



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.23

(21) Номер заявки
202090389

(22) Дата подачи заявки
2018.07.26

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

(54) АНТИ-CTLA-4 АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/537,753; 62/588,853; 62/645,284;
62/685,599

(32) 2017.07.27; 2017.11.20; 2018.03.20;
2018.06.15

(33) US

(43) 2020.06.24

(86) PCT/US2018/043936

(87) WO 2019/023482 2019.01.31

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Херманн Айнуэр, Иоффе Элла,
Бурова Елена, Терстон Гэвин, Олсон
Уилльям (US)**

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

(56) WO-A1-2009100140
WO-A1-2016196237
WO-A1-2016130986
WO-A1-2017084078

A. RIBAS ET AL.: "Tremelimumab (CP-675,206), a Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen 4 Blocking Monoclonal Antibody in Clinical Development for Patients with Cancer", THE ONCOLOGIST, vol. 12, no. 7, 1 July 2007 (2007-07-01), pages 873-883, XP055479375, US ISSN: 1083-7159, DOI:10.1634/theoncologist.12-7-873, the whole document in particular, abstract

F. STEPHEN HODI ET AL.: "Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma", NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 363, no. 8, 19 August 2010 (2010-08-19), pages 711-723, XP055015428, ISSN: 0028-4793, DOI:10.1056/NEJMoa1003466, the whole document in particular, pages 712 and 719-721

J. M. KIRKWOOD ET AL.: "Phase II Trial of Tremelimumab (CP-675,206) in Patients with Advanced Refractory or Relapsed Melanoma", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 16, no. 3, 1 February 2010 (2010-02-01), pages 1042-1048, XP055015424, ISSN: 1078-0432, DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-2033 the whole document in particular, page 1047

JAMES LARKIN ET AL.: "Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma", THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, -NEJM, vol. 373, no. 1, 2 July 2015 (2015-07-02), pages 23-34, XP055316141, US ISSN: 0028-4793, DOI:10.1056/NEJMoa1504030, the whole document in particular, pages 24-25

UNT ET AL.: "CTLA-4 Antibodies: New Directions, New Combinations CTLA-4 Antibodies: New Directions, New Combinations", ONCOLOGY, vol. 28, no. 3, 10 November 2014 (2014-11-10), pages 1-14, XP055322502, the whole document

ELENA BUROVA ET AL.: "Abstract 3824: Antitumor activity of REGN4659, a fully human anti-CTLA-4 monoclonal antibody, against MC38.0va tumors grown in immunocompetent human CTLA-4 knock-in mice", CANCER RESEARCH, 14 April 2018 (2018-04-14), XP055511537, the whole document

(57) Данное изобретение относится к антителам, которые связываются с белком 4, ассоциированным с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA-4 - cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), и к способам их применения. В различных вариантах осуществления данного изобретения указанные антитела являются полностью человеческими антителами, которые специфично связываются с CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления указанные антитела по данному изобретению пригодны для ингибирования или нейтрализации активности CTLA-4, что обеспечивает средства для активации Т-клеток и/или для лечения заболевания или расстройства, такого как рак или вирусная инфекция.

Ссылка на перечень последовательностей

Данная заявка включает в себя посредством ссылки Перечень Последовательностей, представленный в машиночитаемой форме в виде файла 10360WO01-Sequence.txt, созданного 29 июня 2018 г. и содержащего 178018 байт.

Область техники

Данное изобретение относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые специфично связываются с иммуномодулирующим рецептором белком 4, ассоциированным с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA-4-cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), и к терапевтическим и диагностическим способам применением этих антител.

Уровень техники

Белок 4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA-4; также известный как CD152), представляет собой трансмембранный рецептор 1-го типа Т клеток, который является ингибиторным рецептором контрольной точки и экспрессируется на обычных и регуляторных Т клетках. CTLA-4 отрицательно регулирует активацию Т-клеток, конкурируя с стимуляторным рецептором CD28 за связывание с его природными лигандами B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86). Начальная активация Т-клеток достигается путем стимуляции Т-клеточных рецепторов (ТКР), которые распознают специфичные пептиды, представленные белками главного комплекса гистосовместимости класса I или II (ГКГСИ или ГКГСII) на антигенпрезентирующих клетках (АПК) (Goldrath et al., 1999, Nature 402: 255-262). Активированный ТКР, в свою очередь, инициирует каскад сигнальных событий, которые можно отслеживать по экспрессии трансфицированных репортерных генов, управляемых промоторами, регулируемыми экспрессию различных факторов транскрипции, таких как белок-активатор 1 (AP-1), ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) или ядерный фактор энхансер каппа-легкой цепи активированных В-клеток (NFκB). Т-клеточный ответ затем дополнительно настраивается путем вовлечения костимулирующих или коингибирующих рецепторов, экспрессируемых или конститутивно, или индуцибельно на Т-клетках, таких как CD28, CTLA-4 (белок 4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами), PD-1 (белок запрограммированной гибели клеток 1), LAG-3 (ген 3 активации лимфоцитов) или другие молекулы (Sharpe et al., 2002, Nat. Rev. Immunol. 2: 116-126).

Корецепторы, CD28 и CTLA-4, конкурируют за одни и те же лиганды, CD80 и CD86, экспрессируемые на антигенпрезентирующих клетках (АПК). CTLA-4 связывает CD80 и CD86 с более высокой аффинностью, чем CD28, и функционирует как ловушка и ингибирует активацию CD28 путем секвестрирования лигандов, что ведет к снижению активации Т-клеток (Alegre et al., 2001, Nat. Rev. Immunol. 1:220-228, Walker et al., 2011, Nat. Rev. Immunol. 11:852-863, and Buchbinder et al., 2016, American Journal of Clinical Oncology, 39:98-106).

Краткое описание сущности изобретения

Данное изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают CTLA-4. Указанные антитела по данному изобретению пригодны, среди прочего, для нацеливания на иммунные клетки, экспрессирующие CTLA-4, и для модуляции активности CTLA-4. В определенных вариантах осуществления антитела по данному изобретению пригодны для ингибирования или нейтрализации активности CTLA-4 и/или для стимуляции активации Т-клеток, например, в условиях, когда опосредованное Т-клетками уничтожение является нужным или желательным. В некоторых вариантах осуществления указанные антитела пригодны для ингибирования регуляторной функции Т-клеток и/или для реактивации истощенных Т-клеток. Указанные антитела против CTLA-4 по данному изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть включены в состав мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, например, для модуляции иммунного ответа и/или для нацеливания антител на специфический тип клетки, такой как опухолевая клетка или инфицированная клетка. Указанные антитела пригодны для лечения заболевания или расстройства, такого как рак и вирусная инфекция.

Антитела по данному изобретению могут быть полноразмерными (например, антитела IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, Fab, F(ab')₂ или scFv фрагмент), и могут быть изменены для изменения функциональности, например, для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933). В определенных вариантах осуществления антитела могут быть биспецифичными.

В первом аспекте данное изобретение относится к выделенным рекомбинантным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с CTLA-4. В определенных вариантах осуществления антитела являются полностью человеческими.

Типичные анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению перечислены в табл. 1 и 2 в данном документе. В табл. 1 приведены идентификаторы аминокислотной последовательности вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR), вариабельных областей легкой цепи (LCVR), областей, определяющих комплементарность тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и областей, определяющих комплементарность легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных анти-CTLA-4 антител. В табл. 2 приведены идентификаторы последовательности нуклеиновых кислот HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных анти-CTLA-4 антител.

Данное изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим

HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, или, по существу, аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности к ним.

Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1, или, по существу, аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности к ним.

Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, в сочетании с любой из аминокислотных последовательностей LCVR перечисленных в табл. 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данное изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных анти-CTLA-4 антител, перечисленных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/298, 314/322, 330/338, 346/354, 362/370, 378/386, 394/402, 410/418, 426/434, 442/450, 458/466, 474/482 и 490/498. В некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из одной из SEQ ID NO: 194/202 (например, H1H19303P) или 290/298 (например, H1H19319P2). В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к антителам против CTLA-4 или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность, указанную в табл. 1, имеющую до десяти аминокислотных замен, и указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность, указанную в табл. 1, имеющую до десяти аминокислотных замен. Например, данное изобретение относится к антителам против CTLA-4 или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194, имеющую до десяти аминокислотных замен, и указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202, имеющую до десяти аминокислотных замен. В другом иллюстративном варианте осуществления данное изобретение относится к антителам против CTLA-4 или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194, имеющую по меньшей мере одну аминокислотную замену, и указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202, имеющую по меньшей мере одну аминокислотную замену.

Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 1, или, по существу, аналогичной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности к ним.

Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в табл. 1, или, по существу, аналогичной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности к ним.

Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1, или, по существу, аналогичной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности к ним.

Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в табл. 1, или, по существу, аналогичной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности к ним.

Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл. 1, или, по существу, аналогичной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности к ним.

Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из

любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1, или, по существу, аналогичной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности к ним.

Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1, в сочетании с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данное изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из иллюстративных анти-CTLA-4 антител, перечисленных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 200/208 (например, H1H19303P) и 296/304 (например, H1H19319P2).

Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная HCVR включает HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, представленной в табл. 1, на 1 аминокислоту, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, указанной в табл. 1, на 1 аминокислоту, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, указанной в табл. 1, на 1 аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная LCVR содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, указанной в табл. 1, на 1 аминокислоту, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, указанной в табл. 1 на 1 аминокислоту, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, указанной в табл. 1 на 1 аминокислоту. Например, данное изобретение относится к антителам против CTLA-4 или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная HCVR содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 196 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от последовательности аминокислот. SEQ ID NO: 196 на 1 аминокислоту, HCDR2 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 198 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 198 на 1 аминокислоту, и HCDR3 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 200 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 200 на 1 аминокислоту. В другом иллюстративном варианте осуществления данное изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная LCVR содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 204 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 204 на 1 аминокислоту, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 206, или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 206 на 1 аминокислоту, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 208 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 208 на 1 аминокислоту.

Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим набор из шести CDR (т.е., HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в любом из иллюстративных анти-CTLA-4 антител, перечисленных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 196-198-200-204-206-208 (например, H1H19303P), и 292-294-296-300-302-304 (например, H1H19319P2).

В связанном варианте осуществления данное изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим набор из шести CDR (т.е., HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как определено любым из иллюстративных анти-CTLA-4 антител, перечисленных в табл. 1. Например, данное изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 194/202 (например, H1H19303P) и 290/298 (например, H1H19319P2). Способы и способы идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области и могут быть применены для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрытых в данном документе. Иллюстративные способы нумерации, которые могут применяться для идентификации границ CDR, включают, например, определение по Кабату (Kabat), определение по Чотиа (Chothia) и определение по АбМ. В общих чертах, определение по Кабату основано на изменчивости последовательности, определение по Чотиа основано на расположении областей структурной петли, а определение по АбМ является компромиссом между подходами по Кабату и по Чотиа. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); and Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA

86:9268-9272 (1989). Также доступны общепотребительные базы данных для идентификации последовательностей CDR в антителе.

Данное изобретение включает анти-CTLA-4 антитела, имеющие модифицированный характер гликозилирования. В некоторых вариантах может быть полезна модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования, или антитело, в котором отсутствует фукозная составляющая, присутствующая в олигосахаридной цепи, например, для усиления функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC - antibody dependent cellular cytotoxicity) (см. Shield et al. (2002) JBC. 277: 26733). В других применениях можно модифицировать галактозилирование, чтобы модифицировать комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC - complement dependent cytotoxicity).

Данное изобретение включает анти-CTLA-4 антитела, содержащие Fc-домен, при этом Fc-домен содержит изотип IgG1 или IgG4, как описано в другом месте данного документа.

Данное изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые конкурируют за специфичное связывание с CTLA-4 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим CDR HCVR и CDR LCVR, при этом HCVR и LCVR, каждый, имеют аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1.

Данное изобретение также относится к выделенным антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые блокируют связывание CTLA-4 с его природными лигандами (B7-1/CD80 и B7-2/CD86). В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который блокирует связывание CTLA-4, может связываться с тем же эпитопом на CTLA-4, что и B7-1/CD80 и/или B7-2/CD86, или может связываться с другим эпитопом на CTLA-4 от B7-1/CD80 и/или B7-2/CD86.

Данное изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с CTLA-4 человека или других видов. В некоторых вариантах осуществления антитела могут связываться с CTLA-4 человека и/или с CTLA-4 обезьяны.

Данное изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые конкурируют за связывание с CTLA-4 с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим CDR HCVR и CDR LCVR, при этом каждый из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1.

Данное изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR HCVR и CDR LCVR, при этом каждый из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR HCVR и CDR LCVR, при этом пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR имеет SEQ ID NO: 194/202.

Данное изобретение также включает анти-CTLA-4 антитела, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, содержащимися во внеклеточном домене человеческого CTLA-4.

В одном варианте осуществления данное изобретение относится к рекомбинантному человеческому моноклональному антителу или антигенсвязывающему фрагменту, которые имеют одну или несколько из следующих характеристик:

- (a) специфично связываются с CTLA-4 человека и/или CTLA-4 яванца;
- (b) блокируют связывание CTLA-4 с CD80 и/или CD86;
- (c) блокируют CTLA-4-индуцированную регуляцию подавления Т-клеток и сохраняют передачу сигналов Т-клеток и
- (d) подавляют рост опухоли и увеличивают выживаемость у субъекта с раком.

В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут специфично связываться с CTLA-4 агонистическим образом, то есть оно может усиливать или стимулировать связывание и/или активность CTLA-4; в других вариантах осуществления указанное антитело может специфично связываться с CTLA-4 антагонистическим образом, то есть оно может блокировать связывание CTLA-4 с его лигандом(ами).

В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению являются биспецифичными, включающими первую специфичность связывания с CTLA-4 и вторую специфичность связывания для второго целевого эпитопа. Второй эпитоп-мишень может быть другим эпитопом на CTLA-4 или на другом белке. В некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп может находиться в другой клетке, включая другую Т-клетку, В-клетку, опухолевую клетку или вирусно-инфицированную клетку.

Во втором аспекте данное изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим анти-CTLA-4 антитела или их части. Например, данное изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в табл. 2, или, по существу, аналогичной последовательности, имеющей по меньшей мере

имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности к ним. В определенных вариантах осуществления в соответствии с этим аспектом изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, при этом и HCVR и LCVR получены из одного и того же анти-CTLA-4 антитела, указанного в табл. 1.

В связанном аспекте данное изобретение относится к рекомбинантным экспрессирующим векторам, способным экспрессировать полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой или легкой цепи анти-CTLA-4 антитела. Например, данное изобретение включает рекомбинантные экспрессирующие векторы, содержащие любую из молекул нуклеиновой кислоты, упомянутых выше, т.е., молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, как указано в табл. 1. Данное изобретение также относится к рекомбинантным векторам экспрессии, способным экспрессировать полипептид, содержащий тяжелую или легкую цепь анти-CTLA-4 антитела. Например, данное изобретение включает рекомбинантные экспрессирующие векторы, содержащие любую из молекул нуклеиновой кислоты, упомянутых выше, т.е., молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей тяжелой цепи или легкой цепи, как указано в табл. 1. Также в объем данного изобретения входят клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продуцировать антитела или фрагменты антител, и извлекать антитела и фрагменты антител, полученные таким образом.

В третьем аспекте данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантное человеческое антитело или его фрагмент, который специфично связывает CTLA-4 и фармацевтически приемлемый носитель. В связанном аспекте изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию анти-CTLA-4 антитела и второго терапевтического агента. В одном варианте осуществления второй терапевтический агент представляет собой любой агент, который с пользой комбинируется с анти-CTLA-4 антителом. Типичные агенты, которые могут быть с пользой объединены с анти-CTLA-4 антителом, включают, без ограничения, другие агенты, которые связывают с и/или модулируют передачу сигналов CTLA-4 (включая другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и т.д.) и/или агенты, которые непосредственно не связывают CTLA-4, но тем не менее модулируют активацию иммунных клеток. Дополнительные комбинированные терапии и совместные составы, включающие анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению, раскрыты в другом месте данного документа.

В четвертом аспекте изобретение относится к способам модуляции иммунного ответа у субъекта, причем способ включает введение терапевтически эффективного количества анти-CTLA-4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по данному изобретению субъекту нуждающемуся в этом. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к способам усиления иммунного ответа у субъекта, причем способы включают введение субъекту эффективного количества антитела или его фрагмента по данному изобретению, которое связывает CTLA-4. В одном варианте осуществления данное изобретение относится к способу стимуляции или усиления активации Т-клеток у субъекта. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к способам восстановления активности Т-клеток, включающим контактирование Т-клеток с эффективным количеством антитела по данному изобретению таким образом, что активность Т-клеток восстанавливается. В одном варианте осуществления данное изобретение относится к способам ингибирования регуляторных Т-клеток у субъекта, причем способы включают введение терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по данному изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. В определенных вариантах осуществления субъект, нуждающийся в этом, может страдать от заболевания или расстройства, такого как рак или вирусная инфекция. В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к способам восстановления CTLA-4-опосредованного ингибирования активности Т-клеток, включающему контактирование Т-клеток с эффективным количеством антитела по данному изобретению.

В пятом аспекте изобретение относится к терапевтическим способам лечения заболевания или расстройства, такого как рак или вирусная инфекция, у субъекта с применением анти-CTLA-4 антитела или антигенсвязывающей части антитела по данному изобретению, при этом терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или фрагмент антитела по данному изобретению, субъекту, нуждающемуся в этом. Заболевание, которое лечат, представляет собой любое заболевание или состояние, которое улучшается, облегчается, ингибируется или предотвращается посредством стимуляции или ингибирования активности или передачи сигналов CTLA-4. В определенных вариантах осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом субъекту, нуждающемуся в этом. Второй терапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей из антитела к другому коингибитору Т-клеток, антитела к антигену опухолевых клеток, антитела к рецептору Т-клеток, антитела к эпителию на клетке, инфицированной вирусом, цитотоксического агента, противовирусного лекарственного средства, противовирусного лекарственного средства, противовоспалительного лекарственного средства (например, кортикостероидов), химиотерапевтического сред-

ства, лучевой терапии, хирургического вмешательства, иммунодепрессанта и любого другого лекарственного средства или терапии, известных в данной области. В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент может представлять собой агент, который помогает нейтрализовать или уменьшить любой возможный побочный эффект (эффекты), связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по данному изобретению, если такой побочный эффект (эффекты) будет иметь место.

В определенных вариантах осуществления данное изобретение предлагает способы подавления роста опухоли. Например, данное изобретение обеспечивает подавление роста опухоли у первичной опухоли или метастатической опухоли у субъекта. В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к способам повышения выживаемости (например, выживаемость без прогрессирования или общей выживаемости) субъекта с раком. Примеры рака включают, но не ограничиваются ими, первичный и/или рецидивирующий рак, включая рак крови (например, гематологическое злокачественное новообразование, такое как лимфома, миелома или лейкоз), рак мозга (например, мультиформная глиобластома), рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), включая запущенный или метастатический НМРЛ), плоскоклеточный рак головы и шеи, печеночно-клеточный рак, почечно-клеточный рак, меланому, мезотелиому, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак кости, колоректальный рак, рак почки, рак пищевода, рак печени, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак шейки матки, рак кишечника, рак простаты и рак толстой кишки. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к способам ингибирования или подавления роста развитых опухолей. Способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из группы, состоящей из ингибитора белка запрограммированной смерти-1 (PD-1) (например, антитела против PD-1, такого как ниволумаб, пембролизумаб или REGN2810), ингибитора лиганда запрограммированной смерти 1 (PD-L1) (например, анти-PD-L1 антитела, такого как атезолизумаб, авалумаб или дурвалумаб), антагониста фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (например, афлиберцепт, бевацизумаб), ингибитора ангиопоэтина-2 (Ang2) (например, антитело против Ang2, такого как несвакумаб), ингибитора гена 3 активации лимфоцитов (LAG3), биспецифического антитела CD20×CD3 (например, REGN1979), цитотоксина, химиотерапевтического средства, противораковой вакцины, хирургии и лучевой терапии. Дополнительные примеры терапии/терапевтических агентов, которые можно применять в комбинации с анти-CTLA-4 антителом по данному изобретению для применения при лечении рака, описаны в другом месте данного документа.

Антитело или его фрагмент можно вводить подкожно, внутривенно, внутрикожно, внутривнутрино, перорально, внутримышечно или внутримозгово. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или его фрагмент вводят локально в опухоль (перитуморально или интраопухово). Антитело или его фрагмент можно вводить в дозе от около 0,1 мг/кг массы тела до около 100 мг/кг массы тела субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное антитело вводят в количестве от около 50 мг до около 1000 мг нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело вводят в дозе от около 25 до около 600 мг. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело вводят в дозе от около 50 до около 1200 мг.

Данное изобретение также включает применение анти-CTLA-4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по данному изобретению при изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, которое могло бы извлечь пользу из блокады связывания и/или передачи сигналов CTLA-4, таких как рак.

Данное изобретение также включает применение антител и антигенсвязывающих фрагментов или фармацевтической композиции, содержащей их:

- (i) в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, которое можно лечить путем антагонизации CTLA-4 (например, рака); и/или
- (ii) при лечении заболевания или расстройства, которое поддается лечению путем антагонизации CTLA-4 (например, рака).

В другом аспекте данное изобретение относится к способу лечения немелкоклеточного рака легкого (включая запущенный или метастатический НМРЛ) у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту анти-CTLA-4 антитела и антитела против PD-1. В некоторых случаях анти-CTLA-4 антитело содержит CDR HCVR, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194, и CDR LCVR, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202. В некоторых случаях анти-CTLA-4 антитело содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 соответственно, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 196-198-200-204-206-208. В некоторых случаях анти-CTLA-4 антитело содержит HCVR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194, и LCVR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202. В некоторых случаях анти-CTLA-4 антитело содержит константную область тяжелой цепи человеческого IgG1. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело против PD-1 представляет собой цемпилимаб (cemiplimab). Данное изобретение также включает применение таких антител при изготовлении лекарственного сред-

ства или лекарственных средств для лечения рака (например, немелкоклеточного рака легкого, включая развитый или метастатический НМРЛ).

Другие варианты осуществления станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 продемонстрированы средние объемы опухолей ($\text{мм}^3 \pm \text{COC}$) в каждой группе лечения в несколько моментов времени после имплантации опухоли для эксперимента, описанного в исследовании (А) в примере 7. CTLA-4^{гум/гум} нок-ин мышам, имплантировали ПК (SC - subcutaneously) клетки MC38.Ova (10^6 клеток/мышь) в день 0 и разделяли на четыре группы обработки (9 мышей/группа). Мышам вводили 10 мг/кг одного из трех оптимизированных прототипов антител против человеческого CTLA-4 (H1H19273P, или H1H19303P, или H1H19319) или 10 мг/кг изотипического контроля hIgG1 внутривенно (ВВ - IP - intraperitoneally) в дни 3, 7, 10 14 и 17. Объемы опухолей контролировались измерениями штангенциркулем два раза в неделю в течение 37 дней. Дни лечения указаны стрелками.

На фиг. 2 продемонстрированы отдельные объемы опухолей на сутки 24 для эксперимента, описанного в исследовании (А) в примере 7. День 24 был последней временной точкой в исследовании, когда все животные во всех группах были живы. Статистическую значимость определяли с помощью одностороннего ANOVA с множественным сравнением Даннетта после теста (**** $p < 0,0001$).

На фиг. 3 продемонстрированы кривые выживаемости Каплана-Мейера для эксперимента, описанного в исследовании (А) в примере 7.

На фиг. 4 продемонстрированы средние объемы опухолей ($\text{мм}^3 \pm \text{COC}$) в каждой группе лечения в нескольких временных точках после имплантации опухоли для эксперимента, описанного в исследовании (В) в примере 7. CTLA-4^{гум/гум} нок-ин мышам вводили анти-CTLA-4 антитело H1H19303P или изотипический контроль hIgG1 в дни 3, 6, 9, 13 и 16 ВВ (IP). Объемы опухолей контролировались измерениями штангенциркулем два раза в неделю в течение 37 дней. Дни лечения указаны стрелками.

На фиг. 5 продемонстрированы отдельные объемы опухолей на 20 день для эксперимента, описанного в исследовании (В) в примере 7. Статистическую значимость определяли с помощью одностороннего ANOVA с множественным сравнением Даннетта после теста (**** $p < 0,0001$).

На фиг. 6 продемонстрированы кривые выживаемости Каплана-Мейера для эксперимента, описанного в исследовании (В) в примере 7.

На фиг. 7 продемонстрирована концентрация общего антитела изотипического контроля H1H19303P и hIgG1 в сыворотке, как описано в исследовании (В) в примере 7.

На фиг. 8 продемонстрирована концентрация мышиных антител против человеческого белка (MA-NA - mouse anti-human antibodies) H1H19303P (■) или изотипического контроля (●), как описано в исследовании (В) в примере 7.

На фиг. 9 продемонстрированы средние объемы опухолей ($\text{мм}^3 \pm \text{COC}$) в каждой группе лечения в несколько моментов времени после имплантации опухоли для эксперимента, описанного в примере 8. Дни лечения указаны стрелками.

На фиг. 10 продемонстрированы отдельные объемы опухолей на 10-й день после начала лечения, как описано в примере 8.

На фиг. 11 продемонстрированы кривые выживаемости Каплана-Мейера для эксперимента, описанного в примере 8.

На фиг. 12 и 13 продемонстрировано, что H1H19303P (также известный как REGN4659) задерживает рост развитых опухолей у мышей CTLA-4^{гум/гум}. Мышам приживляли ПК (SC) в бок клетки Mc38.Ova (5×10^5 клеток/мышь), рандомизировали в группы обработки на 10-й день, когда объемы опухоли достигали 100 мм^3 , и REGN4659 (25 мг/кг, 10 мг/кг, $n=10$) или Ат изотипического контроля (25 мг/кг, $n=10$) вводили в дни 10, 13, 17, и объемы опухолей контролировали до дня 27. На фиг. 12 продемонстрированы усредненные кривые роста опухоли в каждой группе обработки. На фиг. 13 продемонстрированы отдельные объемы опухолей в каждой группе обработки, измеренные на 21 день, последнюю временную точку, когда все животные в исследовании были живы.

На фиг. 14 продемонстрирована средняя интенсивность флуоресценции (СИФ - MFI - mean fluorescence intensity) суммарной (поверхностной и внутриклеточной) экспрессии человеческого CTLA-4 на внутриопухолевых и селезеночных T_{reg} и эффекторных Т клетках в опухолях мышей, несущих CTLA-4^{гум/гум}, обработанных контрольным антителом hIgG1. Экспрессия CTLA-4 на эффекторных клетках CD8⁺ и CD4⁺ в селезенке была неотличима от окрашивания изотипическим контролем (СИФ=0) и не продемонстрирована.

Подробное описание сущности изобретения

Прежде чем описать представленные способы, следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем данного изобретения будет ограничиваться только прилагае-

мой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут применяться при практическом применении или испытании данного изобретения, предпочтительные способы и материалы описаны в данном документе. Все публикации, упомянутые в данном документе, включены в него в качестве ссылки во всей их полноте.

Термин "CTLA-4" относится к белку 4, ассоциированному с цитотоксическими Т-лимфоцитами, рецептору иммунной контрольной точки или ко-ингибитору Т-клеток, также известному как CD152. Аминокислотная последовательность полноразмерного человеческого CTLA-4 представлена в виде SEQ ID NO: 505 (номер доступа NP_005205.2). Термин "CTLA-4" включает рекомбинантный CTLA-4 или его фрагмент. Термин также охватывает CTLA-4 или его фрагмент, связанный, например, с гистидиновой меткой, Fc мыши или человека, сигнальной последовательностью или трансмембранным и цитоплазматическим доменом CD300a (ак 181-299; номер доступа NP_009192.2). Например, термин включает в себя последовательности, обсуждаемые в примерах, например, содержащий тус-тус-polyhistidine тэг на С-конце полноразмерного CTLA-4 или содержащий Fc мыши (mIgG2a) на С-конце полноразмерного CTLA-4. Если не указано, что он относится к виду, отличному от человека, термин "CTLA-4" означает человеческий CTLA-4.

CTLA-4 является членом суперсемейства иммуноглобулинов (Ig) и гомологом CD28, но с большей аффинностью связывания с лигандами CD80 и CD86. CTLA-4 представляет собой трансмембранный белок типа I из 223 аминокислот, содержащий V-домен, трансмембранный домен и цитоплазматический хвост, который экспрессируется на активированных Т-клетках и регуляторных Т-клетках. Рецептор CTLA-4 связывается с лигандами B7-1/CD80 и B7-2/CD86, присутствующими на антигенпрезентирующих клетках (АПК).

Используемый в данном документе термин "ко-ингибитор Т-клеток" относится к лиганду и/или рецептору, который модулирует иммунный ответ посредством активации или супрессии Т-клеток. Термин "ко-ингибитор Т-клеток", также известный как ко-сигнальная молекула Т-клеток, включает, но не ограничивается ими, белок запрограммированной смерти-1 (PD-1), ген 3 активации лимфоцитов (LAG3 - lymphocyte-activation gene 3), аттенуатор В и Т-лимфоцитов (BTLA - B and T lymphocyte attenuator), CD-28, 2B4, LY108, белок-3, содержащий Т-клеточный иммуноглобулин и муцин (TIM3 - T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3), Т-клеточный иммунорецептор с доменами иммуноглобулина и ITIM (TIGIT - T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains; также известный как VSIG9), рецептор 1 подобный иммуноглобулину, связанный с лейкоцитами (LAIR1 - Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1, также известный как CD305), индуцибельный костимулятор Т-клеток (ICOS - inducible T cell costimulator; также известный как CD278), белок, содержащий V-домен Ig - супрессор активации Т-клеток (VISTA - V-domain Ig suppressor of T cell activation) и CD160.

Используемый в данном документе термин "антитело" предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями (т.е., полных молекул антител), а также их мультимеров (например IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (HCVR или V_H) и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C_H1, C_H2 и C_H3). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (LCVR или V_L) и константной области легкой цепи (C_L). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), которые разделены областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть природно или искусственно модифицированы. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR.

Также возможно замещение одного или нескольких остатков CDR или пропуск одного или нескольких CDR. В научной литературе, описаны антитела, в которых можно обойтись без одного или двух CDR для связывания. Padlan et al. (1995 FASEB J. 9: 133-139) проанализировали области контакта между антителами и их антигенами, основываясь на опубликованных кристаллических структурах, и пришли к выводу, что только от одной пятой до одной трети остатков CDR действительно связываются с антигеном. Падлан также обнаружил много антител, в которых одна или две CDR не имели аминокислот, контактирующих с антигеном (см. Также Vajdos et al., 2002 J Mol Biol 320: 415-428).

Остатки CDR, не связывающиеся с антигеном, могут быть идентифицированы на основе предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 часто не требуются) из областей CDR Кабата (Kabat), лежащих вне CDR Чотиа (Chothia), путем молекулярного моделирования и/или эмпирически. Если CDR или его остаток(ки) опущен, его обычно заменяют аминокислотой, занимающей соответст-

вующее положение в другой последовательности антитела человека, или консенсусе таких последовательностей. Положения для замены в CDR и аминокислотах для замены также могут быть выбраны эмпирически. Эмпирические замены могут быть консервативными или неконсервативными заменами.

Полностью человеческие моноклональные анти-CTLA-4 антитела, раскрытые в данном документе, могут включать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR-областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации могут быть легко установлены путем сравнения раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Данное изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, в которых одна или несколько аминокислот в одной или нескольких каркасных и/или CDR-областях мутированы в соответствующий остаток(ки) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или в соответствующий остаток(ки) другой последовательности зародышевой линии человека, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности упоминаются в данном документе совместно как мутации зародышевой линии). Специалист в данной области, начиная с описанных в данном документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко продуцировать многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько индивидуальных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления все каркасные и/или CDR-остатки в доменах V_H и/или V_L мутируют обратно в остатки, обнаруженные в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки мутируют обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например, только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или несколько каркасных и/или CDR остатков мутируют в соответствующий остаток(ки) последовательности другой зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой антитело было первоначально получено). Кроме того, антитела по данному изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркаса и/или областей CDR, например, в которых определенные отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток определенной последовательности зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются или мутируют в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, можно легко проверить на одно или несколько желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), снижена иммуногенность и др. Указанные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные этим общим способом, включены в данное изобретение.

Данное изобретение также включает полностью человеческие моноклональные анти-CTLA-4 антитела, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе, с одной или несколькими консервативными заменами. Например, данное изобретение включает анти-CTLA-4 антитела, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR с, например, 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. аминокислотных замен относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе.

Термины "человеческое антитело" и "полностью человеческое антитело", используемые в данном документе, предназначены для включения антител, имеющих переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческие МАТ (МАТ) по данному изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайтспецифического мутагенеза *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Однако термины "человеческое антитело" и "полностью человеческое антитело", используемые в данном документе, не предназначены для включения МАТ, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих (например, мыши), были привиты на последовательности FR человека. Указанные термины включают антитела, рекомбинантно продуцируемые в млекопитающем, отличном от человека, или в клетках млекопитающего, отличного от человека. Указанные термины не предназначены для включения антител, выделенных или созданных у человека.

Используемый в данном документе термин "рекомбинантный" относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам по данному изобретению, созданным, экспрессированным, выделенным или полученным с помощью технологий или способов, известных в данной области техники такой, как

технология рекомбинантных ДНК, которая включает, например, сплайсинг ДНК и трансгенную экспрессию. Термин относится к антителам, экспрессируемым в млекопитающих, отличных от человека (включая трансгенных млекопитающих, отличных от человека, например, трансгенных мышей), или в клеточной (например, клетки CHO) экспрессионной системе или выделенных из комбинаторной библиотеки рекомбинантных человеческих антител.

Термин "мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы" в контексте данного описания относится к биспецифичным, триспецифичным или мультиспецифичным антигенсвязывающим молекулам и их антигенсвязывающим фрагментам. Мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы могут быть специфичными для разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные для эпитопов более чем одного целевого полипептида. Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула может представлять собой один многофункциональный полипептид или может представлять собой мультимерный комплекс из двух или более полипептидов, которые ковалентно или нековалентно связаны друг с другом. Термин "мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы" включает антитела по данному изобретению, которые могут быть связаны или коэкспрессированы с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или несколькими другими молекулярными объектами, такими как белок или его фрагмент, для получения биспецифичной или мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы со второй специфичностью связывания. Согласно данному изобретению, термин "мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы" также включает биспецифичные, триспецифичные или мультиспецифичные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело по данному изобретению функционально связано с другим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом для получения биспецифического антитела со второй специфичностью связывания. Биспецифичные и мультиспецифичные антитела по данному изобретению описаны в другом месте данного документа.

Термин "специфично связывает" или "специфично связывается с" или тому подобное означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который относительно стабилен в физиологических условиях. Специфичное связывание может характеризоваться константой равновесной диссоциации, равной, по меньшей мере, около 1×10^{-8} М или менее (например, меньшее K_D обозначает более плотное связывание). Способы определения того, являются ли две молекулы специфично связывающимися, хорошо известны в данной области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и тому подобное. Как описано в данном документе, антитела были идентифицированы с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, как специфично связывающиеся с CTLA-4. Кроме того, мультиспецифичные антитела, которые связываются с одним доменом в CTLA-4 и одним или несколькими дополнительными антигенами, или биспецифичные, которые связываются с двумя различными областями CTLA-4, тем не менее считаются антителами, которые "специфично связываются", как это используется в данном документе.

Термин "высокоаффинное" антитело относится к тем мАт, которые имеют аффинность связывания с CTLA-4, выраженную как K_D , по меньшей мере 10^{-8} М; предпочтительно 10^{-9} М; более предпочтительно 10^{-10} М, еще более предпочтительно 10^{-11} М, еще более предпочтительно 10^{-12} М, как измерено поверхностным плазмонным резонансом, например BIACORE™ или ИФА для сродства в растворе.

Под термином "медленная скорость отсоединения", " K_{off} " или " k_d " подразумевается антитело, которое диссоциирует от CTLA-4 с константой скорости $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или менее, предпочтительно $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или менее, как определено поверхностным плазмонным резонансом, например, BIACORE™.

Термины "антигенсвязывающая часть антитела", "антигенсвязывающий фрагмент антитела" и тому подобное, используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, ферментативно полученный, синтетический или генно-инженерный полипептид или гликопротеин, который специфично связывает антиген с формированием комплекса. Термины "антигенсвязывающий фрагмент антитела" или "фрагмент антитела", используемые в данном документе, относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с CTLA-4.

В конкретных вариантах осуществления указанное антитело или фрагменты антитела по данному изобретению могут быть конъюгированы с фрагментом, таким как лиганд или терапевтический фрагмент ("иммуноконъюгат"), таким как цитотоксин, вторым анти-CTLA-4 антителом, антителом к опухолеспецифичному антигену, противораковому лекарственному средству или любому другому терапевтическому компоненту, пригодному для лечения заболевания или состояния, включающим рак или вирусную инфекцию, включая хроническую вирусную инфекцию.

"Выделенное антитело", как используется в данном документе, предназначено для обозначения антитела, которое по существу не содержит других антител (Ат), имеющих отличную антигенную специфичность (например, изолированное антитело, которое специфично связывает CTLA-4, или его фрагмент, по существу, не содержащий Ат, которое специфично связывает антигены, отличные от CTLA-4).

"Блокирующее антитело" или "нейтрализующее антитело", как используется в данном документе

(или антитело, которое нейтрализует активность CTLA-4, или "антитело-антагонист"), предназначено для обозначения антитела, связывание которого с CTLA-4 приводит к ингибированию по крайней мере, одной биологической активности CTLA-4. Например, антитело по данному изобретению может предотвращать или блокировать связывание CTLA-4 с CD80 и/или CD86.

"Активирующее антитело" или "усиливающее антитело", как используется в данном документе (или "агонистическое антитело"), предназначено для обозначения антитела, связывание которого с CTLA-4 приводит к увеличению или стимуляции по меньшей мере одной биологической активности CTLA-4. Например, антитело по данному изобретению может увеличивать активность CTLA-4 путем связывания с CTLA-4 способом, согласующимся со связыванием лиганда (например, CD80 или CD86), что приводит к внутриклеточной передаче сигналов CTLA-4.

Используемый в данном документе термин "поверхностный плазмонный резонанс" относится к оптическому явлению, которое позволяет анализировать биомолекулярные взаимодействия в реальном времени путем обнаружения изменений в концентрациях белка в матрице биосенсора, например, с применением системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Упсала, Швеция и Пискатауэй, Нью-Джерси).

Используемый в данном документе термин "K_D" предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом, в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с различными участками антигена и могут иметь разные биологические эффекты. Термин "эпитоп" также относится к сайту на антигене, на который отвечают В и/или Т-клетки. Это также относится к области антигена, которая связана антителом. Эпитопы могут быть определены как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы, как правило, являются подмножеством структурных эпитопов и имеют те остатки, которые непосредственно способствуют сродству взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными, то есть состоять из нелинейных аминокислот. В определенных вариантах осуществления эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахара, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и в некоторых вариантах осуществления могут иметь конкретные трехмерные структурные характеристики и/или характеристики удельного заряда.

Используемый в данном документе термин "перекрестная конкуренция" означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с антигеном и ингибирует или блокирует связывание другого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Термин также включает конкуренцию между двумя антителами в обеих ориентациях, т.е., первое антитело, которое связывает и блокирует связывание второго антитела, и наоборот. В определенных вариантах осуществления первое антитело и второе антитело могут связываться с одним и тем же эпитопом. Альтернативно, первое и второе антитела могут связываться с разными, но перекрывающимися эпитопами, так что связывание одного из них ингибирует или блокирует связывание второго антитела, например, посредством стерического затруднения. Перекрестную конкуренцию между антителами можно измерить способами, известными в данной области, например анализом интерферометрии биослоя в реальном времени без меток. Перекрестная конкуренция между двумя антителами может быть выражена как связывание второго антитела, которое меньше фонового сигнала из-за самосвязывания (при этом первое и второе антитела представляют собой одно и то же антитело). Перекрестная конкуренция между двумя антителами может быть выражена, например, в виде % связывания второго антитела, которое меньше, чем самосвязывание фона начального уровня (при этом первое и второе антитела представляют собой одно и то же антитело).

Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный" применительно к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту указывает на то, что при оптимальном выравнивании, при наличии соответствующих нуклеотидных вставок или делеций, с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) существует идентичность нуклеотидной последовательности в по меньшей мере, около 90% и более предпочтительно по меньшей мере около 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, как измерено с помощью любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, как обсуждено ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, в некоторых случаях может кодировать полипептид, имеющий такую же или по существу сходную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Идентичность последовательности можно рассчитать с помощью алгоритма, например, алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) для глобального выравнивания, или алгоритма Смита-Уотермана (Smith and Waterman). 1981, J. Mol. Biol. 147: 195-197) для локального выравнивания. Другой предпочтительный алгоритм описан Dufresne et al., Nature Biotechnology, 2002 (vol. 20, p. 1269-71) и применяется в программном обеспечении GenePAST (GQ Life Sciences, Inc., Бостон, Массачусетс).

Применительно к полипептидам термин "существенное сходство" или "по существу сходный" означает, что две пептидные последовательности, при оптимальном выравнивании, например, с помощью

программ GAP или BESTFIT с применением значений промежутков по умолчанию, имеют идентичность последовательности по меньшей мере 90% и даже больше, предпочтительно по меньшей мере 95%, 98% или 99% идентичности последовательности. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. Консервативная аминокислотная замена представляет собой замену, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (группу R) со сходными химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность). В целом, консервативная аминокислотная замена существенно не изменит функциональных свойств белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент или степень сходства могут быть скорректированы в сторону увеличения, чтобы скорректировать консервативный характер замены. Средства для осуществления этой регулировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, которая включена сюда посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают:

- 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин;
- 2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин;
- 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин;
- 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан;
- 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин;
- 6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и
- 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин.

Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45, включенной в данный документ в качестве ссылки. Умеренно консервативной заменой является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в логарифмической матрице правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей для полипептидов обычно измеряют с применением программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет сходные последовательности, используя показатели сходства, назначенные различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как GAP и BESTFIT, которые можно применять с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близко родственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом, см., например, GCG Version 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с применением FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендуемыми параметрами; программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процентную идентичность последовательности областей наилучшего перекрытия между запросом и последовательностями поиска (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по данному изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 and (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, каждая из которых включена в данный документ в качестве ссылки.

Фраза "терапевтически эффективное количество" означает количество, которое обеспечивает желаемый эффект, для которого оно вводится. Точное количество будет зависеть от цели лечения и будет определено специалистом в данной области с применением известных методов (см., например, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding Compounding*).

Используемый в данном документе термин "субъект" относится к животному, предпочтительно млекопитающему, нуждающемуся в улучшении, профилактике и/или лечении заболевания или расстройства, такого как вирусная инфекция или рак. Термин включает людей, которые имеют или подвергаются риску заболеть раком, метастатическим раком или вирусной инфекцией.

Как используется в данном документе, "противораковое лекарственное средство" означает любой агент, пригодный для лечения или ослабления или ингибирования рака, включая, но не ограничиваясь этим, цитотоксины и агенты, такие как антиметаболиты, алкилирующие агенты, антрациклины, антибиотики, антимитотические агенты, прокарбазин, гидроксимочевина, аспарагиназа, кортикостероиды, циклофосфамид, митотан (O, P'-(DDD)), биопрепараты (например, антитела и интерфероны) и радиоактивные агенты. Используемый в данном документе термин "цитотоксин или цитотоксический агент" также относится к химиотерапевтическому агенту и означает любой агент, который вреден для клеток. Примеры включают Таксол (паклитаксел), темозоломид, цитохалазин B, грамицидин D, бромид этидия, эметин, цисплатин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, дауно-

рубицин, дигидроксид антрацин дион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пурамицин и их аналоги или гомологи.

Используемый в данном документе термин "противовирусное лекарственное средство" относится к любому лекарственному средству или терапии, используемой для лечения, профилактики или ослабления вирусной инфекции у субъекта-хозяина. Термин "противовирусный препарат" включает, но не ограничивается ими, зидовудин, ламивудин, абакавир, рибавирин, лопинавир, эфавиренц, кобицистат, тенофовир, рилпивирин, анальгетики и кортикостероиды. В контексте данного изобретения вирусные инфекции включают долгосрочные или хронические инфекции, вызванные вирусами, включая, но не ограничиваясь этим, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус гепатита В (ВГВ - HBV - hepatitis B virus), вирус гепатита С (ВГС - HCV - hepatitis C virus), вирус папилломы человека (HPV), вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV - lymphocytic choriomeningitis virus) и вирус иммунодефицита обезьян (SIV - simian immunodeficiency virus).

Используемый в данном документе термин "для усиления иммунного ответа" относится к увеличению активности иммунной клетки, такой как Т-клетка или NK-клетка, против опухолевой клетки или клетки, инфицированной вирусом. В контексте данного изобретения термин включает блокирование опосредованного CTLA-4 ингибирования активности Т-клеток или остановку или обращение истощенного состояния Т-клеток. Он также включает ингибирование регуляторной активности Т-клеток. Усиленный иммунный ответ, используемый в контексте данного изобретения, приводит к усиленному уничтожению опухолевых клеток и/или ингибированию роста опухоли.

Указанные антитела и антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению специфично связываются с CTLA-4 и усиливают активацию Т-клеток. Указанные антитела против CTLA-4 могут связываться с CTLA-4 с высоким сродством или с низким сродством. В некоторых вариантах осуществления антитела по данному изобретению могут быть блокирующими антителами, при этом антитела могут связываться с CTLA-4 и ингибировать передачу сигналов CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления антитела по данному изобретению блокируют связывание CTLA-4 с CD80 и/или CD86 и/или стимулируют или усиливают активацию Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления антитела связываются с CTLA-4 и обращают анергическое состояние истощенных Т-клеток. В определенных вариантах осуществления антитела связываются с CTLA-4 и ингибируют регуляторную активность Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления антитела могут быть пригодны для стимуляции или усиления иммунного ответа и/или для лечения субъекта, страдающего от рака или вирусной инфекции. Указанные антитела при введении субъекту, нуждающемуся в этом, могут уменьшить хроническую инфекцию вируса, такого как ВИЧ, LCMV или ВГВ, у субъекта. Они могут быть применены для ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта. Их можно применять отдельно или в качестве дополнительной терапии с другими терапевтическими компонентами или способами, известными в данной области, для лечения рака или вирусной инфекции.

В некоторых вариантах осуществления анти-CTLA-4 антитела могут быть мультиспецифичными антигенсвязывающими молекулами, при этом они содержат первую специфичность связывания с CTLA-4 и вторую специфичность связывания с антигеном, выбранным из группы, состоящей из другого коингибитора Т-клеток и другого эпитопа CTLA-4.

Иммуноген, содержащий любое из следующего, можно применять для получения антител к CTLA-4. В определенных вариантах осуществления антитела по данному изобретению получают от мышей, иммунизированных полноразмерным нативным CTLA-4 (см. номер доступа NCBI NP_005205.2) (SEQ ID NO: 505) или рекомбинантным пептидом CTLA-4. Альтернативно, CTLA-4 или его фрагмент может быть получен с применением стандартных биохимических методов и применен в качестве иммуногена.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой внеклеточный домен CTLA-4. В одном варианте осуществления данного изобретения иммуноген представляет собой фрагмент внеклеточного домена CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген может представлять собой рекомбинантный пептид CTLA-4, экспрессируемый в *E.coli*, или в любых других эукариотических клетках или клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO).

В некоторых вариантах осуществления антитела, которые специфично связываются с CTLA-4, могут быть получены с применением фрагментов вышеупомянутых областей или пептидов, которые простираются за пределы указанных областей на около 5-20 аминокислотных остатков из одной или обеих, N или C концевых областей, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления любая комбинация вышеуказанных областей или их фрагментов может быть применена при получении специфичных антител к CTLA-4.

Пептиды могут быть модифицированы для включения добавления или замены определенных остатков для мечения или в целях конъюгации с молекулами-носителями, такими как KLH. Например, цистеин может быть добавлен или на N-конце, или на C-конце пептида, или может быть добавлена линкерная последовательность для приготовления пептида для конъюгации, например, с KLH для иммунизации.

Некоторые анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению способны связывать и нейтрализовать активность CTLA-4, как определено с помощью анализов *in vitro* или *in vivo*. Способность антител по

данному изобретению связываться и нейтрализовать активность CTLA-4, может быть измерена с применением любого стандартного метода, известного специалистам в данной области, включая анализы связывания или анализы активности, как описано в данном документе.

Неограничивающие, примерные анализы *in vitro* для измерения активности связывания проиллюстрированы в примерах в данном документе. В примере 3 аффинность связывания и кинетические константы человеческих анти-CTLA-4 антител для CTLA-4 человека и обезьяны определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса или MASS-1. В примере 4 конкурентный сэндвич-ИФА применяли для оценки способности анти-CTLA-4 антител блокировать связывание белка CTLA-4 с его природными лигандами B7-1 и B7-2. В примере 5 описано связывание анти-CTLA-4 антител с клетками, экспрессирующими CTLA-4. В примере 6 анализ на люциферазу и анализ на высвобождение ИЛ-2 применяли для определения способности анти-CTLA-4 антител активировать Т-клетки и возобновлять высвобождение ИЛ-2.

В некоторых вариантах осуществления антитела по данному изобретению способны усиливать или стимулировать активность Т-клеток *in vitro*, у субъекта с раком или у субъекта, инфицированного вирусом, таким как LCMV. В некоторых вариантах осуществления антитела по данному изобретению используют в комбинации со вторым терапевтическим агентом, таким как антитело ко второму Т-клеточному ингибитору, для усиления иммунного ответа и ингибирования роста опухоли у субъекта.

Указанные антитела, специфичные для CTLA-4, могут не содержать никаких дополнительных меток или фрагментов или они могут содержать метку или фрагмент, например, N-концевую или C-концевую метку или фрагмент. В одном варианте осуществления метка или фрагмент представляет собой биотин. В анализе связывания местоположение метки (если таковая имеется) может определять ориентацию пептида относительно поверхности, с которой связан этот пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентирован таким образом, что C-концевой участок пептида будет дистальным по отношению к поверхности. В одном варианте осуществления метка может быть радионуклидом, флуоресцентным красителем или меткой, обнаруживаемой с помощью MPT. В определенных вариантах осуществления такие меченые антитела можно применять в диагностических анализах, включая анализы визуализации.

Иллюстративные варианты осуществления данного изобретения

В одном аспекте данное изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывает человеческий белок 4 ассоциированный с цитотоксическими Т лимфоцитами (CTLA-4) и блокирует взаимодействие между hCTLA-4 и лигандами B7-1 и B7-2.

В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцирует активацию Т-клеток. В некоторых случаях Т-клетка является цитотоксической Т-клеткой. В некоторых случаях Т-клетка представляет собой инфильтрирующий опухоль лимфоцит.

В определенных вариантах осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с CTLA-4 обезьяны. В некоторых случаях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают клетки, экспрессирующие CTLA-4 обезьяны, с EC₅₀ менее 0,5 нМ.

В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают клетки, экспрессирующие hCTLA-4, с EC₅₀ менее 5 нМ, менее 1 нМ или менее 0,5 нМ.

В различных вариантах осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой полностью человеческое антитело.

В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурируют за связывание с эталонным антителом к CTLA-4 человека, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/298, 314/322, 330/338, 346/354, 362/370, 378/386, 394/402, 410/418, 426/434, 442/450, 458/466, 474/482 и 490/498.

В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом на CTLA-4 человека, что и эталонное антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/298, 314/322, 330/338, 346/354, 362/370, 378/386, 394/402, 410/418, 426/434, 442/450, 458/466, 474/482 и 490/498.

В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат:

(а) определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 458, 474 и 490; и

(b) CDR вариабельной области легкой цепи (LCVR), имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 466, 482 и 498.

В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR тяжелой и легкой цепи пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/298, 314/322, 330/338, 346/354, 362/370, 378/386, 394/402, 410/418, 426/434, 442/450, 458/466, 474/482 и 490/498.

В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 соответственно, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16; 20-22-24-28-30-32; 36-38-40-44-46-48; 52-54-56-60-62-64; 68-70-72-76-78-80; 84-86-88-92-94-96; 100-102-104-108-110-112; 116-118-120-124-126-128; 132-134-136-140-142-144; 148-150-152-156-158-160; 164-166-168-172-174-176; 180-182-184-188-190-192; 196-198-200-204-206-208; 212-214-216-220-222-224; 228-230-232-236-238-240; 244-246-248-252-254-256; 260-262-264-268-270-272; 276-278-280-284-286-288; 292-294-296-300-302-304; 308-310-312-300-302-304; 316-318-320-324-326-328; 332-334-336-340-342-344; 348-350-352-356-358-360; 364-366-368-372-374-376; 380-382-384-388-390-392; 396-398-400-404-406-408; 412-414-416-420-422-424; 428-430-432-436-438-440; 444-446-448-452-454-456; 460-462-464-468-470-472; 476-478-480-484-486-488; и 492-494-496-500-502-504.

В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/298, 314/322, 330/338, 346/354, 362/370, 378/386, 394/402, 410/418, 426/434, 442/450, 458/466, 474/482 и 490/498.

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который представляет собой человеческое, гуманизированное или химерное антитело. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, представлять собой антитело IgG1 или IgG4, такое как, например, человеческое IgG1 или IgG4. Константные области этих антител могут соответствовать константным областям дикого типа или константным областям, в которые были введены мутации.

В одном аспекте данное изобретение относится к мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле, имеющей первую антигенсвязывающую специфичность, которая специфично связывается с CTLA-4, и вторую антигенсвязывающую специфичность, которая специфично связывается со вторым эпитопом-мишенью.

В одном аспекте данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вышеуказанных вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В одном аспекте данное изобретение относится к выделенным полинуклеотидным молекулам и векторам, содержащим полинуклеотидные последовательности антител или их антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенной полинуклеотидной молекуле и/или к вектору, содержащему полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR антитела, как изложено в данном документе. В некоторых вариантах осуществления по данному изобретению предлагается выделенная полинуклеотидная молекула и/или вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, которая кодирует LCVR антитела, как изложено в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к клетке, экспрессирующей векторы, обсуждаемые выше или в данном документе.

В одном аспекте данное изобретение относится к способу для лечения заболевания или расстройства, которое поддается лечению путем антагонизации CTLA-4 путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества анти-CTLA-4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей такие антитела или антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых случаях заболевание или расстройство представляют собой хроническую вирусную инфекцию, вызванную вирусом, выбранным из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса гепатита С (ВГС), вируса гепатита В (ВГВ), вируса папилломы человека (ВПЧ), вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) и вируса иммунодефицита обезьян (SIV). В некоторых случаях заболевание или расстройство выбирают из группы, состоящей из рака крови, рака мозга, рака почки, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака простаты, рака молочной железы, рака кожи, рака шейки матки, рака почки, рака желудка, рака поджелудочной железы, печеночно-клеточного рака, рака костей, рака толстой кишки, немелкоклеточного рака легких, плоскоклеточного рака головы и шеи, колоректального рака, мезотелиомы, В-клеточной лимфомы и меланомы.

В одном аспекте данное изобретение относится к способам усиления иммунного ответа у субъекта, причем способ включает введение фармацевтической композиции, содержащей изолированное анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к способам ингибирования Т-регуляторных (T_{reg}) клеток у субъекта, включающим введение фармацевтической композиции, содержащей выделенное анти-CTLA-4 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к способам усиления

ния активации Т-клеток у субъекта, причем этот способ включает введение фармацевтической композиции, содержащей выделенное анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет заболевание или расстройство, выбранное из группы, состоящей из рака крови, рака головного мозга, почечно-клеточного рака (например, светлоклеточного рака почки), рака яичника, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака молочной железы (например, тройного негативного рака молочной железы), рака кожи, рака шейки матки, рака желудка, рака почки, рака поджелудочной железы, рака печени, рака костей, рака толстой кишки, немелкоклеточного рака легких, плоскоклеточного рака головы и шеи, колоректального рака, мезотелиомы, лимфомы (например, В-клеточной лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы) и меланомы. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет хроническую вирусную инфекцию, вызванную вирусом, выбранным из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса гепатита С (ВГС), вируса гепатита В (ВГВ), вируса папилломы человека (ВПЧ), вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) и вируса иммунодефицита обезьян (SIV). В некоторых вариантах осуществления указанное анти-CTLA-4 антитело вводят субъекту в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из группы, состоящей из ингибитора PD-1, ингибитора LAG3, антитела к опухолеспецифическому антигену, антитела к антигену инфицированных вирусом клеток, ингибитора PD-L1, ингибитора CD20, биспецифичного антитела против CD20 и CD3, диетической добавки, такой как антиоксидант, антагониста VEGF, противораковой вакцины, химиотерапевтического агента, цитотоксического агента, хирургического вмешательства, облучения, НПВП, кортикостероида и любой другой терапии, полезной для ослабления по меньшей мере одного симптома, связанного с заболеванием или расстройством.

В одном аспекте данное изобретение относится к способам ингибирования роста опухоли или опухолевой клетки у субъекта, включающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества анти-CTLA-4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей такие антитела или антигенсвязывающие фрагменты. В определенных вариантах осуществления опухоль является первичной или рецидивирующей. В определенных вариантах осуществления опухоль представляет собой развитую опухоль. В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется метастатическое заболевание и/или его лечили предшествующей терапией. В некоторых вариантах осуществления опухоль присутствует у субъекта с заболеванием или расстройством, выбранным из группы, состоящей из рака крови, рака мозга, почечно-клеточного рака, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака молочной железы, печеночно-клеточного рака, рака костей, рака толстой кишки, немелкоклеточного рака легких, плоскоклеточного рака головы и шеи, колоректального рака, мезотелиомы, лимфомы и меланомы. В некоторых вариантах осуществления указанное анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в виде одной или нескольких доз, при этом каждую дозу вводят через 1-12 недель после непосредственно предшествующей дозы. В некоторых вариантах осуществления указанное анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе от около 0,1 мг/кг массы тела до около 100 мг/кг массы тела субъекта. В определенных вариантах осуществления каждая доза включает от около 50 до около 1000 мг антитела. В некоторых вариантах осуществления указанное анти-CTLA-4 антитело вводят субъекту в комбинации с вторым терапевтическим агентом, выбранным из группы, состоящей из ингибитора PD-1, ингибитора LAG3, антитела к опухолеспецифическому антигену, ингибитора PD-L1, ингибитора CD20, биспецифичного антитела против CD20 и CD3, биологически активной добавки, такой как антиоксидант, антагониста VEGF, противораковой вакцины, химиотерапевтического агента, цитотоксического агента, хирургии, облучения, НПВП, кортикостероида и любой другой терапии, полезной для ослабления по меньшей мере одного симптома, связанного с заболеванием или расстройством. В одном варианте осуществления второй терапевтический агент представляет собой ингибитор PD-1, при этом ингибитор PD-1 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с PD-1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой REGN2810, ниволумаб или пембролизумаб. В некоторых вариантах осуществления указанное анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят подкожно, внутривенно, внутриопухолево, перитуморально, внутрикожно, внутривнутрибрюшинно, перорально, внутримышечно или внутривнутричерепно.

В одном аспекте данное изобретение относится к способам восстановления CTLA-4-опосредованного ингибирования активности Т-клеток, включающим контакт Т-клетки с анти-CTLA-4 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, как описано в данном документе. В одном варианте осуществления Т-клетка контактирует с анти-CTLA-4 антителом по данному изобретению в комбинации с анти-PD-1 антителом (например, REGN2810).

В одном аспекте данное изобретение относится к применению анти-CTLA-4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей такие антитела или антигенсвязывающие фрагменты, для лечения заболевания или расстройства, которое поддается лечению путем антагонизма CTLA-4. В некоторых случаях заболевание или расстройство является раком.

В одном аспекте данное изобретение относится к применению анти-CTLA-4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей такие антитела или антигенсвязывающие фрагменты, при изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, которое поддается лечению путем антагонизма CTLA-4. В некоторых случаях заболевание или расстройство является раком.

Антигенсвязывающие фрагменты антител

Если специально не указано иное, термин антитело, используемый в данном документе, следует понимать как охватывающий молекулы антитела, включающие две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина (т.е., полные молекулы антитела), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Термины "антигенсвязывающая часть антитела", "антигенсвязывающий фрагмент антитела" и тому подобное, используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, ферментативно полученный, синтетический или генно-инженерный полипептид или гликопротеин, который специфично связывает антиген с образованием комплекса. Термины "антигенсвязывающий фрагмент антитела или фрагмент антитела", используемые в данном документе, относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с CTLA-4. Фрагмент антитела может включать Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fv-фрагмент, dAb-фрагмент, фрагмент, содержащий CDR, или выделенный CDR. В некоторых вариантах осуществления термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептидному фрагменту мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антител с применением любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной генной инженерии, включая манипулирование и экспрессию переменных и (необязательно) константных доменов ДНК, кодирующих антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна из, например, коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаговых антител), или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и манипулировать химически или с помощью методов молекулярной биологии, например, для размещения одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают:

- (i) Fab-фрагменты;
- (ii) F(ab')₂ фрагменты;
- (iii) Fd-фрагменты;
- (iv) фрагменты Fv;
- (v) одноцепочечные молекулы Fv(scFv);
- (vi) фрагменты dAb; и
- (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную область, определяющую комплементарность (CDR), такую как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4.

Другие сконструированные молекулы, такие как доменно-специфичное антитело, однодоменные антитела, доменно-делеционные антитела, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.) малые модульные иммунофармацевтические препараты (SMTP - small modular immunopharmaceuticals) и переменные домены IgNAR акул также охватываются выражением "антигенсвязывающий фрагмент", как используется в данном документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая находится рядом или в рамке с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H, связанный с доменом V_L, домены V_H и V_L могут располагаться относительно друг друга в любом подходящем взаиморасположении. Например, переменная область может быть димерной и содержать V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L димеры. Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие примерные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела по данному изобретению, включают:

- (i) V_H-C_H1;
- (ii) V_H-C_H2;
- (iii) V_H-C_H3;
- (iv) V_H-C_H1 -C_H2;
- (v) V_H-C_H1 -C_H2-C_H3;
- (vi) V_H-C_H2-C_H3;
- (vii) V_H-C_L;

- (viii) V_L-C_H1 ;
- (ix) V_L-C_H2 ;
- (x) V_L-C_H3 ;
- (xi) $V_L-C_H1-C_H2$;
- (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$;
- (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$ и
- (xiv) V_L-C_L .

В любой конфигурации переменных и постоянных доменов, включая любую из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменные и постоянные домены могут быть или непосредственно связаны друг с другом, или могут быть связаны полной или частичной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или постоянными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по данному изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменного и постоянного доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (например, с помощью дисульфидной связи (связей)).

Как и в случае полных молекул антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифичными или мультиспецифичными (например, биспецифичными). Мультиспецифичный антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере два разных переменных домена, при этом каждый переменный домен способен специфично связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат мультиспецифического антитела, включая примерные форматы биспецифического антитела, раскрытые в данном документе, может быть адаптирован для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по данному изобретению с применением рутинных методов, доступных в данной области.

Получение человеческих антител

Способы получения человеческих антител у трансгенных мышей известны в данной области. Любые такие известные способы могут быть применены в контексте данного изобретения для получения человеческих антител, которые специфично связываются с CTLA-4.

Применяя технологию VELOCIMMUNE® (см., например, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любой другой известный способ получения моноклональных антител, сначала выделяют химерные антитела с высоким сродством к CTLA-4, имеющие переменную область человека и постоянную область мыши. Технология VELOCIMMUNE® включает в себя создание трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий переменные области тяжелой и легкой цепи человека, функционально связанные с локусами эндогенной постоянной области мыши, так что мышь вырабатывает антитело, содержащее переменную область человека и постоянную область мыши, в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующая переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяется и функционально связана с ДНК, кодирующей постоянные области тяжелой и легкой цепи человека. Затем ДНК экспрессируется в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

Обычно мышь VELOCIMMUNE® заражают интересующим антигеном, и лимфатические клетки (такие как В-клетки) выделяют у мышей, которые экспрессируют антитела. Лимфатические клетки могут быть слиты с линией клеток миеломы для получения линий клеток бессмертной гибридомы, и такие линии клеток гибридомы подвергаются скринингу и отбираются для идентификации линий клеток гибридомы, которые продуцируют антитела, специфичные к антигену представляющему интерес. ДНК, кодирующая переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, может быть выделена и связана с желательными изотипическими постоянными областями тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела может продуцироваться в клетке, такой как клетка CHO. Альтернативно, ДНК, кодирующая антигенспецифичное химерное антитело или переменные домены легкой и тяжелой цепей, может быть выделена непосредственно из антигенспецифичных лимфоцитов.

Первоначально выделяли химерные антитела с высоким сродством, имеющие человеческую переменную область и постоянную область мыши. Как и в экспериментальном разделе ниже, антитела характеризуются и отбираются по желательным характеристикам, включая аффинность, селективность, эпитоп и т. д. Постоянные области мыши заменяют желаемой человеческой постоянной областью для генерации полностью человеческого антитела по данному изобретению, например, дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4. В то время как выбранная постоянная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, характеристики высокоаффинной антигенсвязывающей и целевой специфичности находятся в переменной области.

Биоэквиваленты

Указанные антитела против CTLA-4 и фрагменты антител по данному изобретению охватывают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связывать CTLA-4. Такие варианты антитела и

фрагменты антител содержат одну или несколько добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по существу эквивалентна активности описанных антител. Аналогично, последовательности ДНК, кодирующие антитело по данному изобретению, охватывают последовательности, которые содержат одно или несколько добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которые по существу биоэквивалентны антителу или фрагменту антитела по данному изобретению.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и степень абсорбции которых не демонстрируют значительных различий при введении в одной и той же молярной дозе в аналогичных условиях эксперимента или однократной или многократной дозе. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции и, тем не менее, могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражаются в маркировке, то это не имеет существенного значения для достижения эффективных концентраций лекарств в организме, например, при хроническом применении, и считается с медицинской точки зрения незначительным для конкретного исследуемого лекарственного продукта.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если нет клинически значимых различий в их безопасности, чистоте или эффективности.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациента можно переключать один или несколько раз между эталонным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого увеличения риска побочных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или снижение эффективности по сравнению с продолжением терапии без такого переключения.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют посредством общего механизма или механизмов действия для состояния или условий применения в той степени, в которой такие механизмы известны.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована с помощью *in vivo* и/или *in vitro*. Меры биоэквивалентности включают, например:

(a) тест *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором концентрация антитела или его метаболитов измеряется в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функция времени;

(b) тест *in vitro*, который был коррелирован с данными о биологической доступности *in vivo* и достаточно обоснованно предсказывал их;

(c) тест *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряется как функция времени; и

(d) в хорошо контролируемом клиническом исследовании, которое устанавливает безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител по данному изобретению могут быть сконструированы, например, путем осуществления различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, несущественные для биологической активности, могут быть удалены или заменены другими аминокислотами, чтобы предотвратить образование ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать варианты антител, содержащие аминокислотные замены, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Анти-CTLA-4 антитела, содержащие варианты Fc

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения предложены анти-CTLA-4 антитела, содержащие Fc-домен, включающий одну или несколько мутаций, которые усиливают или уменьшают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH. Например, данное изобретение включает анти-CTLA-4 антитела, содержащие мутацию в области C_H2 или C_H3 Fc-домена, где мутация(и) увеличивает сродство Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, при этом pH находится в диапазоне от около 5,5 до около 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению периода полужизни антитела в сыворотке при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 и/или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация содержит модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 2591 (например, V2591) и 308F (напри-

мер, V308F); 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). В еще одном варианте осуществления модификация содержит модификацию 265A (например, D265A) и/или модификацию 297A (например, N297A).

Например, данное изобретение включает анти-CTLA-4 антитела, содержащие Fc-домен, содержащий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). В одном варианте осуществления данное изобретение включает анти-CTLA-4 антитела, содержащие Fc-домен, содержащий мутацию S108P в шарнирной области IgG4, для стимуляции стабилизации димера. Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций Fc-домена и других мутаций в вариабельных доменах антитела, раскрытых в данном документе, рассматриваются в объеме данного изобретения.

Данное изобретение также включает анти-CTLA-4 антитела, содержащие химерную константную область тяжелой цепи (C_H), при этом химерная область C_H содержит сегменты, полученные из областей C_H более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, антитела по данному изобретению могут содержать химерный участок C_H , содержащий часть или весь домен C_{H2} , полученный из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в сочетании с частью или всей частью C_{H3} домен, полученного из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. Согласно определенным вариантам осуществления антитела по данному изобретению содержат химерную область C_H , имеющую химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать аминокислотную последовательность верхнего шарнира (аминокислотные остатки в положениях с 216 по 227 согласно нумерации EU), полученную из области петли человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в сочетании с последовательностью нижней петли (аминокислотные остатки в положениях 228-236 согласно нумерации EU), полученные из шарнирной области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный шарнирный участок содержит аминокислотные остатки, полученные из верхнего шарнира человеческого IgG1 или человеческого IgG4, и аминокислотные остатки, полученные из нижнего шарнира человеческого IgG2. Антитело, содержащее химерную область C_H , как описано в данном документе, может в некоторых вариантах осуществления проявлять модифицированные эффекторные функции Fc без неблагоприятного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, патентная публикация США № 20140243504, раскрытие которой настоящим включено в качестве ссылки во всей своей полноте).

Биологические характеристики антител

Обычно антитела по данному изобретению функционируют путем связывания с CTLA-4. Данное изобретение включает анти-CTLA-4 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают растворимые мономерные или димерные молекулы CTLA-4 с высокой аффинностью. Например, данное изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают димерный CTLA-4 человека и обезьяны (например, при 25°C), с K_D менее чем около 20 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, как определено в примере 3 в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают мономерный CTLA-4 с K_D менее чем около 10 нМ, менее чем около 5 нМ, менее чем около 2 нМ или менее чем около 1 нМ, как измерено поверхностным плазмонным резонансом, например, с применением формата анализа, как определено в примере 3 в данном документе, или по существу аналогичного анализа.

Данное изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CTLA-4 с периодом диссоциативного полураспада ($t^{1/2}$), превышающим около 4 мин, как измерено поверхностным плазмонным резонансом при 25°C, например, с применением формата анализа, как определено в примере 3 в данном документе, или по существу аналогичного анализа. В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению связывают CTLA-4 с $t^{1/2}$, составляющим более чем около 5 мин, более чем около 10 мин, более чем около 15 мин, более чем около 20 мин, более чем около 30 мин, более чем около 40 мин, более чем около 100 мин, более чем около 200 мин, более чем около 300 мин или более чем около 500 мин, как измерено поверхностным плазмонным резонансом при 25°C, например, с применением формата анализа, как определено в примере 3 в данном документе (например, формат захвата МАт), или по существу аналогичного анализа.

Данное изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют связывание hCTLA-4 с hB7-1 (CD80) и/или hB7-2 (CD86) с IC_{50} менее чем около 320 нМ, как определяли с применением иммуноферментного анализа (ИФА), например, как продемонстрировано в примере 4, или по существу аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют связывание hCTLA-4 с B7-1 человека и/или B7-2 челове-

ка с IC_{50} менее 200 нМ, менее 100 нМ, менее 70 нМ, менее чем около 20 нМ, менее чем около 10 нМ, менее чем около 5 нМ, менее чем около 1 нМ или менее чем около 0,5 нМ, как измерено конкурентным сэндвич-ИФА, например, как определено в примере 4 в данном документе, или, по существу, аналогичным анализом.

Данное изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют связывание hCTLA-4 с B7-1 человека и/или B7-2 человека по меньшей мере на 85%, как измерено с помощью конкурентного сэндвич-ИФА, например как определено в примере 4 в данном документе, или по существу аналогичным анализом.

Данное изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с клеткой, экспрессирующей CTLA-4 человека, с EC_{50} менее чем около 6 нМ, как измерено с помощью электрохемилюминесцентного анализа, как определено в примере 5 в данном документе, или существенно сходным анализом. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с hCTLA-4-экспрессирующей клеткой с EC_{50} менее чем около 4 нМ, менее чем около 2 нМ, менее чем около 1 нМ или менее чем около 0,5 нМ, как измерено с помощью электрохемилюминесцентного анализа, например, с применением формата анализа, приведенного в примере 5, или, по существу, аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с hCTLA-4-экспрессирующей клеткой в соотношении, более чем в 10 раз превышающем связывание с контрольными клетками, в соотношении более чем в около 15 раз или при отношении более чем в около 20 раз выше связывания с контрольными клетками, как измерено с помощью электрохемилюминесцентного анализа, например, с применением формата анализа из примера 5, приведенного в данном документе, или по существу аналогичного анализа.

Данное изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с клеткой, экспрессирующей CTLA-4 обезьяны-яванца (*Сynomolgus*), с EC_{50} менее чем около 0,5 нМ, как измерено с помощью электрохемилюминесцентного анализа, как определено в примере 5 в данном документе или по существу аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с клеткой, экспрессирующей mfCTLA-4, с EC_{50} менее чем около 0,5 нМ или менее чем около 0,2 нМ, как измерено с помощью электрохемилюминесцентного анализа, например, с применением формата анализа, как определено в примере 5 в данном документе, или по существу аналогичного анализа.

Данное изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют CTLA-4-индуцированное подавление Т-клеток (блокируя взаимодействия CTLA-4/CD80 и CTLA-4/CD86) с EC_{50} менее 8 нМ, как измерено с помощью репортерного анализа люциферазы Т-клеток/АПК, как определено в примере 6 в данном документе, или по существу аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют CTLA-4-индуцированное подавление Т-клеток с EC_{50} менее чем около 6 нМ, менее чем около 5 нМ, менее чем около 3 нМ, менее чем около 2,5 нМ, или менее чем около 2 нМ, как измерено с помощью репортерного анализа люциферазы Т-клеток/АПК, например, с применением формата анализа, как определено в примере 6 в данном документе, или по существу аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют CTLA-4-индуцированное подавление Т-клеток как CTLA-4 человека, так и обезьяны.

Данное изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые устраняют опосредованное CTLA-4 ингибирование высвобождения ИЛ-2 (путем блокирования взаимодействий CTLA-4/CD80 и CTLA-4/CD86) с EC_{50} менее около 50 нМ, как измерено с помощью анализа высвобождения ИЛ-2 Т-клеток/АПК, как определено в примере 6, приведенном в данном документе, или по существу аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты восстанавливают опосредованное CTLA-4 ингибирование высвобождения ИЛ-2 с EC_{50} менее чем около 45 нМ, менее чем около 35 нМ, менее чем около 25 нМ или менее чем около 20 нМ согласно измерению, анализа высвобождения ИЛ-2 Т-клеток/АПК, например, с применением формата анализа, как определено в примере 6 в данном документе, или, по существу, аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют CTLA-4-индуцированное подавление Т-клеток и/или CTLA-4-опосредованное ингибирование высвобождения ИЛ-2 для CTLA-4 человека и обезьяны. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют CTLA-4-индуцированное подавление Т-клеток, как продемонстрировано продукцией ИЛ-2 со скоростью в 4-6 раз выше, чем наблюдается для антитела изотипического контроля.

В некоторых вариантах осуществления антитела по данному изобретению пригодны для ингибирования роста опухоли или задержки прогрессирования рака при профилактическом введении субъекту, нуждающемуся в этом, и могут увеличить выживаемость субъекта. Например, введение антитела по данному изобретению может привести к сокращению первичной опухоли и может предотвратить метастазирование или развитие вторичных опухолей. В определенных вариантах осуществления антитела по данному изобретению пригодны для ингибирования роста опухоли при терапевтическом введении субъекту, нуждающемуся в этом, и могут увеличить выживаемость субъекта. Например, введение терапевтически

эффективного количества антитела по данному изобретению субъекту может привести к сокращению и исчезновению развитой опухоли у субъекта. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько антител по данному изобретению вводят локально (внутриопухолево или перитуморально), что приводит к ингибированию роста опухоли в подвергшемся инъекции опухолевом очаге и в отдаленных опухолевых очагах (эффект абсцесса).

В различных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному рекомбинантному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с CTLA-4, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент проявляют одну или несколько из следующих характеристик:

(i) содержат HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 458, 474 и 490, или по существу аналогичной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности;

(ii) содержат LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 466, 482 и 498, или, по существу, аналогичной их последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности;

(iii) содержат домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 320, 336, 352, 368, 384, 400, 416, 432, 448, 464, 480 и 496, или, по существу, аналогичной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 328, 344, 360, 376, 392, 408, 424, 440, 456, 472, 488 и 504, или, по существу, аналогичную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности;

(iv) содержат домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 316, 332, 348, 364, 380, 396, 412, 428, 444, 460, 476 и 492, или, по существу, аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% и по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 318, 334, 350, 366, 382, 398, 414, 430, 446, 462, 478 и 494 или по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 324, 340, 356, 372, 388, 404, 420, 436, 452, 468, 484 и 500 или по существу аналогичная последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по крайней мере 99% идентичности последовательности; и домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 326, 342, 358, 374, 390, 406, 422, 438, 454, 470, 486 и 502, или, по существу, аналогичной их последовательности, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности;

(v) связывают димерный CTLA-4 человека и обезьяны с равновесной константой диссоциации связывания (K_D) менее чем около 20 нМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса при 25°C;

(vi) связывают димерный CTLA-4 человека и обезьяны с диссоциативным периодом полувыведения ($t^{1/2}$), превышающим около 4 мин, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса при 25°C;

(vii) блокируют связывание hCTLA-4 с hB7-1 (CD80) и/или hB7-2 (CD86) с IC_{50} менее чем около 320 нМ, как определено с применением анализа клеточной адгезии;

(viii) блокируют связывание hCTLA-4 с B7-1 человека и/или B7-2 человека по меньшей мере на 85%, как измерено с помощью теста сэндвич-ИФА;

(ix) связываются с клеткой, экспрессирующей CTLA-4 человека, с EC_{50} менее чем около 6 нМ, как измерено с помощью электрохемилюминесцентного анализа;

(x) связываются с hCTLA-4-экспрессирующей клеткой в соотношении более чем в 10 раз относительно связывания с контрольными клетками;

(xi) связываются с клеткой, экспрессирующей CTLA-4 обезьяны, с EC_{50} менее чем около 0,5 нМ, как измерено с помощью электрохемилюминесцентного анализа;

- (xii) блокируют CTLA-4-индуцированную регуляцию подавления Т-клеток с EC_{50} менее 8 нМ, как измерено анализом репортеров люциферазы Т-клеток/АПК;
- (xiii) блокируют CTLA-4-индуцированную регуляцию Т-клеток через CTLA-4 человека и обезьяны;
- (xiv) устраняют опосредованное CTLA-4 ингибирование высвобождения ИЛ-2 с EC_{50} менее чем около 50 нМ, как определено в анализе высвобождения ИЛ-2 Т-клеток/АПК;
- (xv) блокируют CTLA-4-индуцированное подавление Т-клеток и/или CTLA-4-опосредованное ингибирование высвобождения ИЛ-2 для CTLA-4 человека и обезьяны;
- (xvi) блокируют CTLA-4-индуцированное подавление Т-клеток, как продемонстрировано продукцией ИЛ-2 со скоростью в 4-6 раз выше, чем наблюдается для антитела изотипического контроля;
- (xvii) подавляют рост опухоли и увеличивают выживаемость у субъекта с раком и
- (xviii) являются полностью человеческими.

Указанные антитела по данному изобретению могут обладать одной или несколькими из вышеупомянутых биологических характеристик или любыми их комбинациями. Другие биологические характеристики антител по данному изобретению будут очевидны для специалиста в данной области из обзора данного раскрытия, включая рабочие примеры, приведенные в данном документе.

Видовая селективность и перекрестная реактивность между видами

Согласно некоторым вариантам осуществления данного изобретения анти-CTLA-4 антитела связываются с CTLA-4 человека, но не с CTLA-4 других видов. Альтернативно, анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению в определенных вариантах осуществления связываются с CTLA-4 человека и с CTLA-4 из одного или нескольких видов, не относящихся к человеку. Например, анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению могут связываться с человеческим CTLA-4 и могут связываться или не связываться, в зависимости от обстоятельств, с одним или несколькими из CTLA-4 мышей, крыс, морских свинок, хомяков, песчанок, свиней, кошек, собак, кроликов, коз, овец, коров, лошадей, верблюдов, макак-яванцев, мармозеток, макак-резус или шимпанзе. В определенных вариантах осуществления анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению могут связываться с CTLA-4 человека и яванца с одинаковым сродством или с различным сродством, но не связываться с CTLA-4 крысы и мыши.

Эпитопное картирование и родственные технологии

Данное изобретение включает анти-CTLA-4 антитела, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, обнаруженными в одном или нескольких доменах молекулы CTLA-4, включая, например, внеклеточный домен, трансмембранный домен и цитоплазматический домен. Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из одной смежной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных в любом из вышеупомянутых доменов молекулы CTLA-4 (например, линейный эпитоп домена). Альтернативно, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в любом или во всех вышеупомянутых доменах молекулы CTLA-4 (например, конформационный эпитоп).

Различные методики, известные специалистам в данной области, могут быть применены для определения того, взаимодействует ли антитело с одной или несколькими аминокислотами в полипептиде или белке. Иллюстративные методики включают, например, рутинные анализы перекрестной блокировки, такие как описанные в Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Другие методы включают сканирующий аланиновый мутационный анализ, анализ пептидов блотом (Reineke (2004) Methods Mol. Biol. 248: 443-63), кристаллографический анализ пептидов после расщепления и анализ ЯМР. Кроме того, могут быть применены такие методы, как удаление эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) Prot. Sci. 9: 487-496). Другим методом, который можно применять для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, является обмен водород/дейтерий, обнаруженный с помощью масс-спектрометрии. В общих чертах, способ обмена водород/дейтерий включает мечение дейтерием интересующего белка с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносится в воду, и протонообменные протоны внутри аминокислот, которые защищены комплексом антител, подвергаются обратному обмену дейтерий-водород с более медленной скоростью, чем протонообменные протоны внутри аминокислот, которые не являются частью интерфейса. В результате аминокислоты, которые образуют часть интерфейса белок/антитело, могут сохранять дейтерий и, следовательно, демонстрировать относительно большую массу по сравнению с аминокислотами, не включенными в интерфейс. После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, тем самым выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми антитело взаимодействует. См., например, Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267: 252-259; Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73: 256A-265A.

Термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, на который отвечают В и/или Т-клетки. В-клеточные эпитопы могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, расположенных рядом при сворачивании белка в третичную структуру. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворов, тогда как эпитопы, образованные путем третичного свертывания, обычно теряются при обработке денату-

рирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, а более обычно по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Профилирование с помощью модификаций (MAP - Modification-Assisted Profiling), также известное как профилирование антител на основе структуры антигена (ASAP - Antigen Structure-based Antibody Profiling), представляет собой метод, который классифицирует большое количество моноклональных антител (мАт), направленных против одного и того же антигена, в соответствии со сходством профиля связывания каждого антитела к химически или ферментативно модифицированным поверхностям антигена (см. US 2004/0101920, полностью включенный в данный документ в качестве ссылки). Каждая категория может отражать уникальный эпитоп, или существенно отличающийся от эпитопа, представленного другой категорией, или частично перекрывающийся с ним. Эта технология позволяет быстро фильтровать генетически идентичные антитела, так что характеристика может быть сфокусирована на генетически отличных антителах. При применении к скринингу гибридом MAP может облегчать идентификацию редких клонов гибридомы, которые продуцируют мАт, имеющие желаемые характеристики. MAP может применяться для сортировки антител по данному изобретению на группы антител, связывающих разные эпитопы.

В некоторых вариантах осуществления анти-CTLA-4 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают эпитоп в любом одном или нескольких регионах, приведенных в качестве примера в CTLA-4, или в его природной форме, которая приведена в SEQ ID NO: 505, или в полученной рекомбинантным путем, или в его фрагменте.

Данное изобретение включает анти-CTLA-4 антитела, которые связываются с тем же эпитопом или частью эпитопа, что и любое из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе в табл. 1, или антитело, имеющее последовательности CDR любого из иллюстративных антител, описанных в табл. 1. Аналогично, данное изобретение также включает анти-CTLA-4 антитела, которые конкурируют за связывание с фрагментом CTLA-4 или CTLA-4 с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе в табл. 1, или антитела, имеющие CDR последовательности любого из иллюстративных антител описанных в табл. 1. Например, данное изобретение включает анти-CTLA-4 антитела, которые перекрестно конкурируют за связывание с CTLA-4 с одним или несколькими антителами, приведенными в качестве примера в данном документе (например, H1H19303P или H1H19319P2).

Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное анти-CTLA-4 антитело, или конкурирует за него, применяя рутинные методы, известные в данной области. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное анти-CTLA-4 антитело по данному изобретению, эталонному антителу позволяют связываться с белком или пептидом CTLA-4 в условиях насыщения. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой CTLA-4. Если тестируемое антитело способно связываться с CTLA-4 после связывания с насыщением с эталонным анти-CTLA-4 антителом, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, по сравнению с эталонным анти-CTLA-4 антителом. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с белком CTLA-4 после связывания с насыщением с эталонным анти-CTLA-4 антителом, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, с которым связывается эталонное анти-CTLA-4 антитело по данному изобретению.

Чтобы определить, конкурирует ли антитело за связывание с эталонным анти-CTLA-4 антителом, описанная выше методика связывания выполняется в двух ориентациях: в первой ориентации эталонному антителу позволяют связываться с белком CTLA-4 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой CTLA-4; во второй ориентации тестируемому антителу позволяют связываться с молекулой CTLA-4 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой CTLA-4. Если в обеих ориентациях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой CTLA-4, то делается вывод, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с CTLA-4. Как будет понятно специалисту в данной области, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, необязательно может связываться с идентичным эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела, связывая перекрывающийся или соседний эпитоп.

Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждое конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. То есть 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990 50: 1495-1502). Альтернативно, два антитела имеют один и тот же эпитоп, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

Затем можно провести дополнительные рутинные эксперименты (например, мутацию пептидов и анализ связывания), чтобы подтвердить, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тести-

руемого антитела связано со связыванием с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или то, что стерическое блокирование (или другое явление) является причиной отсутствия наблюдаемого связывания. Эксперименты такого рода могут быть выполнены с применением ИФА, RIA (radioimmunoassay), поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области.

Иммуноконъюгаты

Данное изобретение относится к человеческому анти-CTLA-4 моноклональному антителу, конъюгированному с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгатом"), таким как цитотоксин или химиотерапевтическое средство для лечения рака. Используемый в данном документе термин "иммуноконъюгат" относится к антителу, которое химически или биологически связано с цитотоксином, радиоактивным агентом, цитокином, интерфероном, мишенью или репортерным фрагментом, ферментом, токсином, пептидом или белком или терапевтическим агентом. Антитело может быть связано с цитотоксином, радиоактивным агентом, цитокином, интерфероном, мишенью или репортерным фрагментом, ферментом, токсином, пептидом или терапевтическим агентом в любом месте вдоль молекулы, если оно способно связывать свою мишень. Примеры иммуноконъюгатов включают конъюгаты антитело-лекарственное средство и слитые белки антитело-токсин. В одном варианте осуществления агент может представлять собой второе антитело к CTLA-4. В определенных вариантах осуществления указанное антитело может быть конъюгировано с агентом, специфичным для опухолевой клетки или клетки, инфицированной вирусом. В одном варианте осуществления указанное антитело конъюгировано с агентом, специфичным для Т-клетки. Тип терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с анти-CTLA-4 антителом и будет учитывать состояние, подлежащее лечению, и желаемый терапевтический эффект, который должен быть достигнут. Примеры подходящих агентов для образования иммуноконъюгатов известны в данной области; см., например, WO 05/103081.

Мультиспецифичные антитела

Указанные антитела по данному изобретению могут быть моноспецифичными, биспецифичными или мультиспецифичными. Мультиспецифичные антитела могут быть специфичными для разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные для более чем одного целевого полипептида. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22: 238-244.

В одном аспекте данное изобретение включает мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы или их антигенсвязывающие фрагменты, при этом одна специфичность иммуноглобулина специфична к внеклеточному домену CTLA-4 или его фрагменту, а другая специфичность иммуноглобулина специфична к внеклеточному домену CTLA-4 или второй терапевтической мишени или конъюгирована с терапевтическим фрагментом.

Любая из мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул по данному изобретению или их варианты могут быть сконструированы с применением стандартных молекулярно-биологических методов (например, рекомбинантная ДНК и технологии экспрессии белка), как будет известно специалисту в данной области.

В некоторых вариантах осуществления антитела, специфичные к CTLA-4, генерируются в биспецифичном (биспецифическом) формате, в котором вариабельные области, связывающиеся с различными доменами CTLA-4, связаны друг с другом для придания двухдоменной специфичности в пределах одной связывающей молекулы. Правильно спроектированная биспецифичность может повысить общую эффективность ингибирования CTLA-4 за счет увеличения как специфичности, так и авидности связывания. Вариабельные области со специфичностью для отдельных доменов (например, сегментов N-терминального домена) или которые могут связываться с различными регионами в пределах одного домена, спарены на структурном каркасе, который позволяет каждой области связываться одновременно с отдельными эпитопами или с разными областями в пределах одного домена. В одном примере для биспецифичной молекулы, вариабельные области тяжелой цепи (V_H) из связывающей молекулы со специфичностью к одному домену рекомбинируют с вариабельными областями легкой цепи (V_L) из серии связывающих молекул со специфичностью ко второму домену, для идентификации не родственных V_L партнеров, которые могут быть в паре с оригинальным V_H , не нарушая оригинальную специфичность для этого V_H . Таким образом, один сегмент V_L (например, V_{L1}) можно объединить с двумя разными доменами V_H (например, V_{H1} и V_{H2}) и сгенерировать биспецифичное соединение, состоящее из двух связывающих плеч (V_{H1} - V_{L1} и V_{H2} - V_{L1}). Использование одного сегмента V_L снижает сложность системы и, таким образом, упрощает и повышает эффективность процессов клонирования, экспрессии и очистки, применяемых для создания биспецифичных молекул (см., например, USSN 13/022759 и US 2010/0331527).

Альтернативно, антитела, которые связывают более одного домена и вторую мишень, например, но не ограничиваясь, например, вторым другим анти-CTLA-4 антителом, могут быть получены в биспецифичном формате с применением описанных методик, описанных в данном документе, или других методик, известных специалистам в данной области. Вариабельные области антитела, связывающиеся с различными областями, могут быть связаны вместе с вариабельными областями, которые связываются с соответствующими сайтами, например, на внеклеточном домене CTLA-4, для придания двойной анти-

генной специфичности в пределах одной связывающей молекулы. Надлежащим образом разработанные биспецифические молекулы такого рода выполняет двойную функцию. Вариабельные области со специфичностью для внеклеточного домена комбинируют с вариабельной областью со специфичностью вне внеклеточного домена и спаривают на структурном каркасе, который позволяет каждой вариабельной области связываться с отдельным антигеном.

Иллюстративный формат биспецифичных антител, который можно применять в контексте данного изобретения, включает использование первого домена иммуноглобулина (Ig) C_H3 и второго Ig C_H3 домена, при этом первый и второй домены Ig C_H3 отличаются друг от друга по меньшей мере на одну аминокислоту, и при этом по меньшей мере одно отличие в аминокислотах снижает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифичным антителом, без разницы в аминокислотах. В одном варианте осуществления первый домен Ig C_H3 связывает белок А, а второй домен Ig C_H3 содержит мутацию, которая уменьшает или устраняет связывание белка А, такую как модификацию H95R (по нумерации экзонов IMGT; H435R по нумерации EU). Второй C_H3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (IMGT; Y436F по EU). Другие модификации, которые могут быть найдены во втором C_H3, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I по EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае антител IgG4. Вариации формата биспецифичных антител, описанных выше, рассматриваются в объеме данного изобретения.

Другие иллюстративные биспецифичные форматы, которые можно применять в контексте данного изобретения, включают, без ограничения, например, биспецифичные форматы на основе scFv или диатела, слияния IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадруму, выступы в отверстия, обычную легкую цепь (например, общую легкую цепь с выступами и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)тела, лейциновую молнию, дуотела (Duobody), IgG1/IgG2, двойного действия Fab (DAF)-IgG и биспецифичные форматы Mab² (см., например, Klein et al., 2012, Мат 4:6, 1-11 и ссылки, приведенные в нем, для обзора вышеизложенных форматов). Биспецифичные антитела также могут быть сконструированы с применением конъюгации пептид/нуклеиновая кислота, например, при этом неприродные аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью применяются для генерирования сайт-специфичных конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем самоорганизуются в мультимерные комплексы с определенной композицией, валентностью и геометрией. (См., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Терапевтическое введение и составы

Данное изобретение относится к терапевтическим композициям, содержащим анти-CTLA-4 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению. Терапевтические композиции в соответствии с данным изобретением будут вводиться с подходящими носителями, эксципиентами и другими агентами, которые включены в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и тому подобного. Множество подходящих составов можно найти в рецептуре, известной всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Истон, Пенсильвания. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTINTM), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза антитела может варьироваться в зависимости от возраста и размера подлежащего введению субъекта, целевого заболевания, состояний, пути введения и тому подобного. Когда антитело по данному изобретению применяется для лечения заболевания или расстройства у взрослого пациента или для предотвращения такого заболевания, предпочтительно вводить антитело по данному изобретению обычно в однократной дозе от около 0,1 до около 60 мг/кг массы тела, более предпочтительно от около 5 до около 60, от около 20 до около 50, от около 10 до около 50, от около 1 до около 10 или от около 0,8 до около 11 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния, частота и продолжительность лечения могут быть скорректированы. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению можно вводить в виде начальной дозы, по меньшей мере, от около 0,1 мг до около 800 мг, от около 1 до около 500 мг, от около 5 до около 300 мг или около 10 до около 200 мг, до около 100 мг или до около 50 мг. В некоторых вариантах осуществления за начальной дозой может следовать введение второй или множества последующих доз антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, которое может быть приблизительно таким же или меньшим, чем количество начальной дозы, при этом последующие дозы разделяются не менее чем 1-3 днями; не менее чем одной неделей, не менее чем 2 неделями; не менее чем 3 неделями; не менее чем 4 неделями; не менее чем 5 неделями; не менее чем 6 неделями; не менее чем 7 неделями; не менее чем 8 неделями; не менее чем 9 неделями; не менее чем 10 неделями; не менее чем 12 неделями; или по меньшей мере 14 неделями.

Известны различные системы доставки, и их можно применять для введения фармацевтической композиции по данному изобретению, например инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецептором эндоцитоз (см., например, Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262: 4429-4432). Способы введения включают, но не ограничиваются ими, внутрикожный, трансдермальный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и оральный пути. Композицию можно вводить любым удобным путем, например путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизисто-кожные покровы (например, слизистой оболочки полости рта, слизистой оболочки прямой кишки и кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или локальным. Фармацевтическая композиция также может быть доставлена в везикуле, в частности в липосоме (см., например, Langer (1990) Science 249:1527-1533).

Применение наночастиц для доставки антител по данному изобретению также рассматривается в данном документе. Наночастицы, конъюгированные с антителами, можно применять как для терапевтического, так и для диагностического применения. Наночастицы, конъюгированные с антителами, и способы их приготовления и применения подробно описаны Arruebo, M., et al., 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" in J. Nanomat. Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389), включенной в данный документ посредством ссылки. Наночастицы могут быть разработаны и конъюгированы с антителами, содержащимися в фармацевтических композициях, для нацеливания на опухолевые клетки или аутоиммунные клетки тканей или клетки, инфицированные вирусом. Наночастицы для доставки лекарственного средства также описаны, например, в US 8257740 или US 8246995, каждая из которых включена в данный документ в полном объеме.

В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления может применяться насос. В другом варианте могут быть применены полимерные материалы. В еще одном варианте осуществления система с контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от мишени композиции, что требует лишь доли системной дозы.

Препараты для инъекций могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутриопухолевых, перитуморальных, внутрикожных, внутричерепных, внутрибрюшинных и внутримышечных инъекций, капельных вливаний и т. д. Эти инъекционные препараты могут быть получены общеизвестными способами. Например, препараты для инъекций могут быть приготовлены, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно применяемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций имеются, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные агенты и т.д. Которые могут применяться в сочетании с подходящим солюбилизующим агентом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтилен (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды применяются, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно применять в сочетании с солюбилизующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Приготовленная таким образом инъекция предпочтительно заполняется в соответствующую ампулу.

Фармацевтическую композицию по данному изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, стержнеподобное устройство для доставки легко находит применение при доставке фармацевтической композиции по данному изобретению. Такое стержнеподобное устройство доставки может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом стержнеподобном устройстве для доставки обычно применяется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция внутри картриджа введена и картридж пуст, пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Стержнеподобное устройство для доставки затем может быть повторно применено. В одноразовом стержнеподобном устройстве для доставки нет сменного картриджа. Скорее, одноразовое стержнеподобное устройство для доставки поставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре внутри устройства. Как только резервуар опорожняется от фармацевтической композиции, все устройство выбрасывается.

Многочисленные многоразовые стержнеподобные и автоинжекторные устройства доставки находят применение в подкожной доставке фармацевтической композиции по данному изобретению. Примеры включают, но не ограничиваются ими, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), стержнеподобное устройство DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), стержнеподобное устройство HUMALOG MIX 75/25™, стержнеподобное устройство HUMALOG™, стержнеподобное устройство HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген,

Дания), стержнеподобное устройство BD™ (Becton Dickinson, Франклин Лейке, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия) и другие. Примеры одноразовых стержнеподобных устройств для доставки, имеющих применение для подкожной доставки фармацевтической композиции по данному изобретению, включают, но не ограничиваются ими, стержнеподобное устройство SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Саузенд Оакс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, LP) и стержнеподобное устройство HUMIRA™ (Abbott Labs, Эбботт парк, Иллиной), если назвать только несколько.

Преимущественно, фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в виде дозированных форм в стандартной дозе, подходящей для дозы активного ингредиента. Такие лекарственные формы в разовой дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося антитела обычно составляет от около 5 до около 500 мг на лекарственную форму в стандартной дозе; особенно в форме инъекций, предпочтительно, чтобы антитело содержалось в количестве от около 5 до около 100 мг и от около 10 до около 250 мг для других лекарственных форм.

Терапевтическое применение указанных антител

Указанные антитела по данному изобретению пригодны, среди прочего, для лечения, профилактики и/или ослабления любого заболевания или нарушения, связанного с или опосредованного экспрессией, передачей сигналов или активностью CTLA-4, или излечимого путем блокирования взаимодействия между CTLA-4 и лигандами CTLA-4 B7-1/CD80 и/или B7-2/CD86, или ингибирования активности и/или передачи сигналов CTLA-4 иным образом. Одно или несколько антител по данному изобретению можно вводить для облегчения, предотвращения или уменьшения тяжести одного или нескольких симптомов или состояний заболевания или расстройства.

Например, данное изобретение относится к способам лечения рака (ингибирования роста опухоли) и/или вирусных инфекций путем введения анти-CTLA-4 антитела (или фармацевтической композиции, содержащей анти-CTLA-4 антитело), как описано в данном документе, пациенту, нуждающемуся в таком лечении, и анти-CTLA-4 антитела (или фармацевтической композиции, содержащей анти-CTLA-4 антитело) для применения при лечении рака (ингибировании роста опухоли) и/или вирусных инфекций. Указанные антитела по данному изобретению пригодны для лечения, профилактики и/или ослабления заболевания или расстройства или состояния, такого как рак или вирусная инфекция, и/или для ослабления по меньшей мере одного симптома, связанного с таким заболеванием, расстройством или состоянием. В контексте способов лечения, описанных в данном документе, анти-CTLA-4 антитело можно вводить в виде монотерапии (т.е., в качестве единственного терапевтического агента) или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами (примеры которых описаны в другом месте в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитела, описанные в данном документе, пригодны для лечения субъектов, страдающих первичным или рецидивирующим раком, включая, но не ограничиваясь этим, рак крови, рак мозга (например, мультиформная глиобластома), почечно-клеточная карцинома (например, светлоклеточный рак почки), рак яичников, рак мочевого пузыря, рак простаты, рак молочной железы (например, тройной негативный рак молочной железы), рак почки, рак шейки матки, рак кожи, рак печени, рак желудка, рак поджелудочной железы, гепатоцеллюлярная карцинома, рак кости, рак толстой кишки, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный рак головы и шеи, колоректальный рак, мезотелиома и меланома.

Используемый в данном документе термин "рак крови" включает гематологическое злокачественное новообразование, которое поражает кровь, костный мозг, лимфу или лимфатическую систему. Как таковой, этот термин включает злокачественные образования клеток из лимфоидных и миелоидных клеточных линий. Линия миелоидных клеток обычно продуцирует гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и тучные клетки; линия лимфоидных клеток продуцирует В, Т, NK и плазматические клетки. Термин, следовательно, включает злокачественные опухоли вышеупомянутых клеток, а именно, лимфомы, миеломы, лимфоидные лейкозы и миелогенные лейкозы. Примеры включают, но не ограничиваются ими, острый лимфобластный лейкоз, острый миелогенный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, острый моноцитарный лейкоз, лимфомы Ходжкина, неходжкинские лимфомы (например, В-клеточная лимфома, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома) и миелома (в том числе множественная миелома).

Указанные антитела могут применяться для лечения ранней или поздней стадии симптомов рака. В одном варианте осуществления указанное антитело или его фрагмент по данному изобретению можно применять для лечения прогрессирующего или метастатического рака. Указанные антитела пригодны для уменьшения или ингибирования или сокращения роста опухолей как солидных/твердых опухолей, так и рака крови. В некоторых вариантах осуществления лечение антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по данному изобретению приводит к регрессии более 40%, регрессии более 50%, регрессии более 60%, регрессии более 70%, регрессии более 80% или более чем 90% регрессии опухоли у

субъекта. В определенных вариантах осуществления антитела можно применять для предотвращения рецидива опухоли. В определенных вариантах осуществления антитела пригодны для увеличения выживаемости без прогрессирования или общей выживаемости у субъекта с раком. В некоторых вариантах осуществления антитела пригодны для снижения токсичности вследствие химиотерапии или лучевой терапии при поддержании долгосрочной выживаемости у пациента, страдающего от рака. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько антител по данному изобретению вводят локально в одно или несколько опухолевых очагов (внутриопухолево или перитуморально) и приводят к ингибированию роста опухоли в инъецированной опухоли, а также в одной или нескольких соседних или отдаленных опухолях у субъекта (абскопальный (abscopal) эффект).

В определенных вариантах осуществления антитела по данному изобретению пригодны для лечения субъектов, страдающих хронической вирусной инфекцией. В некоторых вариантах осуществления антитела по данному изобретению пригодны для снижения титров вируса у хозяина и/или для восстановления истощенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или его фрагмент по данному изобретению можно применять для лечения хронической вирусной инфекции вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCMV). В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению можно вводить в терапевтической дозе пациенту с инфекцией вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) или вирусом папилломы человека (HPV) или вирусом гепатита В/С (ВГВ/ВГС). В связанном варианте осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению можно применять для лечения инфекции, вызванной вирусом иммунодефицита обезьян (SIV) у субъекта-обезьяны, такого как яванский макак.

В некоторых вариантах осуществления блокирующее антитело по данному изобретению можно вводить в терапевтически эффективном количестве субъекту, страдающему от рака или вирусной инфекции.

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько антител по данному изобретению вводят локально в опухоль или вблизи опухолевого очага (внутриопухолево или перитуморально) у субъекта с раком, чтобы минимизировать системное воздействие и предотвратить/ослабить токсичность вследствие системного воздействия антитела.

В данном документе также предполагается профилактически применять одно или несколько антител по данному изобретению для пациентов с риском развития заболевания или расстройства, такого как рак и вирусная инфекция.

В дополнительном варианте осуществления данного изобретения данные антитела применяют для приготовления фармацевтической композиции для лечения пациентов, страдающих от рака или вирусной инфекции. В другом варианте осуществления данного изобретения данные антитела применяются в качестве дополнительной терапии любым другим агентом или любой другой терапией, известной специалистам в данной области, пригодной для лечения рака или вирусной инфекции.

Комбинированные терапии и составы

Комбинированная терапия может включать анти-CTLA-4 антитело по данному изобретению и любое дополнительное терапевтическое средство, которое может быть преимущественно объединено с антителом по данному изобретению или с биологически активным фрагментом антитела по данному изобретению.

Указанные антитела по данному изобретению могут быть синергетически объединены с одним или несколькими противораковыми лекарственными средствами или терапией, применяемой для лечения или ингибирования рака, включая, например, рак крови, рак мозга (например, мультиформная глиобластома), почечно-клеточный рак, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак печени, рак кости, рак кожи, рак шейки матки, рак желудка, рак почки, рак толстой кишки, немелкоклеточный рак легкого, чешуйчатую карцинома головы и шеи, колоректальный рак, мезотелиома и меланома. В данном документе предполагается применять анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению в сочетании с иммуностимулирующей и/или иммуно-поддерживающей терапией для ингибирования роста опухоли и/или повышения выживаемости раковых пациентов. Иммуностимулирующая терапия включает прямую иммуностимулирующую терапию для увеличения активности иммунных клеток путем "отпуска тормоза" на подавленных иммунных клетках или "нажатия на акселератор" для активации иммунного ответа. Примеры включают нацеливание на другие рецепторы контрольной точки, вакцинацию и адъюванты. Иммуноподдерживающие условия могут увеличивать антигенность опухоли, способствуя гибели иммуногенных клеток, воспалению или иметь другие косвенные эффекты, которые стимулируют противоопухолевый иммунный ответ. Примеры включают облучение, химиотерапию, антиангиогенные средства и хирургическое вмешательство.

В различных вариантах осуществления одно или несколько антител по данному изобретению можно применять в комбинации с ингибитором PD-1 (например, антитело против PD-1, такое как ниволумаб, пембролизумаб, пидилизумаб, BGB-A317 или REGN2810), ингибитор PD-L1 (например, антитело против PD-L1, такое как авелумаб, атезолизумаб, дурвалумаб, MDX-1105 или REGN3504), ингибитор LAG3, ингибитор TIM3, ингибитор BTLA, ингибитор TIGIT, ингибитор CD47, ингибитор CD28, ингибитор

CSF1R, ингибитор CXCR, ингибитор CCR4, ингибитор CCR8, ингибитор CD40, ингибитор OX40, ингибитор GITR, антагонист другого ко-ингибитора или лиганда Т-клеток (например, антитело к CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 или VISTA), ингибитор индолеамин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагонист фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), например, "VEGF-Трап", такой как афлиберцепт или другой VEGF-ингибирующий слитый белок, как указано в патенте США 7087411, или анти-VEGF-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, бевацизумаб или ранибизумаб) или низкомолекулярный ингибитор киназы рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб), ингибитор Ang2 (например, несвакумаб), ингибитор трансформирующего фактора роста бета (TGFP), ингибитор рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, эрлотиниб, цетуксимаб), ингибитор CD20 (например, антитело против CD20, такое как ритуксимаб), антитело к опухолеспецифическому антигену, [например, CA9, CA125, меланома-ассоциированный антиген 3 (MAGE3), карциноэмбриональный антиген (CEA), виментин, опухолевый M2-РК, простатспецифичной антиген (PSA), муцин-1, MART-1 и CA19-9], вакцина (например, Bacillus Calmette-Guerin, противораковая вакцина), адъювант для усиления презентации антигена (например, Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), биспецифичное антитело (биспецифичное антитело CD3×CD20 или биспецифичное антитело PSMA×CD3), цитотоксин, химиотерапевтическое средство (например, дакарбазин, темозоломид, циклофосфамид, доцетаксел, доксорубин, даунорубин, цисплатин, карбоплатин, гемцитабин, метотрексат, митоксантрон, оксалиплатин, паклитаксел, и винкристин), циклофосфамид, хирургическое вмешательство, лучевая терапия, ингибитор ИЛ-6R (например, сарилумаб), ингибитор ИЛ-4R (например, дупилумаб), ингибитор ИЛ-10, цитокин, такой как ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-21 и ИЛ-15, конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC - antibody-drug conjugate) (например, анти-CD19-DM4 ADC и анти-DS6-DM4 ADC), противовоспалительное лекарственное средство (например, кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные препараты), диетическая добавка, такая как антиоксиданты или любая другая терапия для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению можно применять в комбинации с противораковыми вакцинами, включая вакцины на дендритных клетках, онколитические вирусы, вакцины против опухолевых клеток и т.д., для усиления противоопухолевого ответа. Примеры противораковых вакцин, которые можно применять в комбинации с анти-CTLA-4 антителами по данному изобретению, включают вакцину MAGE3 для лечения меланомы и рака мочевого пузыря, вакцину MUC1 для лечения рака молочной железы, EGFRv3 (например, риндопепимут (Rindoperimut)) для лечения рака головного мозга (включая мультиформную глиобластому) или ALVAC-CEA (при случаях CEA+ рака).

В некоторых вариантах осуществления анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению можно вводить в сочетании с лучевой терапией в способах для генерирования долговременных противоопухолевых ответов и/или повышения выживаемости пациентов с онкологическим заболеванием (раком). В некоторых вариантах осуществления анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению можно вводить до, одновременно или после введения лучевой терапии больному раком. Например, лучевую терапию можно вводить в одной или нескольких дозах опухолевых очагов с последующим введением одной или нескольких доз анти-CTLA-4 антител по данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления лучевая терапия может быть введена локально для опухолевого поражения для усиления локальной иммунореспонсивности опухоли пациента (адъювинирующее излучение) и/или для уничтожения опухолевых клеток (аблятивное излучение) с последующим системным введением анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению. Например, внутрочерепное облучение можно вводить пациенту с раком головного мозга (например, мультиформная глиобластома) в сочетании с системным введением анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению можно вводить в сочетании с лучевой терапией и химиотерапевтическим агентом (например, темозоломидом) или антагонистом VEGF (например, афлиберцептом). В некоторых вариантах осуществления анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению можно вводить в сочетании с лучевой терапией и химиотерапевтическим агентом (например, темозоломидом) или ингибитором PD-1 (например, анти-PD-1 антителом, таким как REGN2810, ниволумаб или пембролизумаб).

В некоторых вариантах осуществления анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению можно вводить в комбинации с одним или несколькими противовирусными лекарственными средствами для лечения хронической вирусной инфекции, вызванной LCMV, ВИЧ, ВПЧ, ВГВ или ВГС. Примеры противовирусных лекарственных средств включают, но не ограничиваются ими, зидовудин, ламивудин, абакавир, рибавирин, лопинавир, эфавиренц, кобицистат, тенофовир, рилпивириин и кортикостероиды.

Дополнительный терапевтически активный агент(ы)/компонент(ы) можно вводить до, одновременно или после введения анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению. Для целей данного раскрытия такие схемы введения считаются введением анти-CTLA-4 антитела "в сочетании" со вторым терапевтически активным компонентом.

Дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить субъекту до введения анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению. Например, первый компонент может считаться введенным до введения второго компонента, если первый компонент вводится за 1 неделю, за 72, за 60, за 48, за

36, за 24, за 12 до, за 6, за 5, за 4, за 3, за 2, за 1 ч, за 30, за 15, за 10, за 5 мин до или менее чем за 1 мин до введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить субъекту после введения анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению. Например, первый компонент может считаться введенным после второго компонента, если первый компонент вводится через 1, через 5, через 10, через 15, через 30 мин, через 1, через 2 ч после, Через 3, через 4, через 5, через 6, через 12, через 24, через 36, через 48, через 60, через 72 ч после введения второго компонента. В еще других вариантах осуществления дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить субъекту одновременно с введением анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению. Одновременное введение для целей данного изобретения включает, например, введение анти-CTLA-4 антитела и дополнительного терапевтически активного компонента субъекту в одной лекарственной форме (например, в совместном препарате), или в отдельных лекарственных формах, вводимых субъекту в течение около 30 мин или менее друг после друга. При введении в отдельных дозированных формах каждую дозированную форму можно вводить одним и тем же путем (например, и анти-CTLA-4 антитело, и дополнительный терапевтически активный компонент могут вводиться внутривенно, подкожно и т. д.); альтернативно, каждая лекарственная форма может вводиться другим путем (например, анти-CTLA-4 антитело можно вводить внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить подкожно). В любом случае введение компонентов в одной дозировке, в отдельных дозированных формах одним и тем же путем или в отдельных дозированных формах разными путями - все считается одновременным введением для целей данного раскрытия. Для целей данного изобретения введение анти-CTLA-4 антитела до, одновременно или после (как эти термины определены в данном документе выше) введения дополнительного терапевтически активного компонента считается введением анти-CTLA-4 антитела в сочетании с дополнительным терапевтически активным компонентом).

Данное изобретение включает фармацевтические композиции, в которых анти-CTLA-4 антитело по данному изобретению смешано с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами(ами), как описано в другом месте в данном документе, с применением различных комбинаций доз.

В иллюстративных вариантах осуществления, в которых анти-CTLA-4 антитело по данному изобретению вводят в комбинации с ингибитором PD-1 (например, антитело против PD-1, как описано в патенте США 2015/0203579, включенном в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), включая введение совместных составов, содержащих анти-CTLA-4 антитело и ингибитор PD-1, отдельные компоненты можно вводить субъекту и/или совместно готовить с применением различных комбинаций доз. Таким образом, данное изобретение включает комбинацию (i) анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению и (ii) ингибитора PD-1 (например, антитела против PD-1, как описано в патенте США 2015/0203579, включенного в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте), для одновременного, раздельного и/или последовательного применения при лечении рака или вирусных инфекций. Например, анти-CTLA-4 антитело и ингибитор PD-1 (например, анти-PD-1 антитело) каждое/ый могут вводиться субъекту и/или содержаться в совместной композиции в количестве, выбранном из группы, состоящей из 0,01 мг/кг, 0,02 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,04 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,9 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3,0 мг/кг, 3,5 мг/кг, 4,0 мг/кг, 4,5 мг/кг, 5,0 мг/кг, 6,0 мг/кг, 7,0 мг/кг, 8,0 мг/кг, 9,0 мг/кг и 10,0 мг/кг. В одном варианте осуществления указанное анти-CTLA-4 антитело и ингибитор PD-1 (например, антитело против PD-1) каждое/ый может вводиться субъекту и/или содержаться в совместной композиции в количестве от около 50 мг до около 600 мг, например, количестве, выбранном из группы, состоящей из 50 мг, 100 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг и 600 мг. Комбинации/совместные составы могут вводиться субъекту в соответствии с любой из схем введения, раскрытых в другом месте данного документа, включая, например, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз каждые 2 недели, один раз каждые 3 недели, один раз каждый месяц раз в 2 месяца, раз в 3 месяца, раз в 4 месяца, раз в 5 месяцев, раз в 6 месяцев и т.д. Анти-CTLA-4 антитело по данному изобретению можно, например, вводить в дозе от 0,065 до 0,8-11, от 1 до 10, от 3 до 10, от 1 до 3 или от 10 мг/кг, одновременно с ингибитором PD-1 (например, антителом против PD-1, как описано в патенте США 2015/0203579) в дозе от около 3 до 5 или около 3,0 мг/кг. Одновременное введение может, например, происходить каждые 14 дней, 21 день или 28 дней.

В иллюстративных вариантах осуществления, в которых анти-CTLA-4 антитело по данному изобретению вводят в комбинации с антителом против PD-1 и антагонистом VEGF (например, ловушкой VEGF, такой как афлиберцепт), включая введение совместных препаратов, содержащих анти-CTLA-4 антитело, антитело против PD-1 и антагонист VEGF, отдельные компоненты можно вводить субъекту и/или совместно готовить с применением различных комбинаций доз. Например, анти-CTLA-4 антитело и/или анти-PD-1 антитело могут быть введены субъекту и/или содержаться в совместном препарате в количестве, выбранном из группы, состоящей из 0,01 мг, 0,02 мг, 0,03 мг, 0,04 мг, 0,05 мг, 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг, 0,5 мг, 0,6 мг, 0,7 мг, 0,8 мг, 0,9 мг, 1,0 мг, 1,5 мг, 2,0 мг, 2,5 мг, 3,0 мг, 3,5 мг, 4,0 мг, 4,5 мг, 5,0 мг, 6,0 мг, 7,0 мг, 8,0 мг, 9,0 мг и 10,0 мг; и антагонист VEGF (например, ловушка VEGF, такая

как афлиберцепт) может быть введен субъекту и/или содержаться в совместной композиции в количестве, выбранном из группы, состоящей из 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг, 0,5 мг, 0,6 мг, 0,7 мг, 0,8 мг, 0,9 мг, 1,0 мг, 1,1 мг, 1,2 мг, 1,3 мг, 1,4 мг, 1,5 мг, 1,6 мг, 1,7 мг, 1,8 мг, 1,9 мг, 2,0 мг, 2,1 мг, 2,2 мг, 2,3 мг, 2,4 мг, 2,5 мг, 2,6 мг, 2,7 мг, 2,8 мг, 2,9 мг и 3,0 мг. Комбинации/совместные составы могут вводиться субъекту в соответствии с любой из схем введения, раскрытых в другом месте данного документа, включая, например, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз каждые 2 недели, один раз каждые 3 недели, один раз каждый месяц раз в 2 месяца, раз в 3 месяца, раз в 4 месяца, раз в 5 месяцев, раз в 6 месяцев и т.д.

Режимы введения

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения многократные дозы анти-CTLA-4 антитела (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию анти-CTLA-4 антитела и любого из дополнительных терапевтически активных агентов, упомянутых в данном документе), могут вводить субъекту в течение определенного времени. Способы согласно этому аспекту изобретения включают последовательное введение субъекту многократных доз анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению. Как в данном документе используется, под последовательным введением подразумевается, что каждая доза анти-CTLA-4 антитела вводится субъекту в другой момент времени, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы). Данное изобретение включает способы, которые включают последовательное введение пациенту однократной начальной дозы анти-CTLA-4 антитела с последующими одной или несколькими вторичными дозами анти-CTLA-4 антитела и, необязательно, с последующими одной или несколькими третичными дозами анти-CTLA-4 антитела. Антитело против CTLA-4 можно вводить в дозе от 0,1 до 100 мг/кг массы тела субъекта.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению. Таким образом, начальная доза представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также называемой базовой дозой); вторичные дозы представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и третичные дозы представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы могут содержать одинаковое количество анти-CTLA-4 антитела, но, как правило, могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. В некоторых вариантах осуществления, однако, количество анти-CTLA-4 антитела, содержащееся в начальной, вторичной и/или третичной дозах, варьируется друг от друга (например, корректируется вверх или вниз, в зависимости от ситуации) в течение курса лечения. В некоторых вариантах осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводятся в начале схемы лечения в виде нагрузочных доз, за которыми следуют последующие дозы, которые вводятся реже (например, поддерживающие дозы).

В некоторых вариантах осуществления количество анти-CTLA-4 антитела, содержащегося в начальной, вторичной и/или третичной дозах, может быть субоптимальным или субтерапевтическим. Используемые в данном документе термины "субтерапевтический" или "субоптимальный" относятся к дозе антитела, вводимой на слишком низком уровне, чтобы вызвать терапевтический эффект, или ниже уровня, необходимого для лечения заболевания, такого как рак.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через от 1 до 26 (например, через 1, 1^{1/2}, 2, 2^{1/2}, 3, 3^{1/2}, 4, 4^{1/2}, 5, 5^{1/2}, 6, 6^{1/2}, 7, 7^{1/2}, 8, 8^{1/2}, 9, 9^{1/2}, 10, 10^{1/2}, 11, 11^{1/2}, 12, 12^{1/2}, 13, 13^{1/2}, 14, 14^{1/2}, 15, 15^{1/2}, 16, 16^{1/2}, 17, 17^{1/2}, 18, 18^{1/2}, 19, 19^{1/2}, 20, 20^{1/2}, 21, 21^{1/2}, 22, 22^{1/2}, 23, 23^{1/2}, 24, 24^{1/2}, 25, 25^{1/2}, 26, 26^{1/2} или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза "непосредственно предшествующая доза", используемая в данном документе, означает, в последовательности многократных введений, дозу анти-CTLA-4 антитела, которую вводят пациенту до введения следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы согласно этому аспекту изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз анти-CTLA-4 антитела. Например, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогично, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз пациенту.

В вариантах осуществления, включающих множественные вторичные дозы, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может вводиться пациенту через 1-2 недели или через 1-2 месяца после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления, включающих множественные третичные дозы, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может вводиться пациенту через 2-12 недель после непосредственно предшествующей дозы. В определенных вариантах осуществления данного изобретения частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводятся пациенту, может варьироваться в течение курса лечения. Частота введения может также регулироваться врачом в течение курса лечения в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

Диагностическое применение антител

Анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению можно применять для обнаружения и/или измерения CTLA-4 в образце, например, для диагностических целей. Некоторые варианты осуществления предусматривают применение одного или нескольких антител по данному изобретению в анализах для выявления заболевания или расстройства, такого как рак, аутоиммунное заболевание или вирусная инфекция. Типичные диагностические анализы для CTLA-4 могут включать, например, контактирование образца, полученного от субъекта (например, пациент), с анти-CTLA-4 антителом по данному изобретению, при этом анти-CTLA-4 антитело метят детектируемой меткой или репортерной молекулой или применяют в качестве захватывающего лиганда для селективного выделения CTLA-4 из исследуемых образцов. Альтернативно, немеченое анти-CTLA-4 антитело можно применять в диагностических целях в комбинации со вторичным антителом, которое само мечено пригодным для детекции образом. Метка пригодная для детекции или репортерная молекула может представлять собой радиоизотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как изотиоцианат флуоресцеина или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, Р-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные типовые анализы, которые можно применять для обнаружения или измерения CTLA-4 в образце, включают иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (RIA) и флуоресцентно-активированную сортировку клеток (FACS)/проточную цитометрию.

Образцы, которые можно применять в диагностических анализах CTLA-4 в соответствии с данным изобретением, включают любой образец ткани или жидкости, получаемый от субъекта, который содержит пригодные для детекции количества белка CTLA-4 или его фрагментов в нормальных или патологических условиях. Как правило, уровни CTLA-4 в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациент, не пораженный раком или аутоиммунным заболеванием), будут измеряться для первоначального установления базового или стандартного уровня CTLA-4. Этот базовый уровень CTLA-4 можно затем сравнить с уровнями CTLA-4, измеренными в образцах, полученных от лиц, подозреваемых на наличие заболевания, связанного с раком, или симптомов, связанных с таким состоянием.

Указанные антитела, специфичные для CTLA-4, могут не содержать никаких дополнительных меток или фрагментов, или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или фрагмент. В одном варианте осуществления метка или фрагмент представляет собой биотин. В анализе связывания местоположение метки (если таковая имеется) может определять ориентацию пептида относительно поверхности, с которой связан этот пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентирован таким образом, что C-концевой участок пептида будет дистальным по отношению к поверхности.

Аспекты данного изобретения относятся к применению раскрытых антител в качестве маркеров для предсказания прогноза рака или вирусной инфекции у пациентов. Указанные антитела по данному изобретению можно применять в диагностических анализах для оценки прогноза рака у пациента и для прогнозирования выживаемости.

Примеры

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области полное раскрытие и описание того, как изготавливать и применять способы и композиции данного изобретения, и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количества, температуры и т. д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет около 25°C, а давление равно атмосферному или близко к нему.

Пример 1. Генерация/получение человеческих антител к CTLA-4

Человеческие антитела к CTLA-4 были получены с применением или белка CTLA-4 человека (номер по каталогу: 7268-CT, R & D Systems), или ДНК, кодирующей hCTLA-4 (номер доступа: NM_005214.4). Иммуноген вводили непосредственно вместе с адъювантом для стимуляции иммунного ответа мыши VELOCIMMUNE® (т.е., сконструированная мышь, содержащая ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой и каппа легкой цепи человеческого иммуноглобулина), как описано в патенте США 8502018 В2. Иммунный ответ антитела контролировали с помощью CTLA-4-специфического иммуноанализа. Когда был достигнут желаемый иммунный ответ, спленоциты собирали и сливали с клетками миеломы мыши, чтобы сохранить их жизнеспособность и сформировать клеточные линии гибридомы. Линии клеток гибридомы подвергали скринингу и отбирали для идентификации линий клеток, которые продуцируют специфичные к CTLA-4 антитела. Применяя эту методику и иммуноген, описанный выше, было получено несколько химерных анти-CTLA-4 антител (т.е., антител, обладающих человеческими вариабельными доменами и константными доменами мыши); иллюстративные антитела, генерируемые таким образом, от мышей VELOCIMMUNE® были обозначены как H1M20370N, H1M20372N, H1M20393N, H2M20361N, H2M20368N, H2M20369N, H2M20373N, H2M20375N, H2M20379N, H2M20385N, H2M20386N и H2M20387N.

Анти-CTLA-4 антитела также были выделены непосредственно из антиген-позитивных В-клеток (от любой из иммунизированных мышей) без слияния с клетками миеломы, как описано в патенте США № 7582298, который специально включен в данный документ посредством ссылки во всей его полноте. Применяя этот метод, было получено несколько полностью человеческих анти-CTLA-4 антител (т.е., указанные антитела, обладают переменными доменами человека и константными доменами человека); типичные антитела, полученные таким образом, были обозначены следующим образом: H1H19264P, H1H19269P, H1H19273P, H1H19274P, H1H19278P, H1H19279P, H1H19280P, H1H19281P, H1H19283P, H1H19284P, H1H19291P, H1H19294P, H1H19303P, H1H19305P, H1H19307P, H1H19312P, H1H19313P, H1H19314P2, H1H19319P2 и H1H19327P2.

Биологические свойства иллюстративных антител, полученных в соответствии со способами этого примера, подробно описаны в примерах, изложенных ниже.

Пример 2. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности переменной области тяжелой и легкой цепей

В табл. 1 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепи и CDR выбранных анти-CTLA-4 антител по данному изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты приведены в табл. 2.

Таблица 1. Идентификаторы аминокислотной последовательности

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR2	LCDR3
H1H19264P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H19269P	18	20	22	24	26	28	30	32
H1H19273P	34	36	38	40	42	44	46	48
H1H19274P	50	52	54	56	58	60	62	64
H1H19278P	66	68	70	72	74	76	78	80
H1H19279P	82	84	86	88	90	92	94	96
H1H19280P	98	100	102	104	106	108	110	112
H1H19281P	114	116	118	120	122	124	126	128
H1H19283P	130	132	134	136	138	140	142	144
H1H19284P	146	148	150	152	154	156	158	160
H1H19291P	162	164	166	168	170	172	174	176
H1H19294P	178	180	182	184	186	188	190	192
H1H19303P	194	196	198	200	202	204	206	208
H1H19305P	210	212	214	216	218	220	222	224
H1H19307P	226	228	230	232	234	236	238	240
H1H19312P	242	244	246	248	250	252	254	256
H1H19313P	258	260	262	264	266	268	270	272
H1H19314P2	274	276	278	280	282	284	286	288
H1H19319P2	290	292	294	296	298	300	302	304
H1H19327P2	306	308	310	312	298	300	302	304
H1M20370N	314	316	318	320	322	324	326	328
H1M20372N	330	332	334	336	338	340	342	344
H1M20393N	346	348	350	352	354	356	358	360
H2M20361N	362	364	366	368	370	372	374	376
H2M20368N	378	380	382	384	386	388	390	392
H2M20369	394	396	398	400	402	404	406	408

N								
H2M20373 N	410	412	414	416	418	420	422	424
H2M20375 N	426	428	430	432	434	436	438	440
H2M20379 N	442	444	446	448	450	452	454	456
H2M20385 N	458	460	462	464	466	468	470	472
H2M20386 N	474	476	478	480	482	484	486	488
H2M20387 N	490	492	494	496	498	500	502	504

Таблица 2. Идентификаторы последовательности нуклеиновых кислот

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCVR	LCDR 1	LCDR2	LCDR 3
H1H19264P	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H19269P	17	19	21	23	25	27	29	31
H1H19273P	33	35	37	39	41	43	45	47
H1H19274P	49	51	53	55	57	59	61	63
H1H19278P	65	67	69	71	73	75	77	79
H1H19279P	81	83	85	87	89	91	93	95
H1H19280P	97	99	101	103	105	107	109	111
H1H19281P	113	115	117	119	121	123	125	127
H1H19283P	129	131	133	135	137	139	141	143
H1H19284P	145	147	149	151	153	155	157	159
H1H19291P	161	163	165	167	169	171	173	175
H1H19294P	177	179	181	183	185	187	189	191
H1H19303P	193	195	197	199	201	203	205	207
H1H19305P	209	211	213	215	217	219	221	223
H1H19307P	225	227	229	231	233	235	237	239
H1H19312P	241	243	245	247	249	251	253	255
H1H19313P	257	259	261	263	265	267	269	271
H1H19314P2	273	275	277	279	281	283	285	287
H1H19319P2	289	291	293	295	297	299	301	303
H1H19327P2	305	307	309	311	297	299	301	303
H1M20370N	313	315	317	319	321	323	325	327
H1M20372N	329	331	333	335	337	339	341	343
H1M20393N	345	347	349	351	353	355	357	359
H2M20361N	361	363	365	367	369	371	373	375
H2M20368N	377	379	381	383	385	387	389	391
H2M20369N	393	395	397	399	401	403	405	407
H2M20373N	409	411	413	415	417	419	421	423
H2M20375N	425	427	429	431	433	435	437	439
H2M20379N	441	443	445	447	449	451	453	455
H2M20385N	457	459	461	463	465	467	469	471
H2M20386N	473	475	477	479	481	483	485	487
H2M20387N	489	491	493	495	497	499	501	503

Указанные антитела, как правило, упоминаются в данном документе в соответствии со следующей номенклатурой: Префикс Fc (например, H1M, H4H и т.д.), за которым следует числовой идентификатор (например, 19264, 20370 и т.д., как продемонстрировано в табл. 1), за которым следует суффикс P, P2 или N. Таким образом, согласно этой номенклатуре, антитело может упоминаться в данном документе как, например, H1M20370N, H1H19264P, H1H19314P2 и т.д. Префикс H1H на обозначениях антител, используемых в данном документе, указывает конкретный изотип Fc-области антитела. Например, антитело H1H имеет Fc человеческого IgG1, антитело H1M имеет Fc мышинового IgG1, а антитело H2M имеет Fc мышинового IgG2 (все вариабельные области полностью человеческие, что обозначено первым "H" в обо-

значении антитела). Как будет понятно специалисту в данной области, антитело, имеющее конкретный Fc изотип, может быть превращено в антитело с другим Fc изотипом (например, антитело с Fc мышинового IgG1 может быть превращено в антитело с человеческим IgG1 или человеческим IgG4 и т. д.), но в любом случае переменные домены (включая CDR), которые обозначены числовыми идентификаторами, показанными в табл. 1, останутся такими же, и ожидается, что свойства связывания с антигеном, будут идентичными или практически одинаковыми, независимо от природы Fc-домена.

Контрольные конструкции:

Две контрольные конструкции (анти-CTLA4 антител) были включены в следующие эксперименты для сравнительных целей:

COMP1: человеческое анти-CTLA-4 антитело с переменными доменами тяжелой и легкой цепи, имеющее аминокислотные последовательности соответствующих доменов "10D1", как указано в WO 01/14424 A2 (Bristol Myers Squibb) и полученное с Fc hlgG1.

COMP2: человеческое анти-CTLA-4 антитело с переменными доменами тяжелой и легкой цепей, имеющее аминокислотные последовательности соответствующих доменов "11.2.1", как указано в US 2014/099325 A1 (Pfizer) и произведенное с Fc hlgG2.

Пример 3. Аффинность связывания на основе поверхностного плазменного резонанса и кинетические константы человеческих моноклональных анти-CTLA-4 антител

Сродство связывания и кинетические константы человеческих анти-CTLA-4 антител определяли поверхностным плазмонным резонансом (Biacore 4000 (GE, Питсбург, Пенсильвания) или MASS-1 (Sierra Sensors, Гринвилл, Род Айленд)) при 25°C (табл. 3 и 4). Указанные антитела, экспрессируемые в виде человеческого IgG1 (то есть "H1H"), были захвачены на сенсорной поверхности CM5 (GE), дериватизированной путем аминного связывания с моноклональным антителом против человеческого Fc-антитела (GE). Указанные антитела, экспрессируемые в виде мышинового IgG1 или мышинового IgG2 (то есть "H1M", "H2M"), захватывали на поверхности аминного сенсора высокой емкости (Sierra Sensors), дериватизированной путем аминного связывания с поликлональным козым антимышиным Fc-антителом (GE). Различные концентрации растворимых человеческих (h)CTLA-4 (SEQ ID NO: 506) или Macaca fascicularis (mf)CTLA-4 (SEQ ID NO: 507), экспрессируемых с мус-мус-polyhistidine (mmh) тэгом на с-конце вводили поверх захваченных анти-CTLA-4 мАт сенсорных поверхностей со скоростью потока 30 или 50 мкл/мин. CTLA-4 представляет собой гомодимер, связанный одной дисульфидной связью во внеклеточном домене с остатком цистеина 157.

Все исследования связывания проводили в буфере, состоящем из 0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05 об./об.% сурфактанта P20 (рабочий буфер HBS-ET). Ассоциацию hCTLA4.mmh или mfCTLA4.mmh с захваченным моноклональным антителом контролировали в течение 4 или 5 мин, а диссоциацию hCTLA4.mmh или mfCTLA4.mmh в рабочем буфере HBS-ET контролировали в течение 10 мин.

Константы скорости кинетики ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем подгонки сенсограмм в реальном времени к модели связывания 1:1 с применением программного обеспечения для подгонки кривых Scrubber 2.0c. Равновесные константы диссоциации связывания (K_D) и периоды полураспада диссоциации ($t^{1/2}$) рассчитывали из кинетических констант скорости следующим образом:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a} \text{ и } t^{1/2} (\text{мин}) = \frac{\ln(2)}{k_d}$$

Как продемонстрировано в табл. 3, все анти-CTLA-4 антитела по данному изобретению связывались с человеческим CTLA-4, многие с наномолярным сродством к hCTLA-4.mmh, и проявляли перекрестную реактивность к белку CTLA-4 яванца. Перекрестная реактивность к белку CTLA-4 мыши или крысы не наблюдалась (данные не продемонстрированы).

Таблица 3. Средство связывания Вiасоге человеческих Fc мАт при 25°C

Связывание при 25°C/ Формат захвата МАт					
AbPID	Аналит *	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)	t1/2 (мин)
H1H19264P	hCTLA-4.mmh	6,04E+04	7,31E-04	1,21E-08	15,8
	mf CTLA-4. mmh	4,90E+04	9,94E-04	2,03E-08	11,6
H1H19269P	hCTLA-4.mmh	3,94E+05	4,74E-04	1,20E-09	24,4
	mf CTLA-4. mmh	3,56E+05	4,35E-04	1,22E-09	26,6
H1H19273P	hCTLA-4.mmh	3,74E+05	3,62E-04	9,66E-10	31,9
	mf CTLA-4. mmh	3,62E+05	3,46E-04	9,56E-10	33,4
H1H19274P	hCTLA-4.mmh	5,30E+05	7,60E-04	1,43E-09	15,2
	mf CTLA-4. mmh	5,22E+05	4,63E-04	8,87E-10	25
H1H19278P	hCTLA-4.mmh	1,79E+05	4,02E-04	2,25E-09	28,8
	mf CTLA-4. mmh	1,66E+05	1,01E-03	6,11E-09	11,4
H1H19279P	hCTLA-4.mmh	3,46E+05	2,61E-04	7,52E-10	44,3
	mf CTLA-4. mmh	3,40E+05	2,59E-04	7,63E-10	44,6
H1H19280P	hCTLA-4.mmh	3,37E+05	3,46E-04	1,03E-09	33,4
	mf CTLA-4. mmh	3,20E+05	3,09E-04	9,64E-10	37,4
H1H19281P	hCTLA-4.mmh	4,84E+05	7,41E-04	1,53E-09	15,6
	mf CTLA-4. mmh	4,72E+05	1,01E-03	2,14E-09	11,5
H1H19283P	hCTLA-4.mmh	2,21E+05	8,28E-04	3,75E-09	14
	mf CTLA-4. mmh	2,20E+05	6,83E-04	3,11E-09	16,9
H1H19284P	hCTLA-4.mmh	1,48E+05	3,69E-04	2,49E-09	31,3
	mf CTLA-4. mmh	1,94E+05	3,05E-04	1,57E-09	37,9

H1H19291P	hCTLA-4.mmh	8,88E+04	1,23E-03	1,38E-08	9,4
	mf CTLA-4. mmh	9,31E+04	1,21E-03	1,30E-08	9,6
H1H19294P	hCTLA-4.mmh	2,85E+05	3,23E-04	1,13E-09	35,7
	mf CTLA-4. mmh	2,63E+05	2,69E-04	1,02E-09	43
H1H19303P	hCTLA-4.mmh	1,21E+05	1,99E-03	1,64E-08	5,8
	mf CTLA-4. mmh	1,56E+05	2,45E-03	1,57E-08	4,7
H1H19305P	hCTLA-4.mmh	2,89E+05	1,21E-03	4,19E-09	9,5
	mf CTLA-4. mmh	2,84E+05	9,02E-04	3,18E-09	12,8
H1H19307P	hCTLA-4.mmh	2,17E+05	2,84E-04	1,31E-09	40,6
	mf CTLA-4. mmh	2,09E+05	2,92E-04	1,40E-09	39,5
H1H19312P	hCTLA-4.mmh	3,20E+05	1,05E-03	3,29E-09	11
	mf CTLA-4. mmh	3,33E+05	7,60E-04	2,28E-09	15,2
H1H19313P	hCTLA-4.mmh	4,89E+05	7,58E-04	1,55E-09	15,2
	mf CTLA-4. mmh	4,75E+05	4,64E-04	9,76E-10	24,9
H1H19314P2	hCTLA-4.mmh	1,15E+05	1,13E-03	9,87E-09	10,2
	mf CTLA-4. mmh	1,07E+05	9,13E-04	8,57E-09	12,6
H1H19319P2	hCTLA-4.mmh	1,43E+05	1,46E-03	1,02E-08	7,9
	mf CTLA-4. mmh	2,03E+05	2,61E-03	1,29E-08	4,4
H1H19327P2	hCTLA-4.mmh	8,81E+03	5,85E-04	6,63E-08	19,8
	mf CTLA-4. mmh	1,88E+05	1,17E-02	6,24E-08	1
H1H20361N	hCTLA-4.mmh	6,21E+04	1,99E-03	3,21E-08	5,8
	mf CTLA-4. mmh	HO	HO	HO	HO
H1H20361N	hCTLA-4.mmh	5,39E+04	2,51E-03	4,65E-08	4,6
2	mf CTLA-4. mmh	HO	HO	HO	HO
H1H20370N	hCTLA-4.mmh	1,72E+05	5,88E-04	3,43E-09	19,6
	mf CTLA-4. mmh	HO	HO	HO	HO
H1H20370N 2	hCTLA-4.mmh	5,13E+04	1,21E-03	2,36E-08	9,5
	mf CTLA-4. mmh	HO	HO	HO	HO
H1H20372N	hCTLA-4.mmh	8,05E+04	3,67E-04	4,55E-09	31,5
	mf CTLA-4. mmh	HO	HO	HO	HO
H1H20373N	hCTLA-4.mmh	5,23E+05	4,01E-04	7,66E-10	28,8
	mf CTLA-4. mmh	HO	HO	HO	HO
H1H20375N	hCTLA-4.mmh	4,19E+04	2,79E-03	6,65E-08	4,1
	mf CTLA-4. mmh	HO	HO	HO	HO
H1H20380N 2	hCTLA-4.mmh	1,37E+06	3,20E-04	2,33E-10	36,2
	mf CTLA-4. mmh	HO	HO	HO	HO
H1H20386N	hCTLA-4.mmh	1,85E+05	1,94E-03	1,05E-08	6
	mf CTLA-4. mmh	HO	HO	HO	HO
H1H20386N 2	hCTLA-4.mmh	1,35E+05	1,68E-03	1,24E-08	6,9
	mf CTLA-4. mmh	HO	HO	HO	HO

*белки h и mfCTLA-4 mmh пропускали над поверхностями с захваченными МАТ в концентрациях от 0,37 нМ до 90 нМ в 3-кратных разведениях;
HO=не определено

Пример 4. Антитела против CTLA-4 блокируют взаимодействие между человеческим CTLA-4 и его природными лигандами, B7-1 и B7-2

CTLA-4 (цитотоксический белок 4, ассоциированный с Т-лимфоцитами) представляет собой ингибирующий трансмембранный рецептор типа I контрольной точки Т-клеток, экспрессируемый на обычных и регуляторных Т-клетках. CTLA-4 отрицательно регулирует активацию Т-клеток, предотвращая связывание стимулирующего рецептора CD28 с его природными лигандами, B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86). В этом примере способность анти-CTLA-4 антител блокировать связывание белка CTLA-4 с B7-1 и B7-2, иммобилизованными на планшете, оценивалась с применением конкурентного слоевого (sandwich) иммуоферментного анализа (ИФА). Различные концентрации анти-CTLA-4 антитела предварительно смешивали с постоянным количеством димерного белка CTLA-4 и наблюдали уменьшение связывания CTLA-4, из-за присутствия антитела, с иммобилизованными на планшете B7-1 или B7-2.

Вкратце, анализы проводили с применением следующей процедуры: Белки B7-1 и B7-2 человека, экспрессированные с-концевым человеческим IgG1 и 6×Гистицином (hIgG1-6×His; R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота), отдельно покрывали в концентрации 2 мкг/мл в PBS на 96-луночном планшете для микротитрования в течение ночи (ON - overnight) при 4°C. Сайты неспецифического связывания впоследствии блокировали с применением 0,5 мас./об.% раствора BSA в PBS. Отдельно к серийно разведенным анти-CTLA антителам или к растворам без антител добавляли постоянное количество 200 пМ или 400 пМ рекомбинантного белка hCTLA-4-mFc (внеклеточный домен человеческого CTLA-4, экспрессируемый с с-концевой Fc-частью мышиного IgG2a, SEQ ID NO: 508). В этом Примере дозы анти-CTLA-4 антител варьировались от 1,7 мкМ до максимум 100 нМ или 1,0 мкМ. Затем через 1 ч при комнатной температуре (КТ - RT- room temperature), комплексы антитело-белок с постоянной концентрацией белка hCTLA-4-mFc 200 мкМ переносили в планшеты для микротитрования, покрытые hB7-1-hIgG1-6His, и комплексы антитело-белок с постоянной концентрацией 400 мкМ hCTLA-4-mFc переносили в покрытые hB7-2-hIgG1-6His планшеты. После последующей 1-часовой инкубации при комнатной температуре лунки отмывали и детектировали связанный с чашкой hCTLA-4-mFc с помощью поликлональных антител козы против мышиных Fcγ-фрагментов, конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP) (JacksonImmunoResearch, Вест Грив, Пенсильвания). Планшеты визуализировали с применением раствора субстрата TMB (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя, и оптическую плотность измеряли при 450 нм на ридере Victor (PerkinElmer™, Волтем, Масчусетс).

Все данные анализа были выполнены с применением сигмоидальной модели доза-эффект в программном обеспечении Prism™ (GraphPad, Ла Хойа, Калифорния). Расчеты были выполнены следующим образом: IC₅₀, определяемая как концентрация антитела, необходимая для снижения 50% связывания hCTLA-4 с hB7-1 или B7-2, применялся в качестве индикатора эффективности блокирования. Процент блокады при максимальной концентрации тестируемого антитела (100 нМ или 1,0 мкМ) рассчитывали как способность антител блокировать связывание 200 мкМ или 400 мкМ hCTLA-4-mFc с hB7-1 или hB7-2, соответственно, относительно начального уровня анализа. Сигнал связывания образцов с 200 мкМ или 400 мкМ hCTLA-4-mFc в отсутствие антитела был назван 100% связыванием или 0% блокированием; и начальный уровень сигнала буфера для образца без hCTLA-4-mFc или антитела называли 0% связывания или 100% блокирования.

Как демонстрируют результаты в табл. 4, анти-CTLA-4 антитела этого изобретения демонстрируют широкий спектр способности блокировать связывание человеческого CTLA-4 с его природными лигандами, B7-1 или B7-2. Типичные антитела H1H19273P и H1H19313P эффективно блокируют связывание CTLA-4 с B7-1 или B7-2 с пикомолярными значениями IC₅₀ и с процентной блокадой ~100% при максимальной концентрации антител 1,0 мкМ. Некоторые антитела, такие как H1H20373N, были более сильными блокаторами связывания CTLA-4 с B7-2, чем B7-1, в то время как некоторые антитела (H1H19314P2) продемонстрировали минимальную блокирующую способность любого лиганда.

Таблица 4. Анти-CTLA-4 антитела блокируют связывание hCTLA-4 с лигандами hB7-1 или hB7-2

Ат блокирование 200 pM связывания hCTLA-4-mFc с hB7-1/CD80-hIgG1-6His нанесенным на плашку		Ат блокирование 400 pM связывания hCTLA-4-mFc с hB7-2/CD86-hIgG1-6His нанесенным на плашку		
AbPID	Максимальная концентрация Ат: 100 nM			
	IC ₅₀ (M)	% Блокирования	IC ₅₀ (M)	% Блокирования
Блокирующая способность человеческих Fc анти-CTLA-4 антител				
H1H19264P	-	8	-	43
H1H19269P	1,0E-10	98	1,9E-10*	100
H1H19274P	1,3E-10	99	2,5E-10	100
H1H19278P	3,2E-10	99	5,4E-10	100
H1H19279P	2,1E-10	97	2,2E-10	100
H1H19280P	1,1E-10	99	2,0E-10	100
H1H19281P	9,4E-11*	99	1,9E-10*	100
H1H19283P	9,7E-09	96	1,2E-09	99
H1H19284P	1,7E-10	98	3,1E-10	99
H1H19291P	2,0E-09	98	2,5E-09	99
H1H19294P	1,5E-10	99	2,5E-10	99
H1H19305P	1,9E-10	98	3,6E-10	99
H1H19307P	1,8E-10	99	2,9E-10	99
H1H19312P	2,0E-10	97	5,1E-10	99
H1H19314P2	-	0	-	7
H1H19327P2	-	7	-	38
H1H19273P	2,5E-10	98	5,4E-10	98
H1H19303P	1,8E-07	90	3,9E-08	97
H1H19313P	4,0E-10	98	7,7E-10	99
H1H19319P2	3,2E-07	85	4,3E-08	97
H1H20370N	8,6E-10	95	9,9E-10	96
H1H20370N2	1,1E-08	85	9,8E-09	92
H1H20372N	2,5E-09	98	9,9E-10	98
H1H20361N	6,9E-08	73	6,5E-08	82
H1H20361N2	1,2E-07	53	1,1E-07	70
H1H20373N	-	22	3,4E-08	91
H1H20375N	-	13	-	29
H1H20380N2	5,0E-10	98	3,8E-10	98
H1H20386N	1,8E-08	94	7,7E-09	96
H1H20386N2	БЕЗРЕЗ	59	1,7E-07	87
Контроли				
mIgG2a изотип	-	-6	-	1
hIgG1 изотип	-	15	-	14

Максимально отрицательный % блокирования (т.е. -8) указывает на увеличение связывания hCTLA-4, обнаруженное в присутствии антитела.

(-) указывает значения IC₅₀, не являющиеся количественными для блокирования антител <50% при самой высокой протестированной концентрации.

(БЕЗРЕЗ): безрезультатно: кривая сигмоидального связывания не была установлена программным обеспечением Prism™ для расчета значения IC₅₀.

(*) Обозначает значение IC₅₀ ниже теоретического нижнего лимита анализа ($0,1 \times 10^{-09}$ М для связывания hCTLA-4 с hB7-1/CD80 или $0,2 \times 10^{-09}$ М для связывания hCTLA-4 с hB7-2/CD86)

Пример 5. Анти-CTLA-4 антитела проявляют специфичное и сильное связывание с клеточными линиями с рекомбинантным человеческим CTLA-4

В этом примере способность анти-человеческий (h)CTLA-4 антител специфично связываться с клеточными линиями, экспрессирующими человеческий CTLA-4, определяли с помощью обнаружения на основе электрохемилюминесценции (ECL - electrochemiluminescence).

Вкратце, мышинные эмбриональные фибробластные клетки, выделенные от мышей Velocimmune® (VI-фибробласты), стабильно трансфицировали человеческим CTLA-4 (аминокислоты M1-N223, номер доступа NCBI NM_005214.4). Нетрансфицированные клетки VI-фибробластов не имеют детектируемой посредством флуоресцентной сортировки клеток (FACS) экспрессии CTLA-4 и были включены в качестве контроля связывания. Кроме того, также была представлена репортерная линия

Т-клеток, генерируемая путем трансформации бессмертных Т-клеток Jurkat человека (ATCC, Манасс, Вирджиния) с помощью лентивирусного репортера NFAT-Luc (Qiagen, Германтаун, Мериленд) и химерных конструкций h, m или mf CTLA-4 оценивается в этом анализе. Химерные конструкции содержали внеклеточный домен или hCTLA-4 (ак 1-161; номер доступа NP_005205.2), мышинных CTLA-4 (MS CTLA-4, ак 1-161, номер доступа NM_009843.4) или mf CTLA-4 (ак от 1-161; номер доступа XP_005574071.1), слитый с трансмембранным и цитоплазматическим доменом hCD300a (ак 181-299; номер доступа NP_009192.2).

Приблизительно $2,0 \times 10^4$ клеток VI-фибробластов/hCTLA-4 или $1,0 \times 10^4$ химерных клеток Jurkat/NFAT высевали отдельно на 96-луночные углеродные электродные плашки (MULTI-ARRAY сильно/много связывающие плашки, Meso Scale Discovery (MSD; Роквил, Мэриленд) и инкубировали в течение 1 ч (ч) при 37°C. Сайты неспецифического связывания блокировали 2 мас./об.% BSA в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ). Последовательные разведения анти-CTLA-4 или антител, изотипического контроля, в диапазоне от 1,7 пМ до 150 нМ, или буфера, не содержащего антител, добавляли к клеткам, связанным с планшетами, в течение 1 ч при КТ. Планшеты затем промывали для удаления не связанных антител с применением устройства для промывания планшетов AquaMax2000 с головкой для промывки клеток (MDS Analytical Technologies, Саннивейл, Калифорния). Указанные антитела, связанные с планшетом, детектировали или с помощью козьего поликлонального антитела IgG человека, конъюгированного с SULFO-TAGTM, специфичного к тяжелым и легким цепям (Jackson ImmunoResearch, Вест Грив, Пенсильвания), или с помощью козьего поликлонального антитела, конъюгированного с SULFO-TAGTM, против мышинного IgG, специфичного к Fc фрагменту (Jackson ImmunoResearch), в течение 1 ч при КТ.

После промывок планшеты были визуализированы с применением буфера считывания (MSD) в соответствии с рекомендуемой изготовителем процедурой, а люминесцентные сигналы были записаны с помощью SECTOR Imager 600 (MSD). Интенсивность люминесценции, измеренную в относительных световых единицах (OCE-RLU - relative light units), регистрировали, чтобы указать интенсивность связывания каждого антитела в диапазоне концентраций. Отношение сигнала, обнаруженного при связывании антител в концентрации 0,4 или 0,6 нМ с клетками, сконструированными с CTLA-4, по сравнению с родительскими клетками в той же концентрации сообщалось как показатель специфичности связывания с CTLA-4.

Кроме того, сигналы прямого связывания (RLU) были проанализированы в зависимости от концентрации антитела, и данные были подогнаны под сигмоидальную (четырепараметрическую логистическую) модель доза-ответ с применением программного обеспечения GraphPad PrismTM (GraphPad, Ла Хойя, Калифорния). Было определено, что значение EC₅₀, определяемое как концентрация антитела, при которой обнаруживается 50% максимального сигнала связывания, указывает на активность связывания с клетками с рекомбинантным CTLA-4.

Как демонстрируют результаты в табл. 5, большинство анти-CTLA-4 антител по данному изобретению специфично связываются с клеточными линиями с рекомбинантным hCTLA-4. Некоторые иллюстративные антитела, такие как H1H19303P и H1H19280P, связаны с пикомолярными значениями EC₅₀ и с соотношениями в 20-23 раза превышающими связывание с контрольными клеточными линиями.

Выбор антител дополнительно оценивали на перекрестную реактивность к клеточным линиям мышей и обезьян макак-яванцев. Как демонстрируют результаты в табл. 6, анти-CTLA-4 антитела H1H19303P, H1H19273P, H1H19319P2 и H1H19319P сильно связываются с химерными клеточными линиями Jurkat/NFAT Luc/CTLA-4 человека и яванца/hCD300 с пикомолярными значениями EC₅₀. Никакой перекрестной реактивности с мышинными химерными клетками CTLA-4 не наблюдалось.

Таблица 5. Анти-CTLA-4 антитела, специфично связывающиеся с клеточными линиями, сконструированными для экспрессии человеческого CTLA-4

AbPID	Потенциал связывания клеток с VI-фибробластов/hCTLA-4, EC50 (M)	ОCE сигнала
		с VI-клеток
		с родительским VI-фибробластом
Соотношение при концентрации 0,4 нМ Ат		
Свойства связывания клеток человеческих Fc анти-CTLA-4 антител		
H1H19264P	HC	1
H1H19269P (*)	4,0E-10	15
H1H19273P	БЕЗРЕЗ	11
H1H19274P (*)	3,9E-10	18
H1H19278P	2,2E-10	19
H1H19279P	2,4E-10	18
H1H19280P	1,3E-09	15
H1H19281P	7,5E-11	23
H1H19283P	7,9E-10	7
H1H19284P	БЕЗРЕЗ	7
H1H19291P	БЕЗРЕЗ	5
H1H19294P	6,8E-10	10
H1H19303P (*)	2,1E-10	20
H1H19305P (*)	8,4E-10	12
H1H19307P	3,7E-09	7
H1H19312P (*)	7,0E-10	14
H1H19313P (*)	1,6E-10	11
H1H19314P2 (*)	3,4E-09	8
H1H19319P2	2,4E-10	16
H1H19327P2	2,9E-10	16
Контроли		
hIgG1 Изотипический контроль	HC	1
Свойства связывания клеток гибридных антител к CTLA-4 (H1M, H2M)		
		Соотношение при концентрации 0,6 нМ Ат
H1M20370N	2,2E-10	23
H1M20372N	8,8E-10	14
H1M20393N (*)	7,3E-09	12
H2M20361N	3,2E-10	19
H2M20368N	2,6E-10	25
H2M20369N	9,0E-10	18
H2M20373N	6,2E-11	22
H2M20375N	1,9E-10	18
H2M20379N	9,2E-11	28
H2M20380N	1,2E-10	28
H2M20385N	5,5E-09	8
H2M20386N	БЕЗРЕЗ	3
H2M20387N	БЕЗРЕЗ	3
Контроль		
COMP1	БЕЗРЕЗ	11
mIgG2 изотипический контроль	HC	1

НС=нет связывания; антитела с коэффициентом связывания менее 3 были классифицированы как не связывающие

(*) Значение ОСЕ для самых высоких концентраций двух антител было исключено для расчета значений EC₅₀.

БЕЗРЕЗ=безрезультатно, GraphPad Prism™ не может подогнать сигмоидальную кривую с 4 параметрами для расчета значения EC₅₀, но антитело специфично связывается с клетками, экспрессирующими CTLA-4, с соотношениями в 3 или более раз превышающими связывание с родительскими клетками.

Таблица 6. Отобранные анти-CTLA-4 антитела демонстрируют специфичность связывания с сконструированными клеточными линиями человека и обезьяны Jurkat

Ab PID	Потенциал связывания клеток на химере Jurkat/NFAT Luc/CTLA-4 hCD300a, EC50 (M)		Отношение ОСЕ сигнала связывания с химерой Jurkat/NFAT Luc/CTLA-4 hCD300a к сигналу связывания с Jurkat/NFAT Luc/cl.3C7		
	hCTLA-4	mfCTLA-4	hCTLA-4	mfCTLA-4	msCTLA-4
			0.4 нМ	0.4 нМ	0.4 нМ
H1N19303P (*)	2.9E-10	1.1E-10	13	17	1
H1N19273P (*)	5.2E-10	2.2E-10	14	20	1
H1N19319P2 (*)	2.8E-10	1.7E-10	13	15	1
H1N19313P (*)	1.1E-10	1.4E-10	16	25	1
Контроль					
COMP1	БЕЗРЕЗ	БЕЗРЕЗ	6	8	1
изотипический контроль hIgG1	НС	НС	1	1	1

Обезьяна=Macaca flavigularis.

НС=нет связывания; антитела с коэффициентом связывания менее 3 были классифицированы как не связывающие

(*) Значение ОСЕ для самых высоких концентраций двух антител было исключено для расчета значений EC₅₀.

БЕЗРЕЗ=безрезультатно, GraphPad Prism™ не может подогнать сигмоидальную кривую с 4 параметрами для расчета значения EC₅₀, но антитело специфично связывается с клетками, экспрессирующими CTLA-4, с соотношениями в 3 или более раз превышающими родительские клетки.

Пример 6. Антитела против CTLA-4 индуцируют активацию Т-клеток в сконструированных репортерных биоизмерительных системах с Т-клетками/АПК

В этом примере были разработаны биоизмерительные системы репортеров люциферазы на основе Т-клеток/антиген-презентирующих клеток (АПК) для оценки эффектов блокирования взаимодействия CTLA-4/CD80 или CTLA-4/CD86 и активации Т-клеток. В одном формате биоанализа влияние введения анти-CTLA-4 антитела на систему Т-клеток/АПК оценивали путем измерения активности люциферазы. Во втором анализе оценивали способность анти-CTLA-4 антител индуцировать высвобождение интерлейкина (IL)-2.

Как описано в приведенных выше примерах, анти-CTLA-4 антитела, протестированные в этом Примере, продемонстрировали связывание с CTLA-4 человека и обезьяны макака-яванца (Macaca flavigularis) с применением поверхностного плазмонного резонанса (НИР - SPR - surface plasmon resonance) и продемонстрировали специфичное и сильное связывание с клеточными линиями, сконструированными для экспрессии человеческого CTLA-4. Ранее было продемонстрировано, что эти отобранные антитела к CTLA-4 блокируют связывание CTLA-4 с B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86).

Теория

Активация Т-клеток достигается путем стимуляции Т-клеточных рецепторов (ТКР), которые распознают специфические пептиды, представленные белками главного комплекса гистосовместимости класса I или II (ГКГСИ или ГКГСII) на антигенпрезентирующих клетках (АПК) (Goldrath et al., 1999). Активированный ТКР, в свою очередь, инициирует каскад сигнальных событий, которые могут отслеживаться репортерными генами, управляемыми различными факторами транскрипции, такими как белок-активатор 1 (AP-1), ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) или ядерный фактор капта-активатор легкой цепи активированных В-клеток (NFκB). Затем Т-клеточный ответ дополнительно уточняется/настраивается путем вовлечения корецепторов, экспрессируемых или конститутивно, или индуцибельно на Т-клетках, таких как CD28, CTLA-4 (белок 4 ассоциированный с цитотоксическими Т лимфоцитами), PD-1 (белок запрограммированной гибели клеток 1), LAG-3 (ген 3 активации лимфоцитов) или других молекул (Sharpe et al., 2002). Коректоры CD28 и CTLA-4 конкурируют за одни и те же лиганды, CD80 и CD86, экспрессируемые на антиген-презентирующих клетках (АПК), к которым CTLA-4 обладает более высокой аффинностью, чем CD28. CTLA-4 действует как приманка и ингибирует активацию CD28 путем секвестрации лигандов, что приводит к снижению активации Т-клеток (Alegre et al., 2001 и Walker et al., 2011).

NFAT-активность люциферазы

Конструирование клеточной линии:

Репортерные Т-клетки были сконструированы путем трансформации бессмертных человеческих Т-клеток Jurkat (ATCC), которые эндогенно экспрессируют ТКР и CD28 на клеточной поверхности, с по-

мощью лентивирусного репортера NFAT-Luc (Qiagen, Роквил, Мэрилэнд) в соответствии с инструкциями производителя. Лентивирус кодирует ген люциферазы светлячка под контролем минимального промотора CMV (цитомегаловируса) и tandemные повторы элемента транскрипционного ответа (TRE - transcriptional response element) NFAT и гена устойчивости к пуромицину.

После отбора антибиотиков и одиночного клонирования клональную линию 3C7 Jurkat/NFAT-Luc (Jurkat/NFAT-Luc cl.3C7) трансдуцировали лентивирусом, кодирующим химерные белки CTLA-4 человека (h) или обезьяны (mf - *Macaca flavicularis*). Химерная конструкция содержит внеклеточный домен hCTLA-4 (ак 1-161; номер доступа NP_005205.2) или mfCTLA-4 (ак от 1-161; номер доступа XP_005574071.1), слитый с трансмембранным и цитоплазматическим доменом hCD300a (181-299; номер доступа NP_009192.2). CD300a обнаруживается в иммунных клетках и передает ингибирующие сигналы через его иммунорецепторные ингибирующие мотивы на основе тирозина (ITIM) (DeBell et al., 2012). Полученные в результате стабильные линии Т-клеток, Jurkat/NFAT-Luc/hCTLA-4-hCD300a и Jurkat/NFAT-Luc/mfCTLA-4-hCD300a, отбирали и поддерживали в RPMI+10% FBS+пенициллин+стрептомицин+глутамин с добавлением 500 мкг/мл G418 и 1 мкг/мл пуромицина.

В-клетки человека Raji (ATCC, Манас, Вирджиния), которые эндогенно экспрессируют CD20, Fc гамма-рецепторы (FcγR), CD80 и CD86 на клеточной поверхности, применяли в качестве клеток АПК в биоанализе на основе люциферазы. Клетки Raji содержали в RPMI+10% FBS+пенициллин+стрептомицин+глутамин с добавлением HEPES и пирувата натрия.

Стимуляция Т-клеток/АПК:

Репортерные Т-клетки стимулируют посредством активирующего Т-клетки анти-CD20×CD3 биспецифического антитела (REGN2281), которое нацелено на CD3, экспрессируемый на Т-клетках Jurkat, и CD20 на В-клетках Raji. Биспецифичный способ связывания REGN2281 приводит к усилению связанного с NFAT репортерного гена люциферазы в Т-клетках Jurkat/NFAT-Luc.

В химерных клетках Jurkat/NFAT-Luc/CTLA-hCD300a, однако, максимальная активация репортерного гена с REGN2281 ослаблена из-за передачи ингибирующего сигнала, передаваемой взаимодействием химерных рецепторов CTLA-4-hCD300a с его лигандами, CD80/CD86, экспрессируемыми на клетках Raji. В этом биоанализе анти-CTLA-4 антитела, блокирующие оси CTLA-4/CD80 и CD86, теоретически сохраняют активность NFAT-Luc в репортерных клетках Jurkat, отключив ингибирующий сигнал, доставляемый через хвост CD300a химерного CTLA-4 белка.

В этом формате анализа анти-CTLA-4 антитела могут одновременно индуцировать агонистический сигнал у Jurkat, вызванный закреплением антитела Fc к FcγR на клетках Raji. Блокирование FcγR насыщенными уровнями молекул IgG или FcγR-специфичных антител может снижать агонистический эффект антител CTLA-4. Поэтому этап анализа Fc включали в анализ для ингибирования связывания mAb CTLA-4 с FcγR на клетках Raji.

Анализ на люциферазу: За 24 ч до скрининга, 5×10^5 репортерных Т-клеток и $7,5 \times 10^5$ Raji АПК культивировали в среде для анализа (RPMI1640 с добавлением 10% FBS и пенициллин+стрептомицин+глутамин (ПСГ)). На следующий день анти-CTLA-4 антитела и отрицательные изотипические контроли (серийно разводили 1:3; диапазон доз от 15 до 100 нМ) тестировали в присутствии 100 пМ REGN2281 и 10 нМ Fc-блока или 10 нМ человеческого IgG4 изотипического контроля, чтобы занять эндогенные рецепторы FcγRIIb на клетках Raji. Серийно разведенные антитела добавляли в соответствующие лунки в 96-луночных белых планшетах с плоским дном (Nunc/Thermo Fisher, Питсбург, Пенсильвания), содержащих фиксированную концентрацию 100 мкМ REGN2281/10 нМ.

Fc для блокировки или 100 мкМ REGN2281/10 нМ hIgG4 изотипического контроля. Репортерные Т-клетки и Raji АПК ресуспендировали при 2×10^6 /мл, и Т-клетки сначала добавляли в планшеты с конечной концентрацией 5×10^4 клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 15-30 мин при 37°C/5%CO₂ с последующим добавлением клеток Raji с конечной концентрацией 5×10^4 клеток/лунку. Образцы инкубировали в течение еще 4-6 ч при 37°C/5%CO₂, перед добавлением 100 мкл ONE-Glo™ (Promega, Мадисон, Висконсин) для обнаружения активности NFAT-Luc. Испускаемый свет регистрировался в относительных световых единицах (ОСЕ) на считывающем устройстве с несколькими метками для планшетов Victor (PerkinElmer, Волтем, Масчусетс). Все серийные разведения были протестированы в двух экземплярах.

Значения EC₅₀ антител CTLA-4 определяли из четырехпараметрического логистического уравнения по 10-точечной кривой доза-ответ, применяя программное обеспечение GraphPad Prism (GraphPad, La Jolla, CA). Кратность индукции рассчитывали путем нормализации относительных значений ОСЕ каждого образца к среднему для образцов, не содержащих антитело CTLA-4, которое было установлено равным 1.

Результаты: Как продемонстрировано в табл. 7, никакого увеличения активности репортерного гена (люциферазы) не наблюдалось, когда анти-CTLA-4 антитела добавляли к родительским клеткам Jurkat/NFAT-Luc cl 3C7 плюс Raji АПК в присутствии REGN2281 ± Fc для блокировки. Однако увеличение активности люциферазы было зафиксировано, когда анти-CTLA-4 антитела были добавлены к Jurkat/NFAT-Luc/h и mf CTLA-4/hCD300 химерные клеточные линии/Raji АПК системе в присутствии

REGN2281 $\pm$ Fc для блокировки. В этом формате биоанализа анти-CTLA-4 антитела блокируют взаимодействие CTLA-4 на репортерных клетках Jurkat с CD80/CD86, эндогенно экспрессируемым на клетках Raji, что приводит к индукции белка люциферазы. Указанные антитела против CTLA-4, протестированные в этом анализе, увеличивают активность люциферазы, при этом максимальные значения наблюдаются в присутствии блока Fc, при этом EC₅₀ находится в диапазоне от 1,77 нМ до 7,67 нМ. Как продемонстрировано в табл. 7, H1H19303P продемонстрировал лучшие результаты, чем сравниваемые с ним 1 и 2, как было протестировано.

CTLA-4 Анализ высвобождения человеческого интерлейкина-2 (чИЛ-2) Т-клеток/АПК

Разработка клеточной линии:

Клональную линию 3C7 Jurkat/NFAT-Luc (как описано выше) трансдуцировали с помощью собственного лентивирусного белка, кодирующего полноразмерный белок hCTLA-4 (номер доступа NP_005205.2). Полученную стабильную линию Т-клеток (Jurkat/NFAT-Luc/hCTLA-4 дт) сортировали по высокой экспрессии методом проточной цитометрии и поддерживали в RPMI+10% FBS+PSG с добавлением 500 мкг/мл G418 и 1 мкг/мл пурамицина.

Клетки эмбриональной почки человека (HEK) 293 (ATCC) трансфицировали CD20 человека и применяли для трансдукции с помощью лентивирусных супернатантов для сверхэкспрессии hCD80 (ак 1-288; номер доступа NP_005182.1) или hCD86 (ак 1-329; номер доступа NP_787058.4), слитый с зеленым флуоресцентным белком (GFP; ак 2-240; номер доступа WP_031943942.1) с линкером 4×G4S между ними. После однократного клонирования путем лимитирующих разведений были получены следующие клональные линии: HEK293/hCD20/hCD80-GFP клон 1F4 и HEK293/hCD20/hCD86-GFP клон 4G5. Клеточные линии поддерживали в DME+10% FBS+PSG+заменимые аминокислоты (NEAA - non-essential-amino-acids, Irvine Scientific, Санта Ана, Калифорния) с добавлением 500 мкг/мл G418.

Стимуляция Т-клеток/АПК:

Сконструированные Т-клетки стимулируют с помощью активирующего Т-клетки биспецифического антитела REGN2281, как описано выше. Связывание REGN2281 с CD3 приводит к кластеризации субъединиц CD3 в комплексе с ТКР и активирует Т-клетку, которая, в свою очередь, высвобождает чИЛ-2. Высвобождение ИЛ-2 может быть дополнительно установлено взаимодействием CD28 с его лигандами, CD80 или CD86, расположенными на сконструированных клетках HEK293. Максимальная активация клеток Jurkat/NFAT-Luc/hCTLA-4 ослаблена вследствие конкуренции CTLA-4 с CD28 за связывание лигандов CD80/CD86 на клетках HEK293 (Carreno et al., 2000).

В этом биоанализе антитела блокирующие взаимодействие CTLA-4/CD80 или CD86 сохраняют высвобождение ИЛ-2 в сконструированных клетках Jurkat, отключив ингибирующее плечо CTLA-4.

Анализ высвобождения ИЛ-2:

За 24 ч до скрининга сконструированные Т-клетки культивировали до 5×10^5 клеток/мл в среде для анализа (RPMI1640+10% FBS+PSG). На следующий день клетки HEK293 промывали D-PBS (Irvine Scientific), отделяли трипсином (специальная среда) и блокировали средой для анализа. Затем клетки HEK293 обрабатывали средой для анализа, содержащей 50 мкг/мл Митомицина С, для остановки роста клеток, в течение 1 ч при 37°C/5% CO₂. Затем клетки тщательно промывали средой для анализа, чтобы удалить свободный митомицин С.

Указанные антитела против CTLA-4 и их изотипические контроли серийно разводили 1:3 в среде для анализа с 10-точечным разведением в диапазоне от 15 пМ до 100 нМ. Серийно разведенные антитела добавляли в соответствующие лунки в 96-луночных планшетах с круглым дном (Nunc), содержащим фиксированную концентрацию 300 пМ REGN2281. Репортерные Т-клетки добавляли в чашки с конечной концентрацией 1×10^5 клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 15-30 мин при 37°C/5% CO₂ с последующим добавлением клеток HEK293 с конечной концентрацией $2,5 \times 10^3$ клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 72 ч при 37°C/5% CO₂, и супернатанты собирали и применяли для измерений ИЛ-2. Уровни ИЛ-2 измеряли с применением набора AlphaLISA (PerkinElmer) в соответствии с протоколом производителя. Измерения были получены на считывающем устройстве для многослойных планшетов Envision (PerkinElmer). Все серийные разведения были протестированы в двух повторях.

Значения EC₅₀ мАт CTLA-4 определяли из четырехпараметрического логистического уравнения по 10-точечной кривой доза-эффект с применением GraphPad Prism. Индукцию кратности рассчитывали путем нормализации относительных значений ИЛ-2 каждого образца к образцам, не содержащим анти-CTLA-4 антитело. Табл. 9 демонстрирует индукцию кратности, достигнутую при 100 нМ, и рассчитанные значения EC₅₀, достигнутые в анализе высвобождения чИЛ-2.

Результаты:

Как демонстрируют результаты, представленные в табл. 8, анти-CTLA-4 антитела, протестированные в этом анализе, индуцируют продукцию ИЛ-2 в химере Jurkat/NFAT-Luc/CTLA-4/Raji АПК системе. При концентрации 100 нМ анти-CTLA-4 антитела индуцируют продукцию ИЛ-2 с кратностью активностей в пределах от 4 до 6 раз выше, чем наблюдается в аналитической системе с применением CTLA-4-негативных репортерных Т-клеток. Как продемонстрировано в табл. 8, H1H19303P продемонстрировал лучшие результаты, чем сравниваемые с ним 1 и 2, как было протестировано.

Резюме

Итак, выбранные анти-CTLA-4 антитела были протестированы в двух сконструированных системах биоанализа Т-клеток/АПК, предназначенных для оценки активности антител в отношении активации Т-клеток. В одном формате анти-CTLA-4 антитела активировали Т-клетки, что измеряли по увеличению активности NFAT-люциферазы, что указывает на то, что антитела блокируют взаимодействие между CTLA-4 и лигандами CD80 и CD86. Во втором формате анти-CTLA-4 антитела индуцировали выработку ИЛ-2, что указывает на то, что анти-CTLA-4 антитела могут блокировать взаимодействие CTLA-4/CD80 и CTLA-4/CD86, тем самым сохраняя высвобождение ИЛ-2.

Таблица 7. EC_{50} CTLA-4 мАт в люциферазном анализе CTLA-4 Т-клеток/АПК

Аналитическая система	Т-клетка: Родительская Jurkat/NFATLuc cl.3C7 [M]		Т-клетка: Jurkat/NFAT-Luc hCTLA-4/hCD300 [M]		Т-клетка: Jurkat/NFAT-Luc mfCTLA-4/hCD300 [M]	
	АПК: Raji		АПК: Raji		АПК: Raji	
Антитело 100 нМ	- Fc блокировка	+ Fc блокировка	- Fc блокировка	+ Fc блокировка	- Fc блокировка	+ Fc блокировка
H1H19273P	-	-	2,74E-09	3,83E-09	3,05E-09	1,83E-09
H1H19291P	-	-	2,36E-09	3,92E-09	-	7,67E-09
H1H19313P	-	-	1,69E-09	3,47E-09	1,34E-09	1,84E-09
H1H19303P	-	-	1,61E-09	1,73E-09	1,28E-09	1,77E-09
H1H19319P2	-	-	2,47E-09	4,18E-09	-	4,91E-09
H1H19327P2	-	-	4,20E-09	5,49E-09	-	5,76E-09
COMP1			3,20E-09	3,30E-09	-	3,00E-09
COMP2			1,97E-09	2,07E-09	1,11E-09	1,70E-09
hIgG1 Изотип	-	-	-	-	-	-
hIgG2 Изотип	-	-	-	-	-	-

(-) указывает на то, что значения EC_{50} не могут быть определены из построенной кривой

Таблица 8. Кратность индукции при 100 нМ CTLA-4 мАт и EC_{50} CTLA-4 мАт в анализе высвобождения ИЛ-2 CTLA-4 Т-клеток/АПК

Аналитическая система	Т-клетка: Родительская Jurkat/NFATLuc cl.3C7		Т-клетка: Jurkat/NFAT-Luc hCTLA-4/hCD300		Т-клетка: Jurkat/NFAT-Luc mfCTLA-4/hCD300	
	АПК: HEK293/hCD20		АПК: HEK293/hCD20/hCD80		АПК: HEK293/hCD20/hCD86	
Антитело 100 нМ	EC_{50} [M]	Кратность при 100 нМ	EC_{50} [M]	Кратность при 100 нМ	EC_{50} [M]	Кратность при 100 нМ
H1H19273P	-	0,9	3,33E-08	5,1	1,14E-08	6,5
H1H19303P	-	1,1	4,09E-08	5,4	4,09E-08	4,4
H1H19313P	-	0,9	2,19E-08	5,7	2,19E-08	6,1
H1H19319P2	-	1,6	1,56E-08	4,2	1,56E-08	6,4
COMP1	-	1,3	1,83E-08	4,1	4,63E-08	6,3
COMP2	-	0,9	1,17E-08	5,0	9,71E-08	5,0
hIgG1 Изотип	-	1,2	-	0,8	-	1,1
hIgG2 Изотип	-	0,8	-	1,0	-	1,0

(-) указывает на то, что значения EC_{50} не могут быть определены из построенной кривой

Пример 7. Эффективность анти-CTLA-4 антител против опухолей

В этом примере описана противоопухолевая эффективность иллюстративных анти-CTLA-4 антител по данному изобретению против MC38.Ova опухолей, выращенных на мышах, гуманизированных по гену CTLA-4.

Нок-ин мыши с человеческим CTLA-4^{гум/гум} были сконструированы на основе линии C57BL/6 с применением технологии VelociGene™, при этом указанные мыши экспрессируют химерный белок, со-

державший слитый внеклеточный домен человеческого CTLA-4 с мышинными CTLA-4 трансмембранным и цитоплазматическим доменами из эндогенного локуса *Ctla4* (Valenzuela et al., 2003; Nat. Biotechnol. 21: 652-659). Клеточная линия MC38.Ova была сконструирована путем стабильной лентивирусной трансдукции клеток MC38 для экспрессии трансмембранного куриного антигена овальбумина (Ova).

Исследование (А).

CTLA-4^{гум/гум} нок-ин мышам подкожно (ПК - SC - subcutaneously) имплантировали клетки MC38.Ova (10^6 клеток/мышь) в день 0 и вводили ББ 10 мг/кг или H1H19273P, или H1H19303P, или H1H19319, или 10 мг/кг контрольного изотипа hIgG1 в дни 3, 7, 10, 14 и 17. Объемы опухолей и животных без опухолей контролировали до 37 дней.

Все три анти-CTLA-4 антитела показали частичное ингибирование роста опухоли, протестированное при 10 мг/кг, по сравнению с лечением с изотипическим контролем (фиг. 1). Обработка H1H19303P привела к тому, что 8 из 9 (89%) мышей не имели опухолей в группе с дозой 10 мг/кг к 24 дню (фиг. 2). Обработки H1H19319P или H1H19273P были аналогично эффективными, что приводило к полному ингибированию роста опухоли у 7 из 9 мышей (78%) и 5 из 9 мышей (56%) соответственно к 24 дню. Ни одно из животных не было без опухолей в группе, получавшей изотипический контроль, на 24-й день. Объемы опухолей на сутки 24 были значительно меньше ($p < 0,0001$) для каждой группы лечения анти-CTLA-4 антителом по сравнению с группой, которой вводили изотипический контроль.

Мышей, у которых наблюдали отсутствие опухолей на 24-й день, контролировали в течение 37 дней после имплантации. Коэффициент выживаемости был значительно выше у мышей, получавших любое из антител против человеческого CTLA-4 ($p < 0,0001$), по сравнению с мышами, которым вводили изотипический контроль (фиг. 3). Рецидива опухоли не наблюдалось у всех мышей без опухолей из групп анти-CTLA-4 антител. Никаких признаков потери массы тела не наблюдалось в результате лечения антителами.

Таким образом, лечение каждым из трех антител против человеческого CTLA-4 (H1H19273P, H1H19303P и H1H19319) привело к снижению роста опухоли, улучшению клиренса опухоли и повышению выживаемости по сравнению с изотипическим контролем. Эффективность каждого из трех антител против человеческого CTLA-4 в этой модели была сопоставимой.

Исследование (В).

Типичное анти-CTLA-4 антитело, применяемое для данного исследования, представляет собой полностью человеческое антитело, которое специфично связывается с CTLA-4 человека и содержит HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 из SEQ ID NO: 196-198-200-204-206-208 и HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 194/202 (также известно как H1H19303P). Аминокислотная последовательность полной длины тяжелой цепи H1H19303P (также известная как REGN4659) продемонстрирована в SEQ ID NO: 509, а аминокислотная последовательность полноразмерной легкой цепи H1H19303P продемонстрирована в SEQ ID NO: 510 (табл. 9).

Таблица 9. Аминокислотные последовательности H1H19303P

Ат облас ти	Аминокислотная последовательность
HCVR	SEQ ID NO: 194 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYEMSWVRQAPGKGLEWVSSI RTSGTT KYYADSMKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGGTFLHYWG QGTLVTVSS
LCVR	SEQ ID NO: 202 DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIASYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQTGVP SRFSGSGYGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAQSFPMYTFGGGTGLEIK
HCDR 1	SEQ ID NO: 196 GFTFSNYE
HCDR 2	SEQ ID NO: 198 IRTSGTTK
HCDR 3	SEQ ID NO: 200 AGGGTFLHY
LCDR 1	SEQ ID NO: 204 QGIASY
LCDR 2	SEQ ID NO: 206 AAS
LCDR 3	SEQ ID NO: 208 QQAQSFPMYT
HC	SEQ ID NO: 509 <u>*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYEMSWVRQAPGKGLEWVSS</u> <u>IRTSGTT</u> <u>KYYADSMKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGGTFLHYWG</u> <u>QGTLVTVSS</u>
	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPP CPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
LC	SEQ ID NO: 510 <u>*DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIASYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS</u> <u>SLQTGVP</u> <u>SRFSGSGYGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAQSFPMYTFGGGTGLEIKRTVA</u> APSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

подчеркнутая последовательность - переменная область

Введение и анализ противоопухолевой активности анти-CTLA-4 антител

Противоопухолевая активность H1H19303P была протестирована в различных дозах на нок-ин CTLA-4^{гум/гум} мышах, несущих опухоли MC38.Ova. Изотипический контроль hIgG1 был включен в качестве отрицательного контроля. CTLA-4^{гум/гум} мышам, которым вводили нокдаун, имплантировали ПК на

задний бок 1×10^6 клеток MC38.Ova в день 0 и разделяли на четыре группы обработки (табл. 10). Мышам вводили H1N19303P или ИП (IP - intraperitoneally) изотипического контроля hIgG1 в дни 3, 6, 9, 13 и 16. Объемы опухолей измеряли штангенциркулем два раза в неделю в течение 37 дней. Опухолевых мышей умерщвляли CO₂ или на 37-й день, или при следующих измеряемых параметрах: объемы опухоли >2000мм³ или изъязвление опухоли. Мышей без опухолей прослеживали до 107 дней для исследования выживаемости.

Таблица 10. Схема дозирования для исследования эффективности у CTLA-4^{гум/гум} нок-ин мышей, которым имплантировали клетки MC38.Ova

Группы лечения	Доза	Кол-во мышей/группа	Путь введения	График дозирования	График отбора крови ^а
H1N19303P	2 мг/кг	8	ИП	Дни 3, 6, 9, 13 и 16	Дни -2, 6, 13, 20
H1N19303P	5 мг/кг	8			
H1N19303P	10 мг/кг	8			
hIgG1 Изотипический контроль	10 мг/кг	7			

^аОбразцы сыворотки анализировали на уровни антител с помощью ИФА.

Образцы, собранные в дни 6, 13 и 20, были проанализированы для контрольных групп 10 мг/кг H1N19303P и hIgG1, а образцы, собранные в дни 6 и 20, были проанализированы для групп дозирования 2 мг/кг и 5 мг/кг для H1N19303P.

Образцы крови собирали из подчелюстной вены за два дня до начала эксперимента (день -2) и за два часа до введения антител в дни 6, 13 и 20. Образцы сыворотки замораживали и хранили для последующих измерений уровней антител в сыворотке.

Статистический анализ был выполнен с применением программного обеспечения GraphPad Prism (версия 6). Статистическая значимость различий в объемах опухолей между группами животных была определена однофакторным анализом ANOVA с помощью многократного сравнительного теста Даннетта. Статистическую значимость выживания без опухолей определяли с помощью теста логарифмического ранга (Мантел-Кокса - Mantel-Cox). Чтобы определить, значительно ли каждая группа отличалась от контрольной группы, был проведен анализ Мантел-Кокса в двух группах с уровнем значимости ($\alpha=0,05$), скорректированным на количество сравнений ($k=6$), с применением метода Бонферрони ($\alpha_{\text{с поправкой}}=0,05/6$).

Сывороточная концентрация всего человеческого IgG-антитела

Концентрацию в сыворотке всех антител к контрольному изотипу H1N19303P и hIgG1 определяли с помощью сэндвич-ИФА, специфичного для обнаружения человеческого Fc γ . Образцы сыворотки, собранные в дни 6, 13 и 20, были проанализированы для контрольных групп 10 мг/кг H1N19303P и hIgG1, а образцы, собранные в дни 6 и 20, были проанализированы для групп дозирования 2 и 5 мг/кг H1N19303P. Вкратце, козье поликлональное антитело против человеческого Fc γ в концентрации 1 мкг/мл в PBS пассивно адсорбировали на планшете для микротитрования в течение ночи при 4°C с последующим неспецифичной блокировкой с 5% BSA в PBS. Стандартом, применяемым для калибровки в этом анализе, был H1N19303P или антитело изотипического контроля в концентрациях от 2,7 до 350 нг/мл (серийное разведение 1:2). Серийные разведения стандартов и образцов сыворотки готовили в буфере для разведения (0,5% BSA в PBS). Затем образцы добавляли в планшет с покрытием против hFc γ (100 мкл/лунку) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Впоследствии антитела человеческого IgG, захваченные на планшете, детектировали с применением 160 нг/мл конъюгированного с HRP поликлонального антитела против hFc γ в буфере для разведения. Хромогенный HRP-субстрат, 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин (TMB) применяли для определения активности HRP, и полученный OD₄₅₀ считывали на многопараметрическом планшетном-ридере Perkin Elmer Victor X4. Самая низкая концентрация стандарта (H1N19303P или антитела изотипического контроля), применяемого для калибровки (2,7 нг/мл), находилась в динамическом диапазоне анализа и была определена как НПКО (lower limit of quantification) этого анализа. Данные были проанализированы с помощью нелинейной регрессии с применением программного обеспечения GraphPad Prism. Средние концентрации из 2 повторных экспериментов были применены для анализа.

Сывороточная концентрация мышинных антител против человека

Титры IgG у мыши анти-H1N19303P или анти-hIgG1 контрольных антител определяли с помощью сэндвич-ИФА, специфичного для определения каждого из введенных антител. Образцы сыворотки, собранные в дни 6, 13 и 20, были проанализированы для контрольных групп 10 мг/кг H1N19303P и hIgG1, а образцы, собранные в дни 6 и 20, были проанализированы для групп дозирования 2 и 5 мг/кг H1N19303P. Вкратце, H1N19303P или контрольное антитело против IgG1 в концентрации 1 мкг/мл в PBS пассивно адсорбировали на планшете для микротитрования в течение ночи при 4°C с последующим неспецифичным блокированием 5% бычьим сывороточным альбумином (BSA) в PBS. Серийные разведения образ-

цов сыворотки готовили в буфере для разведения (0,5% BSA в PBS), начиная с 1:500. Следовательно, соответствующий коэффициент разведения (500) был определен как нижний предел определения (PRO-limit of detection) анализа. Затем образцы добавляли в планшеты, покрытые контрольным антителом H1N19303P или анти-IgG1 (100 мкл/лунку), и инкубировали 16-18 ч при 4°C. Лунки с добавлением только буфера для разведения были включены для определения фона анализа. Затем иммобилизованные на планшете мышиные IgG детектировали с применением конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP - horseradish peroxidase) козьего поликлонального антитела против мышиного Fcγ в концентрации 40 нг/мл. Хромогенный HRP-субстрат ТМВ применяли для определения активности HRP, и результирующую оптическую плотность при 450 нм (OD₄₅₀) считывали на многопараметрическом планшетном-ридере Perkin Elmer Victor X4. Данные сигнала связывания в зависимости от коэффициента разбавления анализировали нелинейной регрессией с применением программного обеспечения GraphPad Prism и рассчитывали титры. Титр МАНА определяли как рассчитанный коэффициент разбавления образца сыворотки, соответствующий сигналу связывания, эквивалентному удвоенному фоновому сигналу анализа.

Результаты

CTLA-4^{гум/гум} нок-ин мышам подкожно (ПК - SC - subcutaneously) имплантировали клетки MC38.Ova (10⁶ клеток/мышь) в день 0 и вводили ИП 2, 5 или 10 мг/кг H1N19303P или 10 мг/кг изотипического контроля hIgG1 в дни 3, 6, 9, 13 и 16. Объемы опухолей контролировали в течение 37 дней, а животных без опухолей контролировали в течение вплоть до 107 дней.

H1N19303P продемонстрировал частичное ингибирование роста опухоли при всех испытанных дозах (фиг. 4) по сравнению с лечением с изотипическим контролем. Обработка H1N19303P привела к тому, что 5 из 8 (63%) мышей не имели опухолей в группах, получавших дозу 5 и 10 мг/кг, и 2 из 8 (25%) мышей не имели опухолей в группе, получавшей дозу 2 мг/кг к 20 дню. Объемы опухолей на 20-й день были значительно меньше ($p < 0,0001$) для групп, получавших лечение H1N19303P, по сравнению с группой, которой вводили изотипический контроль (фиг. 5).

Мыши, у которых на 20-й день наблюдалось отсутствие опухолей, подвергались мониторингу в период до 107 дней после имплантации. Коэффициент выживаемости был значительно выше у мышей, получавших H1N19303P ($p < 0,0001$), по сравнению с мышами, которым вводили изотипический контроль (фиг. 6). Рецидива опухоли не наблюдалось у 24 из 25 мышей без опухолей из всех групп доз. Никаких признаков потери массы тела не наблюдалось в результате лечения антителами.

Таким образом, профилактическое лечение H1N19303P значительно уменьшало рост опухоли дозозависимым образом, улучшало клиренс опухоли и улучшало выживаемость по сравнению с изотипическим контролем.

Оценка концентрации сывороточных антител и МАНА с помощью ИФА

Образцы сыворотки, собранные в дни 6, 13 и 20, анализировали на концентрации H1N19303P и изотипический контроль, а также на титры МАНА с применением ИФА. Концентрацию антитела изотипического контроля H1N19303P и hIgG1 в сыворотке крови определяли с помощью сэндвич-ИФА, специфичного для обнаружения человеческого IgG (фиг. 7). Специфичные мышиные титры IgG к контрольному антителу H1N19303P или IgG1 определяли, применяя сэндвич-ИФА, специфичный для обнаружения каждого антитела (фиг. 8).

На 6-й день H1N19303P и изотипический контроль были обнаружены в сыворотке при всех испытанных дозах, при этом средние концентрации в сыворотке составляли $39,8 \pm 24$, $33,5 \pm 8,9$ и $10,4 \pm 2,9$, наблюдаемые для доз 10, 5 и 2 мг/кг H1N19303P, соответственно (табл. 11).

Таблица 11. Сывороточные концентрации H1N19303P и изотипического контроля

Доза	Вводимые антитела	Средняя концентрация в сыворотке (мкг/мл) ^a		
		День 6	День 13	День 20
10 мг/кг	H1N19303P	$39,8 \pm 24$	$12,0 \pm 13$	$0,21 \pm 0,254$
	Изотипический	$130 \pm 10,4$	$255 \pm 43,4$	$279 \pm 64,4$
	контроль			
5 мг/кг	H1N19303P	$33,5 \pm 8,9$	НТ	≤НПКО
2 мг/кг	H1N19303P	$10,4 \pm 2,9$	НТ	≤НПКО

Продemonстрированные данные представляют собой средние концентрации в сыворотке со стандартным отклонением.

НТ: Не тестировалось;

НПКО: Нижний предел количественного определения

Таблица 12. Средний титр мышинных анти-Н1Н19303Р и антиизотипический контроль антител

Доза	Вводимое антитело	Средний титр ^а		
		День 6	День 13	День 20
10 мг/кг	Н1Н19303Р	≤ПРО	39831 ± 24087	711076 ± 352075
	hIgG1 контроль	≤ПРО	≤ПРО	564 ± 658
5 мг/кг	Н1Н19303Р	≤ПРО	НТ	779150 ± 514583
2 мг/кг	Н1Н19303Р	≤ПРО	НТ	878074 ± 409564

^аПоказанные данные представляют собой средние титры со стандартным отклонением.

НТ: Не проверено;

ПРО: Предел обнаружения

После 6-го дня наблюдалось снижение концентраций Н1Н19303Р в сыворотке для всех групп доз к 20-му дню, несмотря на дополнительное введение антител в 6, 9, 13 и 16 дни (табл. 11). Наблюдался быстрый клиренс антител по сравнению с изотипическим контролем для групп с дозой 10 мг/кг. Снижение концентрации Н1Н19303Р в сыворотке крови, вероятно, связано с развитием МАНА (фиг. 8, табл. 12). Титры МАНА наблюдали во все моменты времени, измеренные после 6 дня для всех доз Н1Н19303Р. Однако титры МАНА для изотипического контроля находились на пределе обнаружения во всех протестированных временных точках.

Заключение

Внутрибрюшинное введение Н1Н19303Р в дозах 10 мг/кг, 5 мг/кг или 2 мг/кг привело к снижению роста опухоли, улучшению клиренса опухоли и улучшению выживаемости по сравнению с контролем hIgG1 в CTLA-4^{гум/Нум} нокаутированных мышей, имплантированных опухолевыми клетками MC38.Ova. Концентрации Н1Н19303Р в сыворотке крови со временем снижались, что соответствовало развитию анти-Н1Н19303Р МАНА в моменты времени после 6 дня.

Пример 8. Эффективность комбинированного лечения антителами против мышинного CTLA-4 и антителами против человеческого PD-1 (REGN2810) в PD-1^{гум/гум} нок-ин мышах несущих опухоли MC38.Ova

В этом примере описана противоопухолевая эффективность анти-CTLA-4 антитела в сочетании с антителом против PD-1 у мышей, гуманизированных по гену PD-1. Антитело против PD-1, применяемое в этом исследовании, представляет собой REGN2810 (также известное как цемипилимаб), и оно описано в патенте США 9987500 как H4H7798N. PD-1^{гум/гум} мыши, подвергшиеся воздействию, были описаны в публикации заявки на патент США 2015/0203579.

PD-1^{гум/гум} нок-ин мышам, имплантировали подкожно клетки MC38.Ova (5×10^5 клеток/мышь). Мыши были рандомизированы на 4 группы лечения, когда средний размер опухоли достигал 100 мм³ (16 день лечения). Мышам вводили 10 мг/кг или антитела изотипического контроля, или антимышиного CTLA-4 антитела-mIgG2a (клон 9D9), или антитела против PD-1 человека (REGN2810), или комбинации анти-CTLA-4 антитела мыши и анти-мыши - человеческие антитела к PD-1 (10 мг/кг+10 мг/кг) IP в дни 0, 3, 7, 10 и 14. Объемы опухолей и животных без опухолей контролировали в течение до 22 дней. Объемы опухолей контролировались измерениями штангенциркулем два раза в неделю в течение 22 дней. Монотерапия анти-CTLA-4 антителами или анти-PD-1 антителами показала частичное ингибирование роста опухоли, протестированное при 10 мг/кг, по сравнению с лечением с изотипическим контролем (фиг. 9). Отдельные объемы опухолей на 10-й день после начала лечения (фиг. 10) применяли для статистического анализа, так как это был последний момент времени в исследовании, когда все животные во всех группах были живы. Статистическую значимость определяли с помощью одностороннего ANOVA с множественными сравнениями Даннетта после теста (** p<0,01, **** p<0,0001). Комбинация лечения анти-CTLA-4 и анти-PD-1 антителами приводила к более эффективному ингибированию роста опухоли по сравнению с монотерапией любым антителом со статистически значимыми меньшими опухолями на 10-й день в группе, получавшей комбинированное лечение, чем в группе, лечившейся анти-PD-1 (**** p<0,0001, фиг. 10). У одного из восьми животных в группе, получавшей лечение против CTLA-4, и у 2 из восьми животных в группе, получавшей комбинированную терапию, к 22 дню не было опухолей. Обработка комбинацией анти-CTLA-4 и анти-PD-1 антител также привела к значительному различию в выживаемости животных по сравнению с контрольной группой (тест Мантеля-Кокса, **** p<0,0001, фиг. 11). Никаких признаков потери массы тела не наблюдалось в результате лечения антителами.

Таким образом, лечение комбинацией антител против mCTLA-4 и против PD-1 (REGN2810) приводило к снижению роста опухоли и повышению выживаемости по сравнению с монотерапией любым антителом.

Пример 9. Противоопухолевая эффективность лечения REGN4659 в модели развитой опухоли MC38.Ova с человеческим CTLA-4^{гум/гум} у мышей

Экспериментальный дизайн

Шестидесяти CTLA-4^{гум/гум} мышам подкожно имплантировали 5×10^5 MC38.Ova в бок в день 0. На 10 день отбирали тридцать мышей со средним объемом опухоли 100 мм³ и рандомизировали на 3 группы

лечения (N=10 на группу). В дни 10, 13 и 17 мышам вводили антитела следующим образом: группа 1, изотипический контроль hIgG1 Ат (REGN1932) в дозе 25 мг/кг; группа 2, анти-hCTLA-4 Ат (REGN4659; H1H19303P) в дозе 25 мг/кг; группа 3, анти-hCTLA-4 Ат (REGN4659; H1H19303P) в дозе 10 мг/кг.

Все антитела вводили путем внутрибрюшинной/интраперитонеальной инъекции. Объемы опухолей контролировались измерениями штангенциркулем в течение всего эксперимента (27 дней).

Результаты

Обработка развитых опухолей MC38.Ova REGN4569 привела к частичному ингибированию роста опухоли (фиг. 12).

REGN4659 монотерапия была одинаково эффективной в обеих дозах, 10 мг/кг и 25 мг/кг, в замедлении роста опухоли (фиг. 13).

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с пост-тестом множественного сравнения Тьюки выявил значительную разницу в средних объемах опухолей между каждой группой монотерапии REGN4569 и группой изотипического контроля hIgG1 ($p < 0,05$) в день 21, последний день, когда животные во всех обработанных группах были живы (фиг. 13).

Пример 10. Анализ внутриопухолевых и периферических Т-клеток после обработки REGN4659 развитых подкожных MC38.Ova опухолей в CTLA-4^{гум/гум} мышах

Экспериментальный дизайн

Сорока CTLA-4^{гум/гум} мышам подкожно имплантировали 5×10^5 клеток MC38.Ova в бок в день 0. На 10-й день двадцать мышей со средним объемом опухоли 100 мм³ были отобраны и рандомизированы на 2 группы лечения (N=10/группа). В дни 10 и 13 мышам вводили антитела следующим образом: группа 1, изотипический контроль hIgG1 Ат (REGN1932) в дозе 25 мг/кг; группа 2, анти-hCTLA-4 Ab (REGN4659; H1H19303P) в дозе 25 мг/кг. Все антитела вводили внутрибрюшинно. Объемы опухолей контролировались измерением штангенциркулем. На 17 день, когда опухоли достигли 355 ± 35 мм³ (среднее $\pm$ СОС) в группе hIgG1 и 180 ± 43 мм³ (среднее $\pm$ СОС) в группе, обработанной REGN4659, всех мышей умерщвляли. Опухоли и селезенки собирали для анализа лимфоцитов методом проточной цитометрии. Были приготовлены суспензии отдельных клеток опухолей и селезенки. Клетки обрабатывали 24G.2 (Bioxcell), который блокирует связывание Fc с FcγRIIb и FcγRIII, и затем окрашивали на жизнеспособность с помощью красителя LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell (Invitrogen), а затем коктейлем антител против CD45 (клон 30-F11; Biolegend), C90.2 (клон 30-H12; Biolegend), CD8 (клон 53-6.7; Biolegend), CD4 (GK1.5; Biolegend), CD11b (клон M1/70; Biolegend) и CTLA-4 человека (клон BNI3, BD). Для внутриклеточного окрашивания образцы фиксировали, пермеабилizировали и окрашивали антителами к FoxP3 (клон FJK-16s, Invitrogen) и к человеческому CTLA-4. Затем образцы анализировали на проточном цитометре FACS Canto (BD).

Результаты

Подмножества Т-клеток анализировали в опухолях и селезенке мышей с опухолями MC38.Ova на 17 день после имплантации и обработки антителами REGN4659. Оценка популяции T_{eff} и T_{reg} в месте опухоли и на периферии селезенки показала, что REGN4659, который обладает изотипом hIgG1 (SEQ ID NO: 509, представляет собой полноразмерную аминокислотную последовательность тяжелой цепи H1H19303P, также известную как REGN4659), обеспечивает снижение уровня T_{reg} в опухолевом участке только после двух введений терапевтического антитела в CTLA-4^{гум/гум} мышей, несущих MC38.Ova, (табл. 12). Наблюдается экспансия CD4⁺ эффекторных клеток и CD8⁺ клеток в месте опухоли, тогда как обработка REGN4659 увеличивает популяцию T_{reg} в селезенке. Эти данные демонстрируют, что REGN4659 стимулирует противоопухолевую активность у MC38. Модель опухоли Ova у мышей CTLA-4^{гум/гум} путем избирательного снижения внутриопухолевых T_{reg} наряду с активацией внутриопухолевых эффекторных Т-клеток. Разные результаты REGN4659 по внутриопухолевому количеству T_{reg} по сравнению с T_{reg} селезенки или Т-эффекторными клетками могут быть отнесены к различиям в уровнях экспрессии CTLA-4. Чтобы ответить на этот вопрос, уровень экспрессии CTLA-4 (поверхностный и внутриклеточный) на Т-клетках измеряли с помощью FACS из группы, получавшей hIgG1 контроль. Общая экспрессия CTLA-4 на внутриопухолевых T_{reg} была в около 3 раза выше, чем на внутриопухолевых CD8⁺ и CD4⁺ эффекторных клетках, и около в 8 раз выше, чем на T_{reg} из селезенки (фиг. 14). Это различие в экспрессии может объяснить селективную потерю T_{reg} опухоли по FcγR-зависимому механизму, учитывая высокую аффинность связывания антител с константной областью человеческого IgG1 с мышинными Fcγ рецепторами.

Таблица 13. Блокада CTLA-4 с помощью REGN4659 увеличивает популяцию внутриопухолевых эффекторных CD4⁺ эффекторных и CD8⁺ клеток, но уменьшает популяцию T_{reg}

	Опухоль		
	CD4+Эффектор (**)	CD4+Treg (**)	CD8+ (**)
hIgG1	2,12±0,72	56,82 ±5,14	6,12±0,64
REGN4659	5,83±0,87	35,38±3,08	11,83±1,49
	Селезенка		
	CD4+Эффектор (***)	CD4+Treg (**)	CD8+
hIgG1	10,11±1,33	30,6±1,60	8,73±0,74
REGN4659	14,67±0,78	40,4±0,93	6,99±0,52

Табл. 13 демонстрирует процент CD45⁺ клеток, которые являются CD4⁺FoxP3⁻ (CD4⁺эффектор), процент CD45⁺, которые являются CD8⁺ и процент CD4⁺ клеток, которые являются FoxP3⁺ (CD4⁺T_{reg}). Анализ непарного Т-теста выявил значительную разницу в CD4⁺ эффектора, CD8⁺, CD4⁺T_{reg} в опухолях и в CD4⁺эффектора и CD4⁺ T_{reg} в селезенках между группой REGN4659 и группой, получавшей изотипический контроль (** p<0,005, *** p<0,001).

Пример 11. Изменения в функции Т-клеток и общей системной иммунной активации в селезенках мышей с опухолями, обработанных REGN4659

Экспериментальный дизайн

Двадцать CTLA-4^{гум/гум} мышей были подкожно имплантированы 5×10⁵ MC38.Ova в бок в день 0 и рандомизированы в 2 группы лечения (N=9/группа). В дни 3, 7, 11, 14 и 17 мышам вводили или hIgG1 Ат изотипического контроля (REGN1932) в дозе 10 мг/кг, или анти-hCTLA-4 Ат (REGN4659; H1H19303P) в дозе 10 мг/кг. Все антитела вводили внутривенно. Объемы опухолей контролировались измерениями штангенциркулем. Мышей умерщвляли, начиная с 24 дня (когда опухоль становилась слишком большой) до 37 дня (конец эксперимента). В группе REGN4659 8 из 9 мышей не имели опухолей, тогда как в контрольной группе ни одна из мышей не была свободна от опухолей на 24 день. Уровни экспрессии мышинных генов (нормализованных по экспрессии РНК мышинового циклофилина В) измеряли с помощью ПЦР в реальном времени с Taqman. Непарный t-тест продемонстрировал статистически значимое увеличение относительных уровней FoxP3, CD3ε, перфорина, IFNγ, TNFα, PD-L1, PD-L2 в группе REGN4659 по сравнению с группой изотипического контроля.

Результаты

Анализ Taqman селезенки мышей, обработанных REGN4659, выявил повышенные уровни транскриптов для FoxP3, CD3ε, перфорина, IFNγ, TNFα, PD-L1, PD-L2, что свидетельствует об увеличении эффекторной функции Т-клеток и общей иммуностимулирующей функции REGN4659. Уровни экспрессии мышинных генов (нормализованные по экспрессии РНК мышинового циклофилина В) продемонстрированы в табл. 14. Непарный t-тест продемонстрировал статистически значимое увеличение относительных уровней FoxP3, CD3ε, перфорина, IFNγ, TNFα, PD-L1 и PD-L2 в группе REGN4659 по сравнению с группой изотипического контроля.

Таблица 14. Обработка REGN4659 усиливает адаптивные иммунные ответы in vivo

	FOXP3 (***)	CD3ε (***)	Перфорин (***)	IFNγ (***)	TNFα (***)	PD-L1 (*)	PD-L2 (***)
hIgG1	3,12±0,54	2,72±0,39	2,46±0,35	0,962±0,16	1,98±0,34	2,81±0,59	1,98±0,30
REGN4659	9,15±1,28	11,48±1,57	10,65±1,45	4,33±0,61	6,42±0,88	5,33±0,61	7,46±1,02

Приведено среднее ±COC;

Непарный двухсторонний t-тест;

* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Пример 12. Клинические испытания на человеке анти-CTLA-4 антитела (REGN4659) в комбинации с цемиплимабом (анти-PD-1 антителом) при лечении пациентов с прогрессирующим или метастатическим немелкоклеточным раком легкого

Это исследование представляет собой открытое исследование фазы I, впервые проведенное у человека (FIH - first in human), в котором оценивается REGN4659 (т.е., H1H19303P из примеров 1-7 и 9-11) в монотерапии, высокая доза цемиплимаба (группа C)) в монотерапии, а также комбинация REGN4659 с цемиплимабом в лечении прогрессирующего или метастатического немелкоклеточного рака легкого (HMPЛ -NSCLC - non-small cell lung cancer). Исследование включает в себя как фазу повышения дозы, так и фазу увеличения дозы.

Цемиплимаб (REGN2810; пример 8) представляет собой высокоаффинное полностью человеческое, стабилизированное шарниром антитело IgG4P, направленное на рецептор PD-1, которое сильно

блокирует взаимодействие PD-1 с его лигандами, PD-L1 и PD-L2.

Цели исследования

Основной целью фазы повышения дозы является оценка безопасности, переносимости и фармакокинетики (ФК) только для REGN4659, высокой дозы только одного цемиплимаба и комбинации REGN4659 с цемиплимабом у опытных пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). Основными целями фазы расширения дозы являются оценка предварительной противоопухолевой активности комбинации REGN4659 с цемиплимабом, измеренная с помощью коэффициента объективного ответа (ORR - objective response rate) у пациентов с НМРЛ, получавших иммунотерапию анти-PD-1/PD-L1, и оценить безопасность, переносимость и PK REGN4659 и цемиплимаба у пациентов, получавших анти-PD-1/PD-L1 иммунотерапию от НМРЛ.

Вторичными задачами исследования являются:

- (i) оценка предварительной противоопухолевой активности монотерапии высокими дозами цемиплимаба и комбинации REGN4659 с цемиплимабом, как измерено с помощью ORR, у получавших терапию пациентов с НМРЛ в дозе фазы эскалации,
- (ii) оценка противоопухолевой активности REGN4659 с цемиплимабом по множественным критериям во время повышения и расширения дозы и
- (iii) оценка системных фармакодинамических эффектов REGN4659 и цемиплимаба, измеренных по изменениям биомаркеров периферической крови активации Т-клеток, включая ICOS+ CD4 Т-клетки.

Дизайн исследования

Данное исследование представляет собой открытое исследование фазы I, впервые проведенное у человека (FII), в котором оценивается REGN4659 в монотерапии, высокодозированный цемиплимаб в монотерапии (когорты C) и комбинация REGN4659 с цемиплимабом при лечении развитого или метастатического НМРЛ. Существует 2 фазы этого исследования: фаза повышения дозы у пациентов, прошедших лечение (предшествующая химиотерапия и/или иммунотерапия анти-PD-1/PD-L1) с НМРЛ, и фаза расширения дозы в анти-PD-1/PD-L1 иммунотерапии у получавших терапию пациентов с НМРЛ.

Исследование включает период скрининга до 28 дней (от -28 до -1), затем до семнадцати 42-дневных циклов лечения (до 102 недель лечения) и 24-недельный период наблюдения. Пациент будет получать лечение до завершения 102-недельного периода лечения или до однозначного прогрессирования заболевания, неприемлемой токсичности, отзыва согласия или до достижения другого критерия отмены исследования. После как минимум 24 недель лечения пациенты с подтвержденным полным ответом (CR - complete response) могут решить прекратить лечение и продолжить все соответствующие оценки исследования. Ожидается, что при повышении дозы биопсия опухоли будет выполнена, если не будет противопоказаний с медицинской точки зрения. Биопсия опухоли является обязательной как часть когорты увеличения дозы. Для пациентов, которые испытывают ответ и впоследствии прогрессируют, биопсия опухоли во время прогрессирования будет запрошена, но не обязательна.

Пациенты, которые прогрессируют в течение 6 месяцев после завершения периода лечения для CR, частичного ответа (PR - partial response) или стабильного заболевания (SD - stable disease) после выполнения критериев, определенных в исследовании, и продолжения с определенными посещениями, могут возобновить лечение в рамках исследования после повторного подтверждения соответствующего критерия пригодности для исследования. Пациенты могут получать до 102 недель дополнительной терапии. Возобновленная доза и препарат(ы), как правило, должны быть такими же, как первоначально полученные пациентом, или уровнем дозы, выбранным для расширенной когорты (группы) после обсуждения между спонсором и исследователем.

Пациенты в группе C, которые переносят 2 дозы цемиплимаба (1050 мг Q3W), но впоследствии демонстрируют PD, будут иметь возможность добавить самую высокую комбинированную дозу цемиплимаба и REGN4659, безопасно вводимых до этого момента, в попытке найти ответ с применением комбинированной блокады CTLA-4 и PD-1.

Повышение дозы:

Запланировано восемь возрастающих доз. Три уровня дозы REGN4659 (25, 75 и 250 мг внутривенно [BV - IV intravenously] в фиксированной дозе) будут исследованы с различным графиком каждые 3, 6 и 12 недель (Q3W, Q6W, Q12W) в сочетании с цемиплимабом при 2 уровнях дозы (350 и 1050 мг BV в фиксированной дозе) вводили Q3W. До начала комбинированной когорты с 1050 мг цемиплимаба будет исследована когорта 1050 мг монотерапии цемиплимабом Q3W (когорты C). Для когорты с повышением дозы, обозначенных звездочкой (когорты 1*, 2* и 4*), однократная начальная доза монотерапии REGN4659 будет предшествовать комбинированной терапии на 3 недели для оценки безопасности REGN4659 до комбинации с цемиплимабом. Шесть из 8 групп (1*, C, 2*, 2, 3 и 4*) будут применены для оценки дозоограничивающей токсичности (DLT - dose limiting toxicity). В дополнение к DLT-оцениваемым когортам, 2 дополнительные когорты дозы (5 и 6) будут регистрировать по 6 пациентов для оценки безопасности и ФК/фармакодинамики. Когорты 5 и 6 будут зачислены после установления переносимости когорты 2 и 3 соответственно. Комбинации доз в когортах 5 и 6 представляют потенциальный интерес, даже если допустимы более высокие дозы REGN4659 (когорты 2 и 3). Тем не менее, эти когорты не будут требовать оценки DLT, если когорты 2 и 3 являются допустимыми из-за более низкого

воздействия REGN4659 в когортах 5 и 6. За исключением когорты С, в которую будут включены 6 пациентов, для оценки DLT потребуется минимум 3 пациента в каждой дозовой когорте. Чтобы максимизировать эффективность повышения дозы в фазе 1 при сохранении безопасности пациентов, в каждую когорту дозы будут включены 4 пациента (кроме когорты С), в случае, если пациент прекращает лечение до оценки на DLT. Когорты 3 и 6 (комбинированные когорты с высокой дозой цемиплимаба) не будут начаты, пока все 6 пациентов в когорте С не закончили период DLT. Повышение дозы будет проходить через когорты доз до тех пор, пока не будет достигнута максимальная переносимая доза (MTD - maximal tolerated dose) комбинации или пока не будут протестированы все когорты доз. Тем не менее, даже до завершения увеличения дозы, когорта(ы) дозы могут быть выбраны для расширения после оценки переносимости и фармакодинамической активности для любой когорты.

Дозоограничивающая токсичность:

В дополнение к невозможности введения (из-за изучаемой токсичности лекарственного средства) дозы № 2 в пределах окна, DLT будет рассматриваться при возникновении следующих токсичностей исследования за исключением событий, которые считаются явно связанными с прогрессированием заболевания или интеркуррентной болезнью:

Негематологическая токсичность:

Увеит ≥ 2 степени (рассматривается как потенциальное irAE - immune-related adverse event);

Аспартатаминотрансфераза (AST) или аланинаминотрансфераза (ALT) > чем в 5 раз превышают верхний предел нормы (ULN - upper limit of norm) и/или общий билирубин > чем в 3 раза превышает ULN. Для пациентов с метастазами в печень АСТ, АЛТ и/или общий билирубин >2-кратного исходного значения, если на исходном уровне имеет оценку 2; и

Любая негематологическая токсичность ≥ 3 степени, включая irAE (как определено опытом применения других иммуномодулирующих препаратов, за исключением следующего:

(a) Тошнота, рвота или диарея 3 степени, если только они не являются продолжительными (продолжительностью >72 ч), несмотря на максимальные меры поддерживающей терапии, как предписано лечащим врачом; и

(b) Лабораторные аномалии ≥ 3 степени, которые считаются клинически незначимыми и не соответствуют критериям неблагоприятного события (ПЭ - adverse event).

Гематологическая токсичность:

нейтропения 4 степени, длящаяся более 7 дней;

тромбоцитопения 4 степени;

тромбоцитопения 3-й степени с кровотечением;

фебрильная нейтропения степени ≥ 3 (лихорадка $\geq 38,5^{\circ}\text{C}$ с абсолютным количеством нейтрофилов $<1,0 \times 10^9/\text{л}$) или нейтропения степени ≥ 3 с документированной инфекцией;

анемия 4 степени и

анемия 3 степени, длящаяся более 7 дней или требующая переливания крови.

Если проблемы безопасности возникают в отдельной когорте после оценки DLT, регистрация может быть приостановлена после обсуждения между исследователями и спонсором. Проблемы безопасности, вызывающие паузу, могут включать ранние или поздние события безопасности.

Расширение дозы: Доза когорты может быть выбрана для экспансии после оценки переносимости и фармакодинамической активности (включая, но не ограничиваясь этим, увеличение периферических ICOS⁺ Т-клеток) для любой когорты, за исключением когорты С, которая не будет расширена. Когорта(ы) расширения дозы будет регистрировать пациентов с иммунотерапией анти-PD-1/PD-L1 с НМРЛ, которые прогрессировали, получая терапию анти-PD-1/PD-L1, чтобы определить переносимость и активность комбинированной терапии в этой популяции. Для расширения дозы будет выбрано до 3 отдельных режимов дозирования для определения оптимального комбинированного режима у пациентов с НМРЛ. В когорту (группы) расширения будут включены максимум 27 пациентов, каждый из которых будет включен на основе двухэтапной схемы Саймона. Если проблемы безопасности возникают в отдельной когорте расширения, зачисление может быть приостановлено после обсуждения между исследователями и спонсором. Проблемы безопасности, вызывающие паузу, могут включать ранние или поздние события безопасности.

Продолжительность исследования

Продолжительность исследования составляет около 102 недели, не включая периоды скрининга или наблюдения.

Популяция

Размер выборки:

Ожидается, что до 53 взрослых пациентов будет зарегистрировано во время увеличения дозы, и ожидается, что во время расширения дозы в Соединенных Штатах будет зарегистрировано до 3 когорты расширения до максимум 27 пациентов в каждой когорте. Общее число зарегистрированных пациентов будет зависеть от наблюдаемых DLTs во время повышения дозы, ФК/фармакодинамического анализа, числа открытых когорты расширения и эффективности на стадии 1 двухэтапных когорты расширения Сай-

мона.

Целевая популяция:

Целевая группа для этого исследования - мужчины и женщины ≥ 18 лет с диагнозом неоперабельной стадии IIIВ или IV стадии плоскоклеточного или не плоскоклеточного НМРЛ.

Критерии включения:

Пациент должен соответствовать следующим критериям, чтобы иметь право на включение в исследование:

1. Мужчины и женщины ≥ 18 лет;
2. Пациенты с гистологически или цитологически подтвержденным плоскоклеточным или не плоскоклеточным НМРЛ с неоперабельной стадией IIIВ или IV заболевания;
3. Для повышения дозы (кроме когорты С):

Пациенты ранее получавшие лечение, которые получили не более 3-х линий системной терапии, включая не более 2-х линий цитотоксической химиотерапии, и для которых ожидается, что никакая доступная терапия не принесет клинической пользы. Пациенты, которые ранее получали иммунотерапию PD-1/PD-L1, не должны быть окончательно прекращены из-за связанных с лечением АЕ. Пациенты с мутациями пригодными для воздействия (включая рецептор эпидермального фактора роста [EGFR], ALK и ROS1) допускаются во время повышения дозы, но они должны были дополнительно получить по меньшей мере 1 линию целевой терапии.

а) Примечание: 1) Адъювантная или неоадъювантная химиотерапия или иммунотерапия (после операции и/или лучевой терапии) или 2) категорическая химиолучевая терапия с или без последующей иммунотерапии для III стадии заболевания допустима и не включена в оценку линии терапии у пациентов, у которых развилась рецидивирующая или метастатическая болезнь более 6 месяцев после завершения терапии;

4. Для повышения дозы когорты С: Анти-PD-1/PD-L1 наивные пациенты, которые получали от 1 до 2 линий цитотоксической химиотерапии, включая схему с дублетом платины. Пациенты с пригодными для нацеливания мутациями (включая EGFR, ALK и ROS1) допускаются во время повышения дозы, но они должны были дополнительно получить по меньшей мере 1 линию целевой терапии.

а) Примечание: 1) Адъювантная или неоадъювантная химиотерапия или 2) категорическая химиолучевая терапия для III стадии заболевания является допустимой и не включается в оценку линии терапии у пациентов, у которых развилась рецидивирующая или метастатическая болезнь более чем через 6 месяцев после завершения терапии;

5. Для групп(ы) расширения:

Пациенты ранее получавшие лечение анти-PD-1/PD-L1, которые прогрессировали, получая терапию или в течение 6 месяцев после прекращения терапии для стадии III или IV болезни. Пациенты не должны полностью прекращать анти-PD-1/PD-L1 терапию из-за связанных с лечением АЕ. Пациенты должны были получить одну линию иммунотерапии анти-PD-1/PD-L1. Пациенты также могли получать одну линию химиотерапии. Предварительная комбинированная химиотерапия и иммунотерапия допустимы до тех пор, пока не было получено никаких дополнительных линий одной из терапий, за исключением случаев, описанных в примечании ниже.

а) Примечание: 1) Адъювантная или неоадъювантная химиотерапия или иммунотерапия (после операции и/или лучевой терапии) или 2) категорическая химиолучевая терапия с или без последующей иммунотерапией для III стадии заболевания допустима и не включена в оценку линии терапии у пациентов, у которых развилась рецидивирующая или метастатическая болезнь более 6 месяцев после завершения терапии;

6. Наличие архивных или недавно полученных фиксированных формалином опухолевых тканей, которые ранее не облучались;

7. Для групп(ы) расширения:

По крайней мере 1 рентгенологически измеряемое поражение с помощью компьютерной томографии (КТ) или магнитно-резонансной томографии (МРТ) согласно критериям RECIST

1.1. Целевые поражения могут быть локализованы в ранее облученном поле, если в этом месте зафиксировано (радиографическое) прогрессирование заболевания;

8. Статус производительности Восточной кооперативной онкологической группы (ECOG) ≤ 1 ;

9. Ожидаемая продолжительность жизни не менее 3 месяцев;

10. Адекватная функция органов и костного мозга, как определено ниже:

Гемоглобин ≥ 9.0 г/дл (Примечание: пациенты, которые получили переливания гемоглобина < 9.0 г/дл в течение 14 дней до скрининга лабораторной оценки, не могут быть включены)

Абсолютное количество нейтрофилов $\geq 1,5 \times 10^9/\text{л}$

Количество тромбоцитов $\geq 75\,000/\text{мм}^3$

Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) > 30 мл/мин/1,73 м²

Общий билирубин $\leq 1,5 \times \text{ULN}$ (если метастазы в печени $\leq 3 \times \text{ULN}$), за исключением пациентов с диагнозом клинически подтвержденного синдрома Гилберта AST и ALT $\leq 3 \times \text{ULN}$ или $\leq 5 \times \text{ULN}$, если мета-

стазы в печень

Щелочная фосфатаза $\leq 2,5 \times \text{ULN}$ (или $\leq 5,0 \times \text{ULN}$, если метастазы в печени или кости)

Несоответствие критериям закона Хая (ALT и/или AST $> 3 \times \text{ULN}$ и билирубин $> 2 \times \text{ULN}$);

11. Готовность и возможность соблюдать посещения клиники и связанные с учебной процедуры и

12. Предоставление информированного согласия подписанного пациентом или юридически приемлемым представителем.

Критерии исключения: Пациент, который удовлетворяет любому из следующих критериев, будет исключен из исследования:

1. Только для когорт(ы) расширения:

Пациенты, которые никогда не курили, определяются как курящие ≤ 100 сигарет в течение жизни;

2. Активные или нелеченные метастазы в мозг или сдавливание спинного мозга. Пациенты могут быть включены, если метастазы в центральной нервной системе (ЦНС) адекватно лечатся, и пациенты неврологически возвращаются к исходному уровню (за исключением остаточных признаков или симптомов, связанных с лечением ЦНС), по крайней мере, за 2 недели до включения в исследование. Пациенты не должны быть на терапии (иммуносупрессивные дозы) кортикостероидами;

3. Только для когорт(ы) расширения:

Пациенты с опухолями дали положительный результат на мутации гена EGFR и ALK или слияния ROS1. У всех пациентов должна быть проведена оценка опухоли на мутации EGFR, перестройку ALK и слияния ROS1;

4. Лучевая терапия в течение 2 недель до зачисления и отсутствие восстановления до исходного уровня из-за ПЭ после облучения;

5. Пациенты, которые ранее получали лечение анти-CTLA-4 антителом;

6. Энцефалит, менингит или неконтролируемые судороги в течение года, предшествующего информированному согласию;

7. В анамнезе - интерстициальное заболевание легких (например, идиопатический легочный фиброз, организирующая пневмония) или активный неинфекционный пневмонит, требующий иммуносупрессивных доз глюкокортикоидов для оказания помощи при лечении. В анамнезе радиационный пневмонит в области радиации допускается, если пневмонит был излечен за 6 месяцев до регистрации;

8. Имеющиеся или недавние свидетельства значительного аутоиммунного заболевания, которое требовало лечения системными иммуносупрессантами, что может указывать на риск возникновения связанных с иммунитетом побочных эффектов, возникающих при лечении (irTEAE - immune-related treatment-emergent adverse event). Не являются исключениями следующие: витилиго, детская астма, которая разрешилась, диабет I типа, остаточный гипотиреоз, требующий только гормональной замены, или псориаз, который не требует системного лечения;

9. Пациенты с состоянием, требующим терапии кортикостероидами (> 10 мг преднизона/день или эквивалент) в течение 14 дней после рандомизации. Допускаются физиологические заместительные дозы, даже если они составляют > 10 мг преднизона в день или эквивалентные, если они не вводятся с целью подавления иммунитета. Допускается применение ингаляционных или местных стероидов при условии, что они не предназначены для лечения аутоиммунного заболевания;

10. Только для когорт(ы) расширения:

Другая злокачественная опухоль, которая прогрессирует или требует лечения, за исключением немеланомного рака кожи, который подвергся потенциально излечивающей терапии, или рака шейки матки *in situ* или любой другой опухоли, которую лечили, и пациент, как полагают, находится в полной ремиссии по крайней мере в течение 2 лет до начала исследования и в течение периода исследования дополнительная терапия не требуется;

11. Неконтролируемое заражение вирусом иммунодефицита человека, гепатитом В или гепатитом С; или диагноз иммунодефицита;

Примечания:

Пациенты будут проверены на наличие вируса гепатита С (ВГС) и вируса гепатита В (ВГВ) при скрининге;

Пациенты с известной ВИЧ-инфекцией, у которых есть контролируемая инфекция (неопределяемая вирусная нагрузка (ПНР ВИЧ-РНК) и число CD4 выше 350 или самопроизвольно, или в стабильной антивирусной схеме), допускаются. Для пациентов с контролируемой ВИЧ-инфекцией мониторинг будет проводиться в соответствии с местными стандартами;

Пациенты с гепатитом В (HepBsAg+), которые контролировали инфекцию (ПЦР ДНК вируса гепатита В в сыворотке крови, которая ниже предела обнаружения и получают антивирусную терапию для гепатита В), допускаются. Пациенты с контролируемыми инфекциями должны проходить периодический мониторинг ДНК ВГВ. Пациенты должны оставаться на антивирусной терапии в течение по крайней мере 6 месяцев после последней дозы исследуемого исследуемого препарата;

Пациенты позитивные по антителам к вирусу гепатита С (At+ВГС), у которых имеется контролируемая инфекция (неопределяемая РНК ВГС с помощью ПЦР или спонтанно, или в ответ на успешный

предшествующий курс анти- ВГС -терапии), допускаются.

12. Активная инфекция, требующая системной терапии в течение 14 дней до начала исследования препарата;

13. Связанные с лечением иммуноопосредованные ПЭ от иммуномодулирующих агентов (включая, но не ограничиваясь этим, терапию анти-PD1/PD-L1, другие виды терапии ингибиторами контрольных точек и ингибиторами PI 3K-8), которые не были разрешены до исходного уровня по крайней мере за 3 месяца до начала лечения терапией исследования. Пациенты исключаются из лечения цемиплимабом, если они испытали иммуноопосредованные ПЭ, связанные с предшествующим лечением с применением блокатора пути PD-1/PD-L1, который требовал полной отмены агента, независимо от времени возникновения. Примечание: допускаются пациенты, которые перенесли гипотиреоз или сахарный диабет I типа любой степени тяжести, которые контролируются гормональной заменой;

14. Предшествующее лечение идалализимом (ZYDELIG®) в любое время;

15. В данное время проходит лечение в другом исследовании, или участвовал в исследовании исследуемого агента и получал лечение, или использовал исследовательское устройство в течение 4 недель после первой дозы исследуемой терапии, или получал лечение с одобренной системной терапией в течение 3 недель после первой дозы или получал какую-то или предыдущую системную терапию в течение 5 периодов полувыведения первой дозы исследуемой терапии, в зависимости от того, какая из этих процедур более длительная (за исключением терапии анти-PD-1/PD-L1). Пациенты, ранее получавшие лечение бевацизумабом, цетуксимабом, ритуксимабом или другими неиммуномодулирующими антителами с периодами полувыведения более 7 дней, допускаются после обсуждения со спонсором, если с момента последнего лечения прошло не менее 28 дней. Для опытных пациентов с анти-PD-1/PD-L1 предшествующей терапией анти-PD-1/PD-L1 нельзя назначать в течение 3 недель после первой дозы исследуемой терапии, независимо от периода полувыведения или статуса одобрения препарата;

16. Получение живой вакцины в течение 30 дней после запланированного начала приема исследуемого препарата;

17. Серьезная операция или серьезное травматическое повреждение в течение 4 недель до первой дозы;

18. Известная чувствительность к доксициклину или аналогичным соединениям (то есть тетрациклинам);

19. Документированный аллергический или гиперчувствительный ответ на любые белковые терапии (например, рекомбинантные белки, вакцины, внутривенные иммуноглобулины, моноклональные антитела, рецепторные ловушки);

20. Известные психиатрические расстройства или расстройства, связанные со злоупотреблением психоактивными веществами, которые могут помешать участию в выполнении требований исследования, включая текущее использование запрещенных наркотиков;

21. Предшествующая трансплантация аллогенных стволовых клеток;

22. Любое заболевание, которое, по мнению исследователя, может сделать участие в исследовании не в интересах пациента;

23. Беременные или кормящие женщины;

24. Положительный сывороточный тест на hCG на беременность в начале исследования (цикл 1 дня 1 до введения дозы);

25. Сексуально активные мужчины и женщины с детородным потенциалом*, которые не желают практиковать высокоэффективную контрацепцию до начальной дозы/начала первого лечения, во время исследования и в течение по крайней мере 6 месяцев после последней дозы. Высокоэффективные меры контрацепции включают

стабильное применение комбинированной (содержащей эстроген и прогестоген) гормональной контрацепции (оральной, интравагинальной, трансдермальной) или только прогестогенной гормональной контрацепции (оральной, инъекционной, имплантируемой), связанной с ингибированием овуляции, инициированной за 2 или более менструальных цикла до скрининга;

внутриматочную спираль (BMC - IUD - intrauterine device); внутриматочную гормон-высвобождающую-систему (BMГBC - IUS - intrauterine hormone-releasing system);

двустороннюю перевязку маточных труб;

вазэктомизированный партнер;

и/или сексуальное воздержание †, ‡.

*У женщин в постменопаузе аменорея должна быть не менее 12 месяцев, чтобы не считаться с детородным потенциалом. Тестирование на беременность и контрацепция не требуются женщинам с документированной гистерэктомией или перевязкой маточных труб.

† Половое воздержание считается высокоэффективным методом только в том случае, если оно определяется как воздержание от гетеросексуальных контактов в течение всего периода риска, связанного с исследуемым лечением.

‡ Периодическое воздержание (календарь, симптоматические, постовуляционные методы), абсти-

нения (прерывание полового акта), только спермициды и метод лактационной аменореи (LAM - lactational amenorrhoea method) не являются приемлемыми методами контрацепции.

Женский презерватив и мужской презерватив не должны применяться вместе;

26. Принадлежность к команде исследования клинического участка и/или к его/ее ближайшим родственникам.

Применение терапии

REGN4659: 3 уровня дозы (фиксированная доза 25, 75 и 250 мг в/в) будут исследованы в различных графиках (Q3W, Q6W, Q12W).

Цемиплимаб: 2 уровня дозы (фиксированная доза 350 и 1050 мг внутривенно), вводимая Q3W.

Основные измеряемые параметры

На этапе повышения дозы: Частота DLT, нежелательных явлений, возникающих при лечении (TEAE), irAE, серьезных нежелательных явлений (SAE -serious adverse events), смертельных исходов, лабораторных отклонений (уровень 3 или выше по общим терминологическим критериям для нежелательных явлений [CTCAE -Common Terminology Criteria for Adverse Events]).

На этапе расширения дозы: Коэффициент объективного ответа (ORR -Objective response rate), основанный на критериях оценки ответа в солидных опухолях (RECIST - Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) 1.1, а также на уровне TEAE, irAE, SAE, смертельных исходов, лабораторных отклонений (уровень 3 или выше на CTCAE).

Второстепенные измеряемые параметры

Измерение опухоли на основе нескольких критериев ответа, включая:

- (i) ORR на основе RECIST 1.1 (повышение дозы),
- (ii) ORR на основе Критериев оценки ответа на иммунную терапию (iRECIST),
- (iii) лучший общий ответ (BOR - best overall response), продолжительность ответа (DOR duration of response), степень контроля заболевания и выживаемость без прогрессирования (PFS - progression free survival) на основе RECIST 1.1, iRECIST и
- (iv) общей выживаемости (OS).

Количественное определение % изменения абсолютного количества ICOS+ CD4 T-клеток и других маркеров активации с помощью проточной цитометрии в каждой когорте доз.

Процедуры и оценки

Безопасность и переносимость REGN4659 и цемиплимаба будут контролироваться клинической оценкой АЕ и повторными измерениями клинической оценки, включая показатели жизненно важных функций (температура, кровяное давление, пульс и дыхание), физические осмотры (полные и ограниченные), 12-электродные электрокардиограммы (ЭКГ) и лабораторные оценки, включая стандартную гематологию, химию и анализ мочи.

Противоопухолевая активность будет оцениваться с помощью КТ/МРТ.

Будут собраны образцы крови для определения функционального REGN4659 и функционального цемиплимаба в образцах сыворотки и антител против лекарств (анти-REGN4659 или анти-цемиплимаб).

Сыворотка, плазма, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и биопсия опухолей будут отобраны для анализа биомаркеров. Образец геномной ДНК будет отобран. Предполагаемые фармакодинамические, предсказательные и прогностические биомаркеры, связанные с воздействием, клинической активностью или сопутствующим заболеванием REGN4659 и лечением цемиплимабом, будут исследованы в сыворотке, плазме, МКПК и опухолевой ткани.

Статистический план

Фаза повышения дозы:

Не существует формальной статистической гипотезы для фазы повышения дозы в исследовании; анализ этого этапа будет носить описательный и исследовательский характер. Планируется около 35 пациентов с DLT-оценкой на основе модифицированной схемы 3+3 ("4+3") для каждой когорты с повышением дозы (когорты 1*, 2*, 2, 3 и 4*). Двенадцать пациентов запланированы для когорты 5 и 6 (6 пациентов на группу). Фактический размер выборки этих когорт повышения дозы будет зависеть от документированных DLT, результирующих размеров когорт и количества внедренных уровней дозы.

Фаза расширения дозы:

По словам спонсора, для каждой когорты расширения у пациентов с НМРЛ, которые имели опыт иммунотерапии анти-PD-1/PD-L1 и прогрессировали во время лечения анти-PD-1/PD-L1, поскольку у этих пациентов имеется мало данных об эффективности любой измеримый ORR, превышающий 5%, представляет клинически значимый эффект лечения. Размер выборки из 27 пациентов для каждой когорты расширения определяется с применением двухступенчатого способа минимакса Саймона с односторонним значимым уровнем 5% и мощностью 80%.

Первичный анализ эффективности:

Лучший общий ответ, определенный RECIST 1.1 для когорты расширения, будет суммирован с применением описательной статистики, а также с двусторонним 95% доверительным интервалом.

ORR будет суммироваться с помощью описательной статистики вместе с 95% доверительным интервалом. Пациенты, которые не поддаются оценке для BOR, будут считаться не отвечающими.

Для когорты расширения, если число респондеров больше или равно минимальному количеству респондеров, указанному двухступенчатом способе минимакса Саймона, обработка считается эффективной и заслуживает дальнейшего изучения.

Вторичные анализы эффективности включают ORR, измеренный с помощью iRECIST, DOR, контроля заболеваемости и PFS. Эти вторичные измеряемые параметры эффективности будут обобщенно описываться по возрастанию и расширению когорт.

Наблюдения и измерения безопасности, включая воздействие лекарств, АЕ, лабораторные данные и показатели жизненно важных функций, будут обобщены и представлены в таблицах и списках.

Для фазы повышения дозы: DLT, наблюдаемые в течение периода оценки DLT, будут суммироваться по когорте дозы.

Результаты

В фазе повышения дозы REGN4659 и цемиплимаб будут хорошо переноситься отдельно и в комбинации у опытных пациентов с НМРЛ. В фазе расширения дозы REGN4659 будет хорошо переноситься в комбинации с цемиплимабом и продемонстрирует пригодные для измерения противоопухолевые ответы у пациентов с иммунотерапией против PD-1/PD-1, страдающих НМРЛ.

Иллюстративные варианты осуществления

Данное изобретение также относится к следующим элементам:

Пункт 1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает человеческий белок 4 ассоциированный с цитотоксическими Т лимфоцитами (CTLA-4) и блокирует взаимодействие между hCTLA-4 и лигандом B7-1 и/или лигандом B7-2.

Пункт 2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, которое индуцирует активацию Т-клеток.

Пункт 3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.2, отличающиеся тем, что Т-клетка представляет собой цитотоксическую Т-клетку.

Пункт 4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.2 или п.3, отличающиеся тем, что Т-клетка представляет собой инфильтрирующий опухоль лимфоцит.

Пункт 5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, отличающиеся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывает CTLA-4 обезьяны.

Пункт 6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, отличающиеся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывают CTLA-4-экспрессирующие клетки с EC₅₀ менее 5 нМ.

Пункт 7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, отличающиеся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывают экспрессирующие CTLA-4 клетки с EC₅₀ менее 1 нМ.

Пункт 8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, отличающиеся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывают клетки, экспрессирующие CTLA-4 человека, с EC₅₀ менее 0,5 нМ.

Пункт 9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, отличающиеся тем, что связывают клетки, экспрессирующие CTLA-4 обезьяны, с EC₅₀ менее 0,5 нМ.

Пункт 10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, отличающиеся тем, что являются полностью человеческим антителом.

Пункт 11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурируют за связывание с CTLA-4 человека с эталонным антителом, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 2 и 10,
- (b) SEQ ID NO: 18 и 26,
- (c) SEQ ID NO: 34 и 42,
- (d) SEQ ID NO: 50 и 58,
- (e) SEQ ID NO: 66 и 74,
- (f) SEQ ID NO: 82 и 90,
- (g) SEQ ID NO: 98 и 106,
- (h) SEQ ID NO: 114 и 122,
- (i) SEQ ID NO: 130 и 138,
- (j) SEQ ID NO: 146 и 154,
- (k) SEQ ID NO: 162 и 170,
- (l) SEQ ID NO: 178 и 186,
- (m) SEQ ID NO: 194 и 202,
- (n) SEQ ID NO: 210 и 218,
- (o) SEQ ID NO: 226 и 234,
- (p) SEQ ID NO: 242 и 250,
- (q) SEQ ID NO: 258 и 266,

- (r) SEQ ID NO: 274 и 282,
- (s) SEQ ID NO: 290 и 298,
- (t) SEQ ID NO: 306 и 298,
- (u) SEQ ID NO: 314 и 322,
- (v) SEQ ID NO: 330 и 338,
- (w) SEQ ID NO: 346 и 354,
- (x) SEQ ID NO: 362 и 370,
- (y) SEQ ID NO: 378 и 386,
- (z) SEQ ID NO: 394 и 402,
- (a') SEQ ID NO: 410 и 418,
- (b') SEQ ID NO: 426 и 434,
- (c') SEQ ID NO: 442 и 450,
- (d') SEQ ID NO: 458 и 466,
- (e') SEQ ID NO: 474 и 482 и
- (f) SEQ ID NO: 490 и 498.

Пункт 12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, отличающиеся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с тем же эпитопом на CTLA-4 человека, что и эталонное антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 2 и 10,
- (b) SEQ ID NO: 18 и 26,
- (c) SEQ ID NO: 34 и 42,
- (d) SEQ ID NO: 50 и 58,
- (e) SEQ ID NO: 66 и 74,
- (f) SEQ ID NO: 82 и 90,
- (g) SEQ ID NO: 98 и 106,
- (h) SEQ ID NO: 114 и 122,
- (i) SEQ ID NO: 130 и 138,
- (j) SEQ ID NO: 146 и 154,
- (k) SEQ ID NO: 162 и 170,
- (l) SEQ ID NO: 178 и 186,
- (m) SEQ ID NO: 194 и 202,
- (n) SEQ ID NO: 210 и 218,
- (o) SEQ ID NO: 226 и 234,
- (p) SEQ ID NO: 242 и 250,
- (q) SEQ ID NO: 258 и 266,
- (r) SEQ ID NO: 274 и 282,
- (s) SEQ ID NO: 290 и 298,
- (t) SEQ ID NO: 306 и 298,
- (u) SEQ ID NO: 314 и 322,
- (v) SEQ ID NO: 330 и 338,
- (w) SEQ ID NO: 346 и 354,
- (x) SEQ ID NO: 362 и 370,
- (y) SEQ ID NO: 378 и 386,
- (z) SEQ ID NO: 394 и 402,
- (a') SEQ ID NO: 410 и 418,
- (b') SEQ ID NO: 426 и 434,
- (c') SEQ ID NO: 442 и 450,
- (d') SEQ ID NO: 458 и 466,
- (e') SEQ ID NO: 474 и 482 и
- (f) SEQ ID NO: 490 и 498.

Пункт 13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12, отличающиеся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат:

(а) определяющие комплементарность области (CDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющие аминокислотную последовательность выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 458, 474 и 490; и

(б) CDR варибельной области легкой цепи (LCVR), имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 466, 482 и 498.

Пункт 14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-13, отличающиеся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR тяжелой и легкой цепи пары

аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 2 и 10,
- (b) SEQ ID NO: 18 и 26,
- (c) SEQ ID NO: 34 и 42,
- (d) SEQ ID NO: 50 и 58,
- (e) SEQ ID NO: 66 и 74,
- (f) SEQ ID NO: 82 и 90,
- (g) SEQ ID NO: 98 и 106,
- (h) SEQ ID NO: 114 и 122,
- (i) SEQ ID NO: 130 и 138,
- (j) SEQ ID NO: 146 и 154,
- (k) SEQ ID NO: 162 и 170,
- (l) SEQ ID NO: 178 и 186,
- (m) SEQ ID NO: 194 и 202,
- (n) SEQ ID NO: 210 и 218,
- (o) SEQ ID NO: 226 и 234,
- (p) SEQ ID NO: 242 и 250,
- (q) SEQ ID NO: 258 и 266,
- (r) SEQ ID NO: 274 и 282,
- (s) SEQ ID NO: 290 и 298,
- (t) SEQ ID NO: 306 и 298,
- (u) SEQ ID NO: 314 и 322,
- (v) SEQ ID NO: 330 и 338,
- (w) SEQ ID NO: 346 и 354,
- (x) SEQ ID NO: 362 и 370,
- (y) SEQ ID NO: 378 и 386,
- (z) SEQ ID NO: 394 и 402,
- (a') SEQ ID NO: 410 и 418,
- (b') SEQ ID NO: 426 и 434,
- (c') SEQ ID NO: 442 и 450,
- (d') SEQ ID NO: 458 и 466,
- (e') SEQ ID NO: 474 и 482 и
- (f') SEQ ID NO: 490 и 498.

Пункт 15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14, отличающиеся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, выбранные из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14 и 16 соответственно;
- (b) SEQ ID NO: 20, 22, 24, 28, 30 и 32 соответственно;
- (c) SEQ ID NO: 36, 38, 40, 44, 46 и 48 соответственно;
- (d) SEQ ID NO: 52, 54, 56, 60, 62 и 64 соответственно;
- (e) SEQ ID NO: 68, 70, 72, 76, 78 и 80 соответственно;
- (f) SEQ ID NO: 84, 86, 88, 92, 94 и 96 соответственно;
- (g) SEQ ID NO: 100, 102, 104, 108, 110 и 112 соответственно;
- (h) SEQ ID NO: 116, 118, 120, 124, 126 и 128 соответственно;
- (i) SEQ ID NO: 132, 134, 136, 140, 142 и 144 соответственно;
- (j) SEQ ID NO: 148, 150, 152, 156, 158 и 160 соответственно;
- (k) SEQ ID NO: 164, 166, 168, 172, 174 и 176 соответственно;
- (l) SEQ ID NO: 180, 182, 184, 188, 190 и 192 соответственно;
- (m) SEQ ID NO: 196, 198, 200, 204, 206 и 208 соответственно;
- (n) SEQ ID NO: 212, 214, 216, 220, 222 и 224 соответственно;
- (o) SEQ ID NO: 228, 230, 232, 236, 238 и 240 соответственно;
- (p) SEQ ID NO: 244, 246, 248, 252, 254 и 256 соответственно;
- (q) SEQ ID NO: 260, 262, 264, 268, 270 и 272 соответственно;
- (r) SEQ ID NO: 276, 278, 280, 284, 286 и 288 соответственно;
- (s) SEQ ID NO: 292, 294, 296, 300, 302 и 304 соответственно;
- (t) SEQ ID NO: 308, 310, 312, 300, 302 и 304 соответственно;
- (u) SEQ ID NO: 316, 318, 320, 324, 326 и 328 соответственно;
- (v) SEQ ID NO: 332, 334, 336, 340, 342 и 344 соответственно;
- (w) SEQ ID NO: 348, 350, 352, 356, 358 и 360 соответственно;
- (x) SEQ ID NO: 364, 366, 368, 372, 374 и 376 соответственно;
- (y) SEQ ID NO: 380, 382, 384, 388, 390 и 392 соответственно;
- (z) SEQ ID NO: 396, 398, 400, 404, 406 и 408 соответственно;

- (a') SEQ ID NO: 412, 414, 416, 420, 422 и 424 соответственно;
- (b') SEQ ID NO: 428, 430, 432, 436, 438 и 440 соответственно;
- (c') SEQ ID NO: 444, 446, 448, 452, 454 и 456 соответственно;
- (d') SEQ ID NO: 460, 462, 464, 468, 470 и 472 соответственно;
- (e') SEQ ID NO: 476, 478, 480, 484, 486 и 488 соответственно и
- (f') SEQ ID NO: 492, 494, 496, 500, 502 и 504 соответственно.

Пункт 16. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-15, отличающиеся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 2 и 10,
- (b) SEQ ID NO: 18 и 26,
- (c) SEQ ID NO: 34 и 42,
- (d) SEQ ID NO: 50 и 58,
- (e) SEQ ID NO: 66 и 74,
- (f) SEQ ID NO: 82 и 90,
- (g) SEQ ID NO: 98 и 106,
- (h) SEQ ID NO: 114 и 122,
- (i) SEQ ID NO: 130 и 138,
- (j) SEQ ID NO: 146 и 154,
- (k) SEQ ID NO: 162 и 170,
- (l) SEQ ID NO: 178 и 186,
- (m) SEQ ID NO: 194 и 202,
- (n) SEQ ID NO: 210 и 218,
- (o) SEQ ID NO: 226 и 234,
- (p) SEQ ID NO: 242 и 250,
- (q) SEQ ID NO: 258 и 266,
- (r) SEQ ID NO: 274 и 282,
- (s) SEQ ID NO: 290 и 298,
- (t) SEQ ID NO: 306 и 298,
- (u) SEQ ID NO: 314 и 322,
- (v) SEQ ID NO: 330 и 338,
- (w) SEQ ID NO: 346 и 354,
- (x) SEQ ID NO: 362 и 370,
- (y) SEQ ID NO: 378 и 386,
- (z) SEQ ID NO: 394 и 402,
- (a') SEQ ID NO: 410 и 418,
- (b') SEQ ID NO: 426 и 434,
- (c') SEQ ID NO: 442 и 450,
- (d') SEQ ID NO: 458 и 466,
- (e') SEQ ID NO: 474 и 482 и
- (f') SEQ ID NO: 490 и 498.

Пункт 17. Антитело против CTLA-4 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

- (a) определяющие комплементарность области (CDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 458, 474 и 490; и
- (b) CDR варибельной области легкой цепи (LCVR), имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 466, 482 и 498.

Пункт 18. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.17, отличающиеся тем, что указанное антитело содержит CDR тяжелой и легкой цепи пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 2 и 10,
- (b) SEQ ID NO: 18 и 26,
- (c) SEQ ID NO: 34 и 42,
- (d) SEQ ID NO: 50 и 58,
- (e) SEQ ID NO: 66 и 74,
- (f) SEQ ID NO: 82 и 90,
- (g) SEQ ID NO: 98 и 106,
- (h) SEQ ID NO: 114 и 122,
- (i) SEQ ID NO: 130 и 138,
- (j) SEQ ID NO: 146 и 154,

- (k) SEQ ID NO: 162 и 170,
- (l) SEQ ID NO: 178 и 186,
- (m) SEQ ID NO: 194 и 202,
- (n) SEQ ID NO: 210 и 218,
- (o) SEQ ID NO: 226 и 234,
- (p) SEQ ID NO: 242 и 250,
- (q) SEQ ID NO: 258 и 266,
- (r) SEQ ID NO: 274 и 282,
- (s) SEQ ID NO: 290 и 298,
- (t) SEQ ID NO: 306 и 298,
- (u) SEQ ID NO: 314 и 322,
- (v) SEQ ID NO: 330 и 338,
- (w) SEQ ID NO: 346 и 354,
- (x) SEQ ID NO: 362 и 370,
- (y) SEQ ID NO: 378 и 386,
- (z) SEQ ID NO: 394 и 402,
- (a') SEQ ID NO: 410 и 418,
- (b') SEQ ID NO: 426 и 434,
- (c') SEQ ID NO: 442 и 450,
- (d') SEQ ID NO: 458 и 466,
- (e') SEQ ID NO: 474 и 482 и
- (f') SEQ ID NO: 490 и 498.

Пункт 19. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.17 или 18, отличающиеся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, выбранные из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14 и 16 соответственно;
- (b) SEQ ID NO: 20, 22, 24, 28, 30 и 32 соответственно;
- (c) SEQ ID NO: 36, 38, 40, 44, 46 и 48 соответственно;
- (d) SEQ ID NO: 52, 54, 56, 60, 62 и 64 соответственно;
- (e) SEQ ID NO: 68, 70, 72, 76, 78 и 80 соответственно;
- (f) SEQ ID NO: 84, 86, 88, 92, 94 и 96 соответственно;
- (g) SEQ ID NO: 100, 102, 104, 108, 110 и 112 соответственно;
- (h) SEQ ID NO: 116, 118, 120, 124, 126 и 128 соответственно;
- (i) SEQ ID NO: 132, 134, 136, 140, 142 и 144 соответственно;
- (j) SEQ ID NO: 148, 150, 152, 156, 158 и 160 соответственно;
- (k) SEQ ID NO: 164, 166, 168, 172, 174 и 176 соответственно;
- (l) SEQ ID NO: 180, 182, 184, 188, 190 и 192 соответственно;
- (m) SEQ ID NO: 196, 198, 200, 204, 206 и 208 соответственно;
- (n) SEQ ID NO: 212, 214, 216, 220, 222 и 224 соответственно;
- (o) SEQ ID NO: 228, 230, 232, 236, 238 и 240 соответственно;
- (p) SEQ ID NO: 244, 246, 248, 252, 254 и 256 соответственно;
- (q) SEQ ID NO: 260, 262, 264, 268, 270 и 272 соответственно;
- (r) SEQ ID NO: 276, 278, 280, 284, 286 и 288 соответственно;
- (s) SEQ ID NO: 292, 294, 296, 300, 302 и 304 соответственно;
- (t) SEQ ID NO: 308, 310, 312, 300, 302 и 304 соответственно;
- (u) SEQ ID NO: 316, 318, 320, 324, 326 и 328 соответственно;
- (v) SEQ ID NO: 332, 334, 336, 340, 342 и 344 соответственно;
- (w) SEQ ID NO: 348, 350, 352, 356, 358 и 360 соответственно;
- (x) SEQ ID NO: 364, 366, 368, 372, 374 и 376 соответственно;
- (y) SEQ ID NO: 380, 382, 384, 388, 390 и 392 соответственно;
- (z) SEQ ID NO: 396, 398, 400, 404, 406 и 408 соответственно;
- (a') SEQ ID NO: 412, 414, 416, 420, 422 и 424 соответственно;
- (b') SEQ ID NO: 428, 430, 432, 436, 438 и 440 соответственно;
- (c') SEQ ID NO: 444, 446, 448, 452, 454 и 456 соответственно;
- (d') SEQ ID NO: 460, 462, 464, 468, 470 и 472 соответственно;
- (e') SEQ ID NO: 476, 478, 480, 484, 486 и 488 соответственно; и
- (f') SEQ ID NO: 492, 494, 496, 500, 502 и 504 соответственно.

Пункт 20. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.17-19, отличающиеся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 2 и 10,
- (b) SEQ ID NO: 18 и 26,

- (c) SEQ ID NO: 34 и 42,
- (d) SEQ ID NO: 50 и 58,
- (e) SEQ ID NO: 66 и 74,
- (f) SEQ ID NO: 82 и 90,
- (g) SEQ ID NO: 98 и 106,
- (h) SEQ ID NO: 114 и 122,
- (i) SEQ ID NO: 130 и 138,
- (j) SEQ ID NO: 146 и 154,
- (k) SEQ ID NO: 162 и 170,
- (l) SEQ ID NO: 178 и 186,
- (m) SEQ ID NO: 194 и 202,
- (n) SEQ ID NO: 210 и 218,
- (o) SEQ ID NO: 226 и 234,
- (p) SEQ ID NO: 242 и 250,
- (q) SEQ ID NO: 258 и 266,
- (r) SEQ ID NO: 274 и 282,
- (s) SEQ ID NO: 290 и 298,
- (t) SEQ ID NO: 306 и 298,
- (u) SEQ ID NO: 314 и 322,
- (v) SEQ ID NO: 330 и 338,
- (w) SEQ ID NO: 346 и 354,
- (x) SEQ ID NO: 362 и 370,
- (y) SEQ ID NO: 378 и 386,
- (z) SEQ ID NO: 394 и 402,
- (a') SEQ ID NO: 410 и 418,
- (b') SEQ ID NO: 426 и 43 4,
- (c') SEQ ID NO: 442 и 450,
- (d') SEQ ID NO: 458 и 466,
- (e') SEQ ID NO: 474 и 482 и
- (f') SEQ ID NO: 490 и 498,

Пункт 21. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.17-20, отличающиеся тем, что указанные антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 509, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 510.

Пункт 22. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-21 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Пункт 23. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR антитела, как указано в любом из пп.1-21.

Пункт 24. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует LCVR антитела, как указано в любом из пп.1-21.

Пункт 25. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.23 и/или полинуклеотид по п.24.

Пункт 26. Клетка-хозяин, экспрессирующая вектор по п.25.

Пункт 27. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из пп.1-21 или фармацевтическая композиция по п.22 для применения для ингибирования роста опухоли или опухолевой клетки у субъекта, нуждающегося в этом.

Пункт 28. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция для применения по п.27, при этом опухоль представляет собой первичную или рецидивирующую опухоль.

Пункт 29. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция для применения по п.27, при этом опухоль представляет собой развитую опухоль.

Пункт 30. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.27-29, при этом опухоль присутствует у субъекта с заболеванием или расстройством, выбранным из группы, состоящей из рака крови, рака мозга, почечно-клеточного рака, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака кожи, рака почки, рака шейки матки, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, печеночно-клеточного рака, рака кости, рака толстой кишки, немелкоклеточного рака легких, плоскоклеточного рака головы и шеи, колоректального рака, мезотелиомы, В-клеточной лимфомы, миеломы и меланомы.

Пункт 31. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.27-30, в которых после введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции субъекту в качестве начальной дозы следует одна или несколько вторичных доз, причем каждую вторичную дозу вводят через 1-12 недель после непосредственно предшествующей дозы.

Пункт 32. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию для применения по п.31, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтиче-

скую композицию вводят субъекту в дозе около 25-600 мг.

Пункт 33. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция для применения по любому одному из пп.27-32, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

Пункт 34. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция для применения по п.33, при этом второй терапевтический агент выбран из группы, состоящей из ингибитора LAG3, антитела к опухолеспецифическому антигену, антитела к антигену инфицированных вирусом клеток, ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1, ингибитора CD20, биспецифичного антитела против CD20 и CD3, диетической добавки, такой как антиоксидант, антагониста VEGF, противораковой вакцины, химиотерапевтического средства, цитотоксического средства, облучения, хирургического вмешательства и любой другой терапии, полезной для ослабления по меньшей мере одного симптома, связанного с заболеванием или расстройством.

Пункт 35. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция для применения по п.33 или 34, при этом второй терапевтический агент представляет собой ингибитор PD-1.

Пункт 36. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.33-35, при этом ингибитором PD-1 является цемлиплимаб, ниволумаб или пембролизумаб.

Пункт 37. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция для применения по п.36, при этом ингибитор PD-1 вводят в дозе 1, 3 или 10 мг/кг массы тела субъекта.

Пункт 38. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.33-35, при этом ингибитор PD-1 вводят в дозе 50-1200 мг.

Пункт 39. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.27-38, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция вводится подкожно внутривенно, внутриопухолево, перитуморально, внутриможно, внутривнутрино, перорально, внутримышечно или внутримозгово.

Пункт 40. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из пп.1-21 или фармацевтическая композиция по п.22 для применения при лечении заболевания или расстройства, которое поддается лечению путем антагонизации CTLA-4 у нуждающегося в этом субъекта.

Пункт 41. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция для применения по п.40, при этом заболевание или расстройство представляет собой хроническую вирусную инфекцию, вызванную вирусом, выбранным из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса гепатита С (ВГС), вируса гепатита В (ВГВ), вируса папилломы человека (ВПЧ), вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) и вируса иммунодефицита обезьян (SIV).

Пункт 42. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция для применения по п.40, при этом заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из рака крови, рака мозга, почечно-клеточного рака, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака кожи, рака шейки матки, рака желудка, рака почки, рака простаты, рака молочной железы, рака печени, рака кости, рака толстой кишки, немелкоклеточного рака легких, плоскоклеточного рака головы и шеи, колоректального рака, мезотелиомы, В-клеточной лимфомы и меланомы.

Пункт 43. Способ получения анти-CTLA-4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий выращивание клетки-хозяина по п.26 в условиях, позволяющих получить антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и выделение указанных антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полученного таким образом.

Пункт 44. Способ по п.43, дополнительно включающий приготовление антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в виде фармацевтической композиции, содержащей приемлемый носитель.

Пункт 45. Анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в комбинации с анти-PD-1 антителом при лечении немелкоклеточного рака легких у субъекта, нуждающегося в этом.

Пункт 46. Анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п.45, при этом анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как заявлено в любом из пп.1-21.

Пункт 47. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в по п.45 или 46, при этом анти-CTLA-4 антитело содержит CDR HCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194, и CDR LCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202.

Пункт 48. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в соответствии по любому из пп.45-47, при этом анти-CTLA-4 антитело содержит HCDR1 последовательности SEQ ID NO: 196, HCDR2 последовательности SEQ ID NO: 198, HCDR3 последовательности SEQ ID NO: 200, LCDR1 последовательности SEQ ID NO: 204, LCDR2 последовательности SEQ ID NO: 206 и LCDR3 последовательности SEQ ID NO: 208.

Пункт 49. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из пп.45-48, при этом анти-CTLA-4 антитело содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202.

Пункт 50. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из пп.45-49, при этом анти-CTLA-4 антитело содержит константную область тяжелой цепи человеческого IgG1.

Пункт 51. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из пп.45-50, при этом анти-CTLA-4 антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 509 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 510.

Пункт 52. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому одному из пп.45-51, при этом указанное антитело против PD-1 представляет собой цемиплимаб.

Пункт 53. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из пп.45-52, при этом анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 25-600 мг.

Пункт 54. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из пп.45-53, при этом антитело против PD-1 вводят в дозе 50-1200 мг.

Пункт 55. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому одному из пп.45-54, при этом указанные анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в качестве начальной дозы, после чего следует одна или несколько вторичных доз, при этом каждую вторичную дозу вводят через 1-12 недель после непосредственно предшествующей дозы.

Пункт 56. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из пп.45-55, при этом немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) представляет собой запущенный или метастатический НМРЛ.

Пункт 57. Фармацевтическая композиция по п.22 для применения в комбинации с антителом против PD-1 для лечения немелкоклеточного рака легкого у субъекта, нуждающегося в этом.

Данное изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к описанным в данном документе станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания. Предполагается, что такие модификации подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с белком 4, ассоциированным с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA-4), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

три области, определяющие комплементарность (CDR), тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), которые содержатся в вариательной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194; и

три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), которые содержатся в вариательной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202.

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 196, 198, 200, 204, 206, и 208 соответственно.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR из SEQ ID NO: 194/202.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой моноклональное антитело.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой полностью человеческое антитело.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи человеческого IgG1.

7. Антитело по любому из пп.1-6, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 509.

8. Антитело по любому из пп.1-6, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 510.

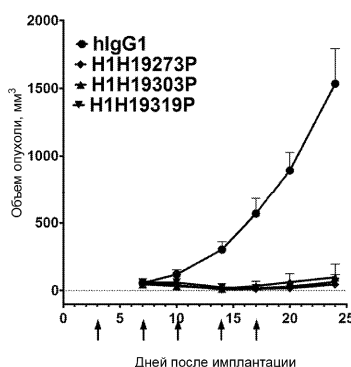
9. Антитело по любому из пп.1-6, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 509 и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 510.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

11. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR антитела, по любому из пп.1-9.

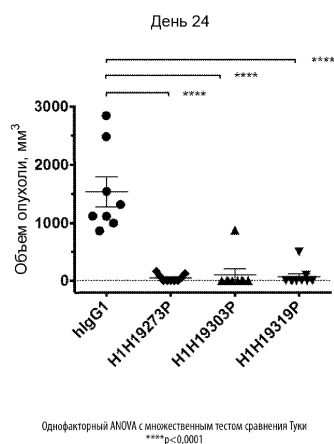
12. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует LCVR антитела, по любому из пп.1-9.

13. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.11 и/или полинуклеотид по п.12.
14. Клетка-хозяин, экспрессирующая вектор по п.13.
15. Клетка-хозяин, экспрессирующая полинуклеотид по пп.11 и 12.
16. Способ получения анти-CTLA-4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий выращивание клетки-хозяина по п.15 в условиях, позволяющих продуцировать указанные антитело или фрагмент, и выделение полученных таким образом антитела или фрагмента.
17. Способ ингибирования роста опухоли или опухолевой клетки у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-9.
18. Способ по п.17, в котором опухоль представляет собой первичную или рецидивирующую опухоль.
19. Способ по п.17, в котором опухоль представляет собой развитую опухоль.
20. Способ по любому из пп.17-19, в котором опухоль присутствует у субъекта с заболеванием или расстройством, выбранным из группы, состоящей из рака крови, рака головного мозга, рака почки, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака простаты, рака молочной железы, печеночно-клеточного рака, рака костей, рака толстой кишки, немелкоклеточного рака легких, плоскоклеточного рака головы и шеи, колоректального рака, мезотелиомы, В-клеточной лимфомы и меланомы.
21. Способ по любому из пп.17-20, в котором указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в виде начальной дозы, за которой следуют одна или несколько вторичных доз, причем каждую вторичную дозу вводят через 1-12 недель после предшествующей дозы.
22. Способ по любому из пп.17-21, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе около 25-600 мг.
23. Способ по любому из пп.17-22, в котором указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации со вторым терапевтическим агентом.
24. Способ по п.23, в котором второй терапевтический агент выбирают из группы, состоящей из ингибитора PD-1, антитела к антигену, специфичному для опухоли, антитела к антигену клетки, инфицированной вирусом, ингибитора PD-L1, ингибитора CD20, биспецифичного антитела против CD20 и CD3, диетической добавки, такой как антиоксидант, антагониста VEGF, химиотерапевтического агента, цитотоксического агента, радиации, НПВП (нестероидного противовоспалительного препарата), кортикостероида и любой другой терапии, полезной для ослабления по меньшей мере одного симптома связанного с указанным заболеванием или расстройством.
25. Способ по п.24, в котором второй терапевтический агент представляет собой ингибитор PD-1.
26. Способ по п.25, в котором ингибитор PD-1 представляет собой цемиплимаб, ниволумаб или пембролизумаб.
27. Способ по п.26, в котором ингибитор PD-1 вводят в дозе 1, 3 или 10 мг/кг массы тела субъекта.
28. Способ по п.26, в котором ингибитор PD-1 вводят в дозе 50-1200 мг.
29. Способ по любому из пп.17-28, в котором указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят подкожно, внутривенно, внутрикожно, внутривнутрибрюшинно, перорально, внутримышечно или внутримозгово.
30. Способ по любому из пп.25-29, где опухоль представляет собой немелкоклеточный рак легких (НМРЛ).
31. Способ по п.30, где ингибитор PD-1 представляет собой цемиплимаб.
32. Способ по п.30 или 31, где НМРЛ представляет собой развитый/продвинутый или метастатический НМРЛ.

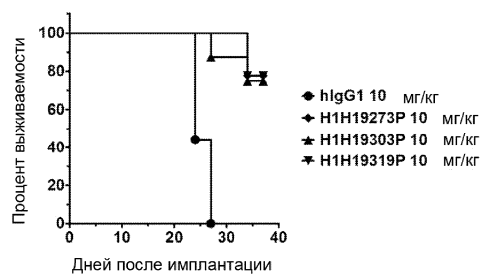


Фиг. 1

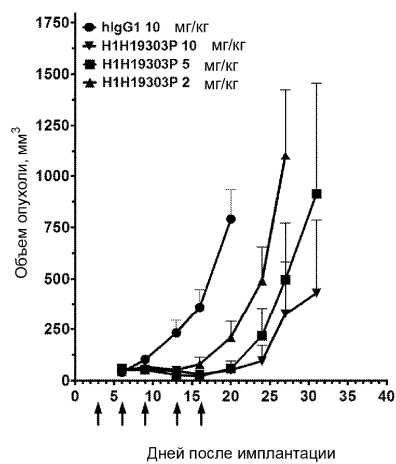
042000



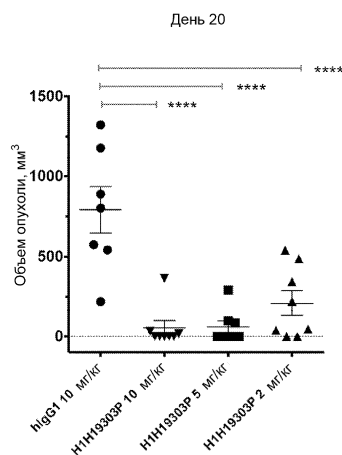
Фиг. 2



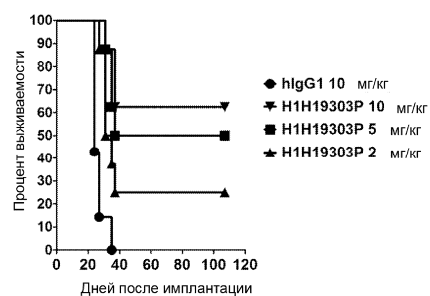
Фиг. 3



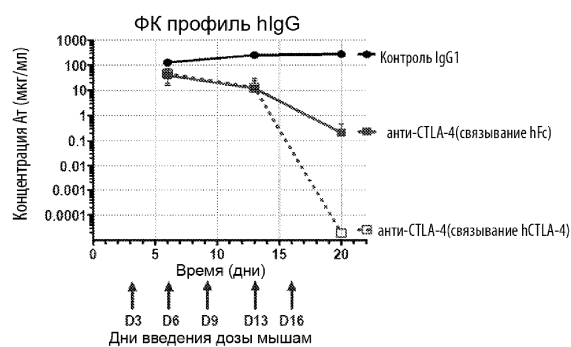
Фиг. 4



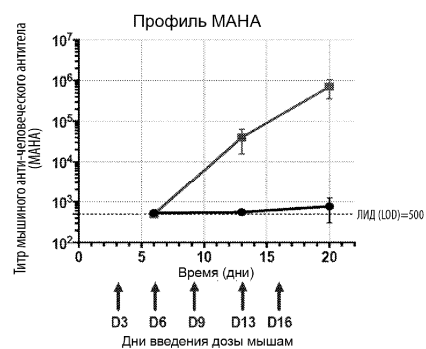
Фиг. 5



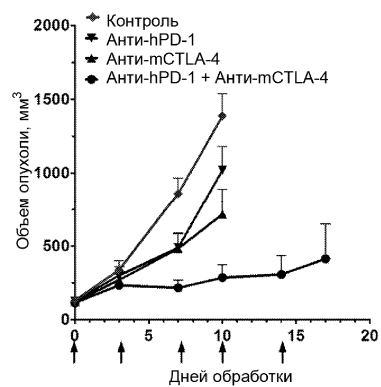
Фиг. 6



Фиг. 7

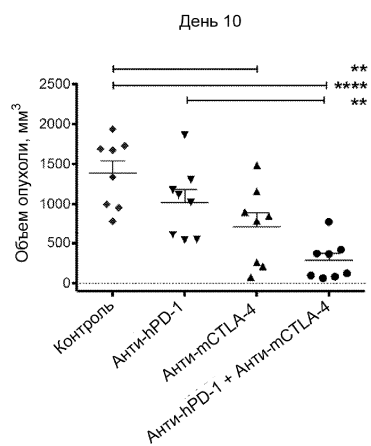


Фиг. 8

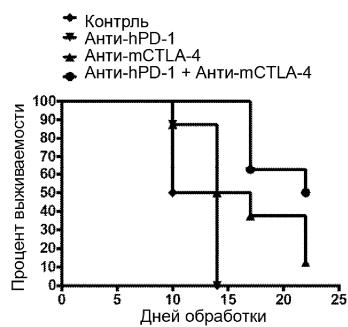


Фиг. 9

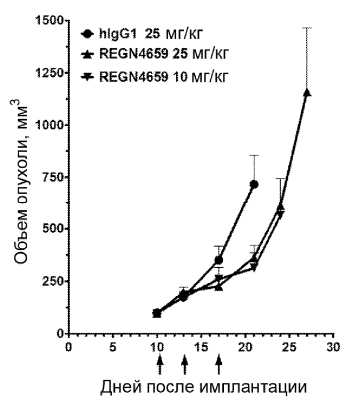
042000



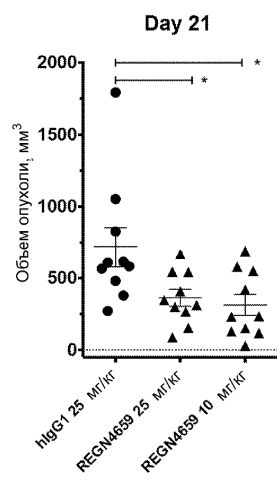
Фиг. 10



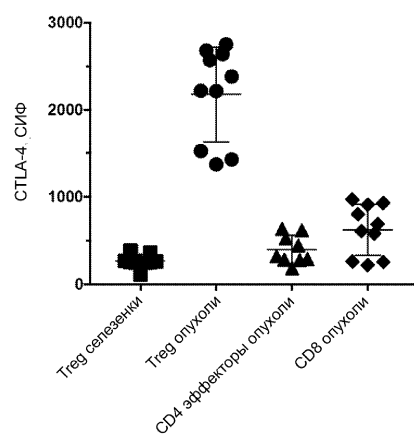
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

