223
P09793 CTLA4_MOUSE 181 VS..... 223
Q62859 CTLA4_RAT 181 V.....NRT..... 223
:~::~*:~::~*:~::~*:~::~*:~::~*

```

Фиг. 17А

```

SP|P16410|CTLA4_HUMAN MACLGFORHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIP--VFC-----KAMHVAQPAVVLA--- 48
TR|G7PL88|G7PL88_MACFA MACLGFORHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIP--VFS-----KAMHVAQPAVVLA--- 48
SP|P10747|CD28_HUMAN -----MLRLLLALN--LFPS-IQVTGNKILVKQSP-MLV--- 30
SP|Q9Y6W8|ICOS_HUMAN -----MKSGLWY-----FF--LFCLRIKVLGTGEINGSANYEMFI--- 32
SP|Q7Z6A9|BTLA_HUMAN -----MKTLPAMLTGKLEWV---FFLIPYLDIWNHKGESCDVQLYIK 41
SP|Q15116|PDCD1_HUMAN -----MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPD-RPWNPPFTFSPALLV--- 44
* :

SP|P16410|CTLA4_HUMAN -----SSRGIASFVCEYASPGKA---TEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNE--LT 96
TR|G7PL88|G7PL88_MACFA -----NSRGIASFVCEYASPGKA---TEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNE--LT 96
SP|P10747|CD28_HUMAN -----AYDNAVNLSCKYSYNLFS---REFRASLHKGLDSA-VEVCVVYGNYSQQLQVY 79
SP|Q9Y6W8|ICOS_HUMAN -----FHNGGVQILCKYPD--IV---QQFKMQLLKGGQ---ILCDLTKTKGSGNVTVS 76
SP|Q7Z6A9|BTLA_HUMAN RQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWCKLN--GT-----TCVKLEDRO----- 86
SP|Q15116|PDCD1_HUMAN -----TEGDNATFTCSFSNTSESVFLNWYRMSPSNQTDK---LAAFPEDR----- 86
: * :

SP|P16410|CTLA4_HUMAN FLDDSICT----GTSSGNQVNLTII---QGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGIG----- 144
TR|G7PL88|G7PL88_MACFA FLDDSICT----GTSSGNQVNLTII---QGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGIG----- 144
SP|P10747|CD28_HUMAN SKTGFNCD----GKLGNEVTFYFL---QNLVYNQTDIYFCKIEVMPYPYLDNEK----- 127
SP|Q9Y6W8|ICOS_HUMAN IKSLKFCH----SQLSNNSVSFFL---YNLDHSHANYFYCNLSIFDPPPFKVTILT----- 124
SP|Q7Z6A9|BTLA_HUMAN -----TSWKEEKNISFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQSNL---IE----- 125
SP|Q15116|PDCD1_HUMAN SQPGQDCRFVITQLPNGRDFHMSV---VRARRNDSGTLYLCGAISLAPKAQIKESLRAELR 143
... : : * *

```

Фиг. 17В

```

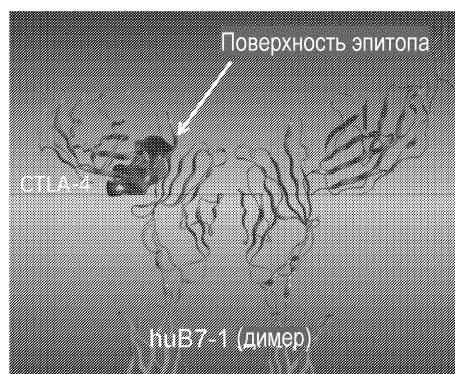
SP|P16410|CTLA4_HUMAN -NGTQIYVIDP-----EPCPDS-----DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSL--S-KML 190
TR|G7PL88|G7PL88_MACFA -NGTQIYVIDP-----EPCPDS-----DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSL--S-KML 190
SP|P10747|CD28_HUMAN SNGTIIHVKGK-----HLCPSPLPGPSKPFVWLTVVGGVLACYSLLVTVAFI--IFWVR 180
SP|Q9Y6W8|ICOS_HUMAN --GGYLHIYES-----QLCCQL-----KFWLPIGCAA---FVVVCILGCIL--ICWLT 165
SP|Q7Z6A9|BTLA_HUMAN SHSTTLVYTDVKSASERPSKDEMASR-PWLLYRLPLGG---LPLLITTCFCLFCCLRR 180
SP|Q15116|PDCD1_HUMAN VTERRAEVPTA-----HPSPSPRPAG-QFQTLVVGVGGLLGLSLVLLVWVLAV--ICSRA 195
: . . . . . :

SP|P16410|CTLA4_HUMAN KKRSP----LTTGVYVKMPPTPE-----PEC-EKQFQPYFIPIN----- 223
TR|G7PL88|G7PL88_MACFA KKRSP----LTTGVYVKMPPTPE-----PEC-EKQFQPYFIPIN----- 223
SP|P10747|CD28_HUMAN SKRSR----LLHSDYMNMTPRR-----PGPTRKHYQPYAPPRD--FAAYRS----- 220
SP|Q9Y6W8|ICOS_HUMAN KKKYSSSVHDPNGEYMFMRVAVN-----TAKKSRLTDVTL----- 199
SP|Q7Z6A9|BTLA_HUMAN HQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMOEGS 240
SP|Q15116|PDCD1_HUMAN ARG-----TIG-----ARR-----TGQP-LKEDPSAVPVF--SVDYGELDFQWREKT 234
: . . . . . :

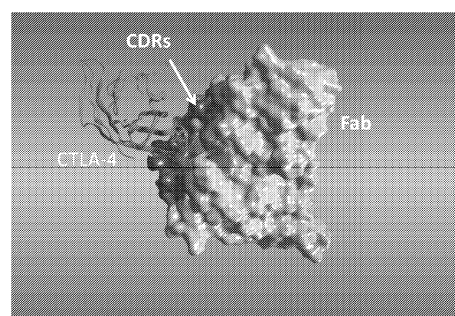
SP|P16410|CTLA4_HUMAN -----
TR|G7PL88|G7PL88_MACFA -----
SP|P10747|CD28_HUMAN -----
SP|Q9Y6W8|ICOS_HUMAN -----
SP|Q7Z6A9|BTLA_HUMAN EVYSNPCLEENKP--GIVYASLNHHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASI-----CVRS- 289
SP|Q15116|PDCD1_HUMAN PEPPVPCVPEQTEYATIVFP---SGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL 288

```

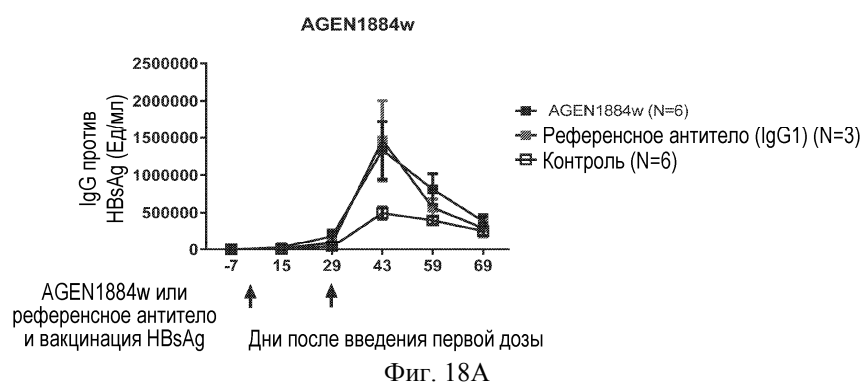
Фиг. 17С



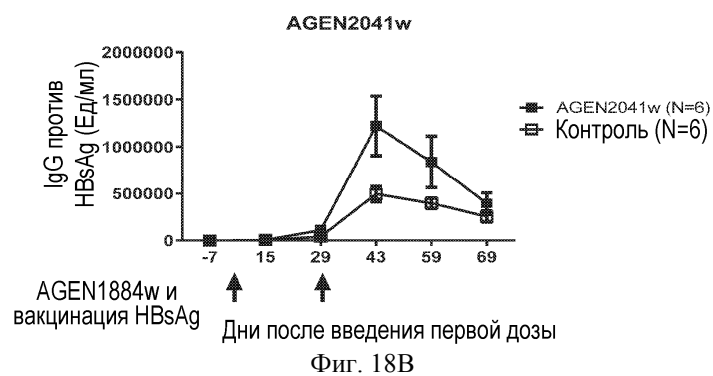
Фиг. 17D



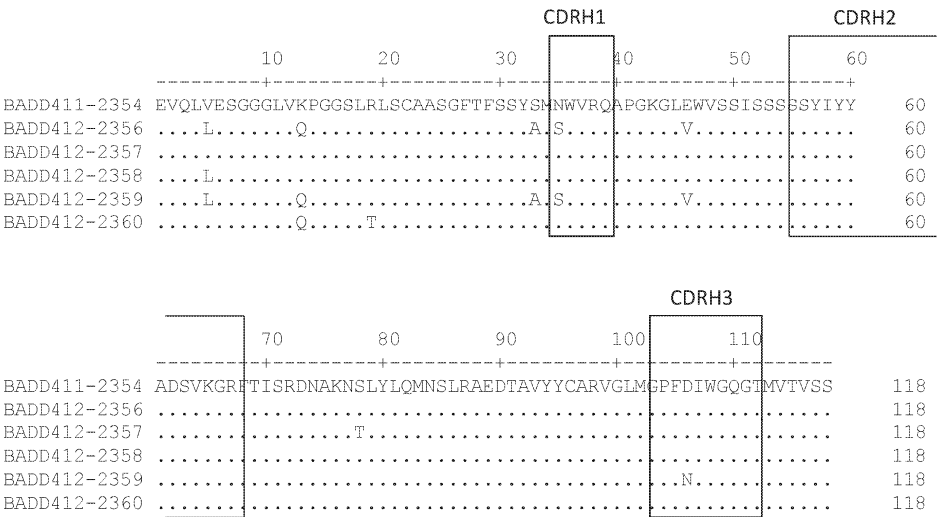
Фиг. 17E



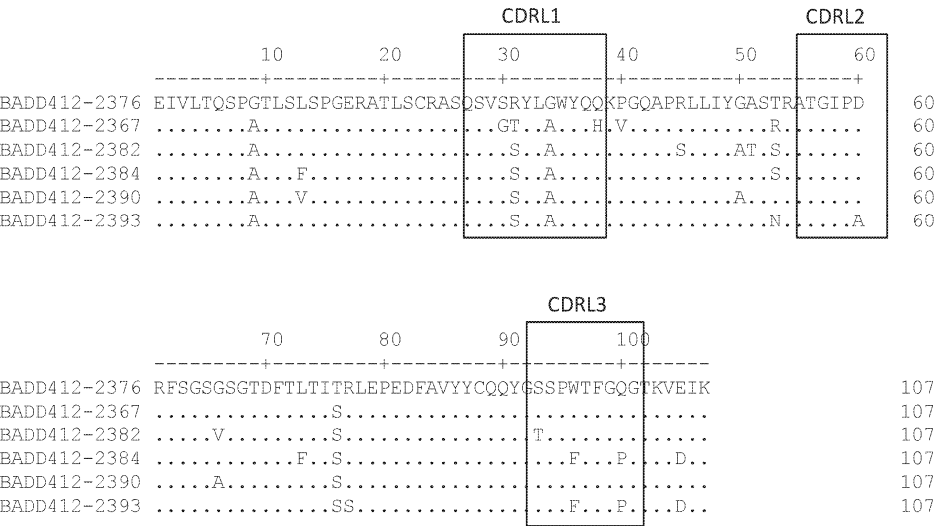
Фиг. 18A



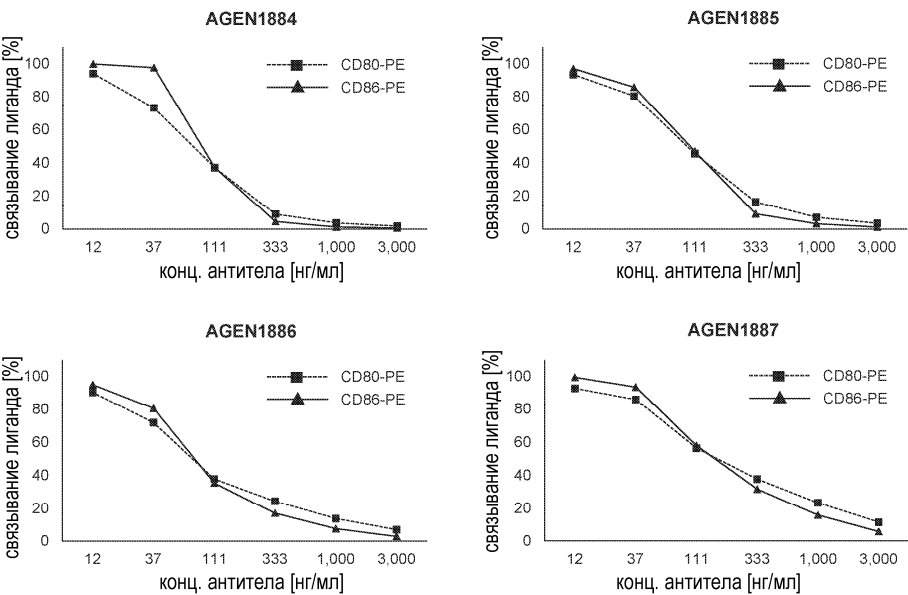
Фиг. 18B



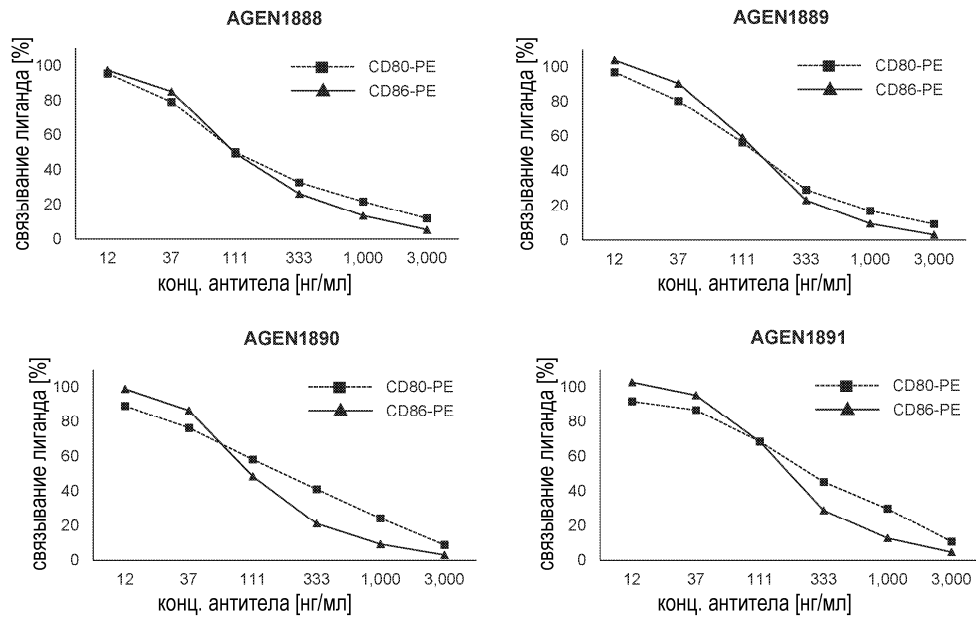
Фиг. 19А



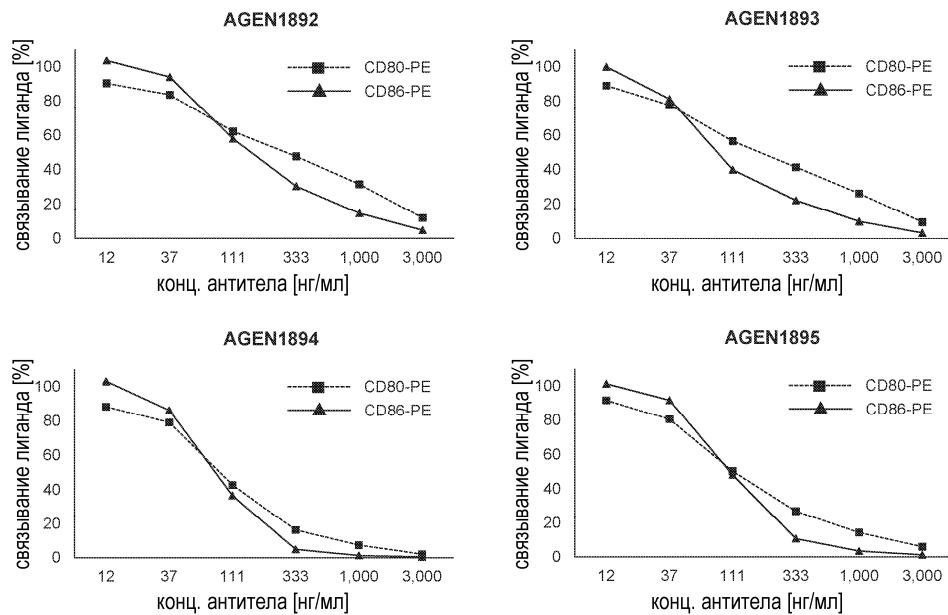
Фиг. 19В



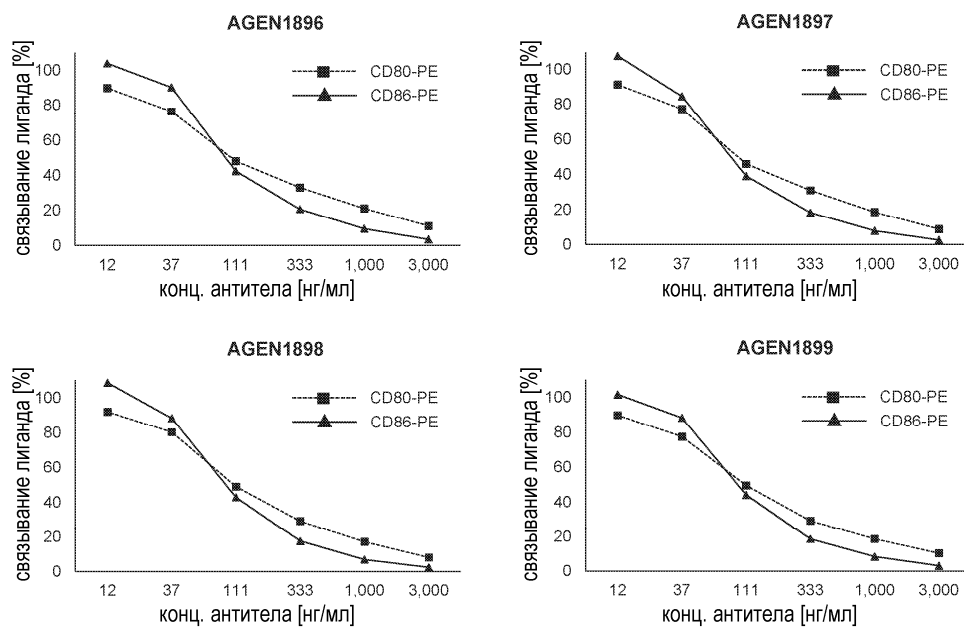
Фиг. 20А



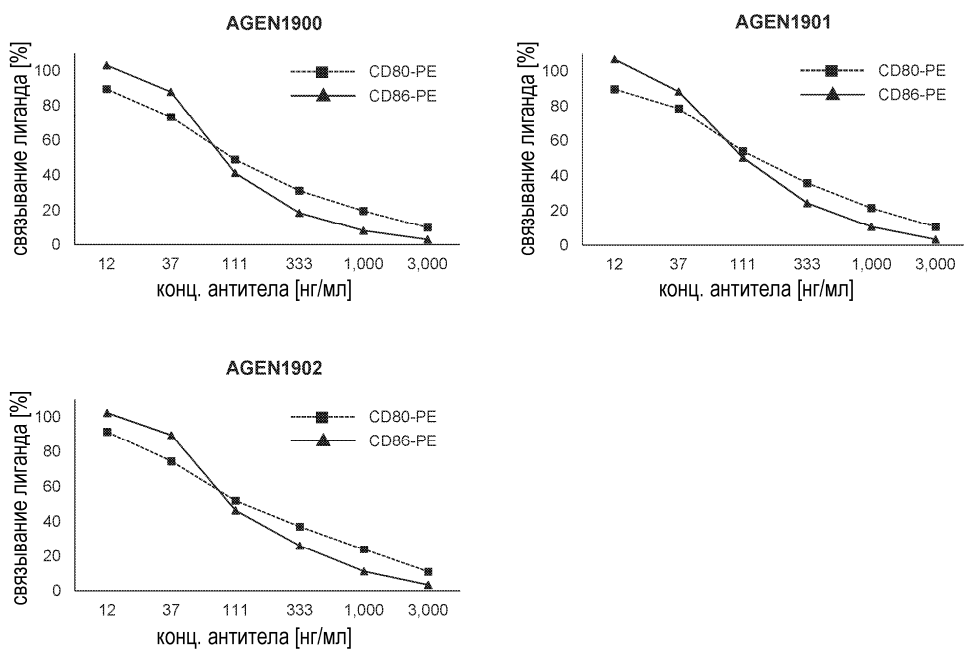
Фиг. 20В



Фиг. 20С



Фиг. 20D



Фиг. 20E



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2