

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291976** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.09.29

(22) Дата подачи заявки
2019.12.27

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(54) АНТИ-CTLA-4 АНТИТЕЛО И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(86) **PCT/JP2019/051447**

(87) **WO 2021/131021 2021.07.01**

(71) Заявитель:
**ЧУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ
КАЙСЯ (JP)**

(72) Изобретатель:
**Кагада Хитоси, Тацуми Канако,
Мацуда Ютака, Симидзу Сюн,
Камимура Масаки, Комори Ясунори,
Хори Юдзи (JP), Игава Томоюки (SG),
Каваути Широки, Сусуму Широаки (JP)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) В заявке описывают анти-CTLA-4 антитела и способы получения и применения этих антител. В заявке также предусматривают нуклеиновые кислоты, кодирующие анти-CTLA-4 антитела и клетки-хозяева, содержащие эти нуклеиновые кислоты. Кроме того, в настоящей заявке предусмотрены полипептиды, содержащие вариант области Fc, и способы получения и применения этих полипептидов.

A1

202291976

202291976

A1

АНТИ-CTLA-4 АНТИТЕЛО И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

5 Область техники

Настоящее изобретение относится к анти-CTLA-4 антителам и способам применение этих антител

Предшествующий уровень техники

10 Клетки, несущие генные мутации и подобные нарушения в живых организмах, отслеживаются и уничтожаются системой иммунного надзора. Однако постоянство чрезмерных иммунных реакций может нанести вред и самому организму, например, повреждение нормальных тканей в результате аутоиммунной реакции. Таким образом, иммунная система снабжена механизмом отрицательной обратной связи (иммунные контрольные точки) для подавления иммунных ответов после активации (см., например
15 NPL 1). Считается, что иммунные контрольные точки играют важную роль в поддержании гомеостаза в иммунной системе. С другой стороны, выясняется, что некоторые опухоли используют иммунные контрольные точки для иммунологического ускользания. В настоящее время активно проводятся обширные исследования иммуносупрессорной функции через молекулы основных иммунных контрольных
20 точек, цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген 4 (CTLA-4), запрограммированную гибель клеток 1 (PD-1) и лиганд-запрограммированную гибель клеток 1 (PD-L1).

CTLA-4 представляет собой гликопротеин, принадлежащий к надсемейству иммуноглобулинов, ген которого был клонирован из библиотеки клонов кДНК Т-
25 клеток-киллеров, полученных от мышей в 1987 г. (см., например, NPL 2). Известно, что иммунный ответ Т-клеток подавляется посредством CTLA-4. В 1996 году сообщалось, что эффект регрессии опухоли наблюдался при введении антитела против CTLA-4 мышам-носителям рака, что соответствует представлению о том, что стимулирование активации Т-клеток путем подавления функции CTLA-4 приводит к регрессии рака
30 (см., например, NPL 3). Оценка эффективности анти-CTLA-4 антител у человека проводится с 2000 года, а моноклональное анти-CTLA-4 антитело человека (ипилимумаб) было одобрено Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в качестве первого в мире иммуностимулирующего терапевтического антитела в 2011 г. Было также произведено

много моноклональных анти-CTLA-4 антител, отличных от ипилиумаба (см., например, PTL 1, 2, 3 и 4), и их разработка в качестве лекарственных средств в настоящее время проводится. Такие лекарственные препараты, которые ингибируют иммунные контрольные точки, чтобы нейтрализовать иммуносупрессивный механизм, тем самым повышая иммунореактивность, называются ингибиторами иммунных контрольных точек.

С другой стороны, ранее было известно, что среди Т-клеток есть клетки, обладающие иммуносупрессорной функцией, и они были идентифицированы как CD25- и CD4-положительные Т-клетки в 1995 г. и названы регуляторными Т-клетками (см., например, NPL 4). В 2003 году был идентифицирован ген Foxp3, который является основным геном и специфически экспрессируется в регуляторных Т-клетках, где регулирует их развитие и функцию. Foxp3 регулирует экспрессию различных генов, связанных с иммунным ответом, в качестве фактора транскрипции. В частности, Foxp3 участвует в конститутивной экспрессии CTLA-4 в регуляторных Т-клетках, и предполагают, что он играет важную роль в иммуносупрессорной функции регуляторных Т-клеток (см., например, NPL 5).

Предполагают, что инфильтрация регуляторных Т-клеток в опухолевые ткани приводит к ослаблению или ингибированию механизма иммунного контроля за опухолью. Действительно, было обнаружено, что во многих карциномах человека наблюдается увеличение количества регуляторных Т-клеток (см., например, NPL 6), и сообщалось, что локальная инфильтрация регуляторных Т-клеток в опухоль может стать плохим прогностическим фактором рака у пациента. И наоборот, если регуляторные Т-клетки могут быть удалены из опухолевых тканей или уменьшены в них, ожидается, что это приведет к усилению противоопухолевого иммунитета. В настоящее время активно развивается иммунотерапия рака, нацеленная на регуляторные Т-клетки.

Введение анти-CTLA-4 антитела, ипилиумаба, усиливает противоопухолевый иммунитет, но сообщалось, что оно вызывает аутоиммунные заболевания, поскольку системно повышает иммунореактивность. В одном клиническом исследовании нежелательные явления наблюдались у 60% пациентов, которым вводили ипилиумаб, причем у многих из них были аутоиммунные заболевания, связанные с кожей или желудочно-кишечным трактом. В другом клиническом исследовании также сообщалось, что примерно у половины пациентов, которым вводили ипилиумаб, развились аналогичные аутоиммунные заболевания. Для подавления таких побочных

эффектов в некоторых случаях пациенту, которому вводили ипилимумаб, вводят иммунодепрессант. Желательна разработка нового лекарственного средства, которое может поддерживать противоопухолевый иммунный ответ, одновременно подавляя такие побочные эффекты ингибиторов иммунных контрольных точек.

5 Цитотоксические эффекторские функции антител IgG, активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC – antibody-dependent cellular cytotoxicity), комплементзависимой цитотоксичности (CDC – complement-dependent cytotoxicity) и антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP – antibody-dependent cellular phagocytosis) привлекают внимание как многообещающие средства для
10 достижения противоопухолевых эффектов с помощью антител (см., например, NPL 7 и 8). Эти эффекторские функции индуцируются связыванием Fc-области антител IgG с рецепторами антител (FcγR), присутствующими на поверхности эффекторных клеток, таких как природные клетки-киллеры и макрофаги, или с различными компонентами комплемента. К настоящему времени было проведено множество исследований
15 вариантов Fc-области, и были получены варианты, обладающие различными свойствами, такими как FcγR-связывающая активность, которая выше чем у дикого типа (см., например, PTL 5 и 6 и NPL 9 и 10). Кроме того, сообщалось, что Fc-область антител связывается с FcγR в соотношении 1:1 и асимметрично распознает FcγR в нижних шарнирных областях и областях CH2 (см., например, NPL 11). На этом
20 основании также сообщалось о способах оптимизации взаимодействия с FcγR путем внесения различных изменений в две полипептидные цепи, составляющие Fc-область антитела, и получения асимметричных вариантов Fc-области (см., например, PTL 7, 8, 9 и 10).

Желательно, чтобы при введении терапевтического антитела в живой организм его
25 антиген-мишень специфически экспрессировался только в местах поражения. Однако во многих случаях один и тот же антиген экспрессируется также в участках, не имеющих поражений, в нормальных тканях и может вызывать побочные эффекты, нежелательные с точки зрения терапии. Например, хотя антитело против опухолевого антигена может проявлять цитотоксическую активность в отношении опухолевых
30 клеток посредством ADCC и т.п., если тот же антиген также экспрессируется в нормальных тканях, антитело может также повреждать нормальные клетки. Для решения вышеуказанной проблемы была разработана технология, которая фокусируется на том явлении, что большое количество того или иного соединения присутствует в ткани-мишени (например, ткани опухоли) и создает

антигенсвязывающую молекулу, у которой изменяется антигенсвязывающая активность в зависимости от концентрации соединения (см., например, PTL 11).

Цитируемая патентная литература:

- 5 [PTL 1] WO 2000/037504
[PTL 2] WO 2001/014424
[PTL 3] WO 2012/120125
[PTL 4] WO 2016/196237
[PTL 5] WO 2000/042072
[PTL 6] WO 2006/019447
10 [PTL 7] WO 2012/058768
[PTL 8] WO 2012/125850
[PTL 9] WO 2013/002362
[PTL 10] WO 2014/104165
[PTL 11] WO 2013/180200

15 Цитируемые научные публикации:

- [NPL 1] Pardoll, *Nat Rev Cancer* (2012) 12: 252-264
[NPL 2] Brunet с соавт., *Nature* (1987) 328: 267-270
[NPL 3] Leach с соавт., *Science* (1996) 271: 1734-1736
[NPL 4] Sakaguchi с соавт., *J Immunol* (1995) 155: 1151-1164
20 [NPL 5] Takahashi с соавт., *J Exp Med* (2000) 192: 303-310
[NPL 6] Nishikawa, Sakaguchi, *Int J Cancer* (2010) 127: 759-767
[NPL 7] Clynes с соавт., *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998) 95: 652-656
[NPL 8] Clynes с соавт., *Nat Med* (2000) 6: 443-446
[NPL 9] Lazar с соавт., *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) 103: 4005-4010
25 [NPL 10] Chu с соавт., *Mol Immunol* (2008) 45: 3926-3933
[NPL 11] Radaev с соавт., *J Biol Chem* (2001) 276: 16469-16477

Краткое описание изобретения

Техническая проблема

- 30 Настоящее изобретение предусматривает анти-CTLA-4 антитела и способы применения этих антител. Настоящее изобретение также предусматривает полипептиды, включающие вариант Fc-области, и способы получения полипептидов.

Решение проблемы

Точнее, настоящее изобретение предусматривает приведенные ниже пункты [1]-[47]:

[1] Анти-CTLA-4 антитело, обладающее активностью по связыванию CTLA-4, которая зависит от концентрации аденозин-содержащего соединения, причем указанное антитело имеет по меньшей мере один признак, выбранный из приведенных ниже (а)-(и):

(а) связывающая активность в присутствии 100 мкМ аденозин-содержащего соединения больше в два раза или более чем в отсутствие аденозин-содержащего соединения;

(б) значение KD в присутствии 100 мкМ аденозин-содержащего соединения составляет 5×10^{-7} М или меньше;

(в) значение KD в отсутствие аденозин-содержащего соединения составляет 1×10^{-6} М или более;

(г) образование тройного комплекса с аденозин-содержащим соединением и CTLA-4;

(д) связывание с областью от аминокислоты в положении 97 до аминокислоты в положении 106 CTLA-4 человека (внеклеточный домен, SEQ ID NO: 28);

(е) конкурирование с АВАМ004 (VH, SEQ ID NO: 10; и VL, SEQ ID NO: 11) за связывание с CTLA-4;

(ж) связывание с тем же эпитопом, что и АВАМ004 (VH, SEQ ID NO: 10; и VL, SEQ ID NO: 11);

(з) проявление цитотоксической активности против CTLA-4-экспрессирующих клеток; и

(и) связывание с CTLA-4 человека или мыши.

[2] Антитело по пункту [1], где антитело является моноклональным антителом.

[3] Антитело по пункту [1] или [2], где антитело является антителом человека, гуманизированным антителом или химерным антителом.

[4] Антитело по любому из пунктов [1]-[3], где антитело является фрагментом антитела, который связывается с CTLA-4.

[5] Антитело по любому из пунктов [1]-[4], где антитело включает: (а) HVR-H1 (SEQ ID NO: 223), содержащую аминокислотную последовательность SX_1TMN , где X_1 означает H, A, R или K; (б) HVR-H2 (SEQ ID NO: 224), содержащую аминокислотную последовательность $SISX_1X_2SX_3YIYYAX_4SVX_5G$, где X_1 означает S или T, X_2 означает

R или Q, X₃ означает G или H, X₄ означает D, E или R и X₅ означает K или R; и (в) HVR-H3 (SEQ ID NO: 225), содержащую аминокислотную последовательность YGX₁REDMLWVFDY, где X₁ означает K или A.

[6] Антитело по пункту [5], которое дополнительно включает: (а) HVR-L1 (SEQ ID NO: 226), содержащую аминокислотную последовательность X₁GX₂STX₃VGDYX₄X₅VX₆, где X₁ означает T, D, Q или E, X₂ означает T или P, X₃ означает D или G, X₄ означает N или T, X₅ означает Y или W, и X₆ означает S или H; (б) HVR-L2 (SEQ ID NO: 227), содержащую аминокислотную последовательность X₁TX₂X₃KPX₄, где X₁ означает E, F или Y, X₂ означает S или I, X₃ означает K или S, и X₄ означает S, E или K; и (в) HVR-L3 (SEQ ID NO: 228), содержащую аминокислотную последовательность X₁TYAAPLGPX₂, где X₁ означает S или Q и X₂ означает M или T.

[7] Антитело по пункту [5], которое дополнительно включает: переменный домен тяжелой цепи FR1, содержащий любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 229-232; FR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 233; FR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 234; и FR4, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 235.

[8] Антитело по пункту [6], которое дополнительно включает: переменный домен легкой цепи FR1, содержащий любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 236-238; FR2, содержащий любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 240 и 241; FR3, содержащий любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 242-244; и FR4, содержащий любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 245 и 246.

[9] Антитело по любому из пунктов [1]-[4], которое включает: (а) VH, которая по меньшей мере на 95% идентична любой аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 83-86, 98 и 135-141; (б) VL, которая по меньшей мере на 95% идентична любой аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 88-95, 97, 99, 134 и 144-149; или (в) VH, имеющую любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 83-86, 98 и 135-141, и VL, имеющую любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 88-95, 97, 99, 134 и 144-149.

[10] Антитело по любому из пунктов [1]-[3] и [5]-[9], которое является антителом IgG1 полной длины.

[11] Антитело по пункту [10], в котором Fc-область является вариантом Fc-области, содержащей изменение (изменения) аминокислоты, и где вариант Fc-области обладает повышенной связывающей активностью по меньшей мере с одним

рецептором Fcγ, выбранным из группы, состоящей из FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa, по сравнению с нативной Fc-областью.

[12] Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пунктов [1]-[11].

5 [13] Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по пункту [12].

[14] Способ получения антитела, включающий культивирование клеток-хозяев по пункту [13] таким образом, чтобы продуцировалось антитело.

[15] Фармацевтический состав, включающий антитело по любому из пунктов [1]-[11], и фармацевтически приемлемый носитель.

10 [16] Фармацевтический состав по пункту [15], в котором антитело является иммуноконъюгатом.

[17] Фармацевтический состав по пункту [15] или [16], где фармацевтический состав используют в комбинации по крайней мере с одним агентом из группы, состоящей из ингибиторов иммунных контрольных точек, ингибиторов EGFR, ингибиторов HER2 и химиотерапевтических агентов.

[18] Фармацевтический состав по любому из пунктов [15]-[17], причем фармацевтический состав применяют для лечения опухоли.

[19] Фармацевтический состав по пункту [18], причем опухоль представляет собой солидную опухоль, в которую инфильтрированы регуляторные Т-клетки (Treg).

20 [20] Фармацевтический состав по любому из пунктов [15]-[17], причем фармацевтический состав предназначен для повреждения клеток.

[21] Фармацевтический состав по любому из пунктов [15]-[17], причем фармацевтический состав предназначен для повреждения клеток Treg.

25 [22] Фармацевтический состав по пункту [20], причем повреждение клеток обусловлено активностью ADCC, активностью CDC или активностью ADCP.

[23] Фармацевтический состав по пункту [20] или [21], причем иммунитет активируется повреждением клеток Treg.

[24] Фармацевтический состав по любому из пунктов [15]-[17], причем фармацевтический состав предназначен для применения при активации иммунитета.

30 [25] Фармацевтический состав по пункту [24], где активация иммунитета представляет собой активацию Т-клеток.

[26] Фармацевтический состав по пункту [24] или [25], причем иммунитет в опухолевой ткани активируется.

[27] Фармацевтический состав по любому из пунктов [24]-[26], причем уровень активации иммунитета в неопухолевых тканях ниже, чем уровень активации иммунитета под действием фармацевтической композиции, содержащей контрольное анти-CTLA-4 антитело.

5 [28] Фармацевтический состав по любому из пунктов [24]-[27], причем уровень побочного эффекта ниже по сравнению с уровнем побочного эффекта под действием фармацевтической композиции, содержащей контрольное анти-CTLA-4 антитело.

10 [29] Фармацевтический состав по любому из пунктов [24]-[28], причем контрольное анти-CTLA-4 антитело представляет собой анти-CTLA-4 антитело, которое не обладает связывающей активностью в отношении CTLA-4, которая зависит от концентрации аденозин-содержащего соединения.

[30] Фармацевтический состав по пункту [29], причем побочным эффектом является аутоиммунное заболевание.

15 [31] Фармацевтический состав по любому из пунктов [18], [19] и [26]-[30], причем опухоль является раком груди или раком печени.

[32] Полипептид, который содержит вариант Fc-области, содержащий изменения аминокислот в исходной Fc-области, причем исходная Fc-область состоит из двух полипептидных цепей, и этот вариант Fc-области содержит аминокислотные изменения в следующих положениях:

20 (i) положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307 и 326 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области; а также

(ii) положениях 236, 250, 270, 298, 307, 326 и 334 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

25 [33] Полипептид по пункту [32], причем вариант Fc-области дополнительно содержит изменение аминокислоты в положении 332 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области.

[34] Полипептид по пункту [32] или [33], причем вариант Fc-области дополнительно содержит изменение аминокислоты в положении 332 в соответствии с нумерацией EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

30 [35] Полипептид по любому из пунктов [32]-[34], причем вариант Fc-области дополнительно содержит изменение аминокислоты в положении 330 в соответствии с нумерацией EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

[36] Полипептид по любому из пунктов [32]-[35], причем вариант Fc-области дополнительно содержит изменение аминокислоты в положении 356 в соответствии с нумерацией EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

5 [37] Полипептид по любому из пунктов [32]-[36], причем вариант Fc-области дополнительно содержит изменение аминокислоты в положении 366 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области.

[38] Полипептид по любому из пунктов [32]-[37], причем вариант Fc-области дополнительно содержит изменение аминокислоты в положении 439 в соответствии с нумерацией EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

10 [39] Полипептид по любому из пунктов [32]-[38], причем вариант Fc-области дополнительно содержит изменение аминокислоты в положениях 366, 368 и 407 в соответствии с нумерацией EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

[40] Полипептид по любому из пунктов [32]-[39], включающий по меньшей мере одно изменение аминокислоты, выбранное из следующих изменений аминокислот:

15 (i) Tyr или Phe в положении 234, Gln в положении 235, Trp в положении 236, Met в положении 239, Val в положении 250, Asp в положении 268, Glu в положении 270, Ala в положении 298, Pro в положении 307, Asp в положении 326, Glu в положении 332, Cys в положении 349, Lys в положении 356 и Trp в положении 366 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области; а также

20 (ii) Ala в положении 236, Val в положении 250, Glu в положении 270, Ala в положении 298, Pro в положении 307, Asp в положении 326, Met или Lys в положении 330, Asp или Glu в положении 332, Glu в положении 334, Cys в положении 356, Ser в положении 366, Ala в положении 368, Val в положении 407 и Glu в положении 439 в соответствии с нумерацией EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

25 [41] Полипептид по любому из пунктов [32]-[40], причем вариант Fc-области дополнительно содержит любое из аминокислотных изменений от (a) до (г), приведенных ниже, в первом полипептиде и/или втором полипептиде исходной Fc-области:

(a) Ala в положении 434 согласно нумерации EU;

30 (б) Ala в положении 434, Thr в положении 436, Arg в положении 438 и Glu в положении 440 согласно нумерации EU;

(в) Leu в положении 428, Ala в положении 434, Thr в положении 436, Arg в положении 438 и Glu в положении 440 согласно нумерации EU; а также

(г) Leu в положении 428, Ala в положении 434, Arg в положении 438 и Glu в положении 440 согласно нумерации EU.

[42] Полипептид по любому из пунктов [32]-[41], причем связывающая активность по меньшей мере с одним рецептором Fc γ , выбранным из группы, состоящей из Fc γ RIa, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb и Fc γ RIIIa, повышена у варианта Fc-области по сравнению с таковой в исходной Fc-области.

[43] Полипептид по пункту [42], причем связывающая активность с Fc γ RIIa и Fc γ RIIIa повышена в варианте Fc-области по сравнению с таковой в исходной Fc-области.

[44] Полипептид по любому из пунктов [32]-[43], причем селективность между активирующим рецептором Fc γ и ингибирующим рецептором Fc γ улучшается в варианте Fc-области по сравнению с исходной Fc-областью.

[45] Полипептид по пункту [44], причем активирующий рецептор Fc γ представляет собой по меньшей мере один рецептор Fc γ , выбранный из группы, состоящей из Fc γ RIa, Fc γ RIIa и Fc γ RIIIa, где ингибирующий рецептор Fc γ представляет собой Fc γ RIIb.

[46] Полипептид по любому из пунктов [32]-[45], где полипептиды, включающие вариант Fc-области, являются антителом.

[47] Способ получения полипептида, содержащего вариант Fc-области, включающий введение аминокислотных изменений в исходную Fc-область, причем исходная Fc-область состоит из двух полипептидных цепей, и аминокислотные изменения вводят в исходную Fc-область в следующие положения:

(i) положения 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307 и 326 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области; а также

(ii) положения 236, 250, 270, 298, 307, 326 и 334 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

Краткое описание фигур

Фигура 1. Связывающая активность анти-CTLA-4 антител АВАМ004 CTLA-4, причем активность связывания зависит от концентрации АТФ, АДФ или АМФ, как описано в примерах 1-9.

Фигура 2. Связывающая активность анти-CTLA-4 антитела АВАМ004 с клетками, экспрессирующими CTLA-4, причем связывающая активность зависит от концентрации АМФ, как описано в примерах 1-10.

Фигура 3. Активность ADCC анти-CTLA-4-антитела АВАМ004 в отношении клеток, экспрессирующих CTLA-4, в присутствии и в отсутствие АМФ, как описано в примерах 1-11.

5 Фигура 4. Способ связывания Fab-фрагмента АВАМ004 и АМР, как описано в примерах 2-13. На фигуре тяжелая цепь антитела обозначена черным цветом, легкая цепь – серым, а АМФ – в шаростержневой модели. Аминокислотные остатки, образующие взаимодействие с АМФ, указаны в стержневой модели. Пунктирные линии и их значения показывают расстояние (\AA) между каждым аминокислотным остатком и АМФ.

10 Фигура 5. Характер связывания Fab-фрагмента АВАМ004, АМФ и CTLA4 человека (hCTLA4), как описано в примерах 2-14. На фигуре тяжелая цепь антитела обозначена черным цветом, легкая цепь - серым цветом, hCTLA4 - белым цветом, а АМФ в шаростержневой модели. Аминокислотные остатки hCTLA4, содержащие один или несколько атомов, не являющихся атомами водорода, расположенными на
15 расстоянии $4,2 \text{\AA}$ от любой части антитела или АМФ, взяты в качестве эпитопа и указаны в стержневой модели.

Фигура 6. Картирование эпитопа Fab-фрагмента АВАМ004 в аминокислотной последовательности hCTLA4, как описано в примерах 2-14. На фигуре черным цветом обозначены аминокислотные остатки hCTLA4, которые содержат один или несколько атомов, не являющихся атомами водорода, расположенных на расстоянии $4,2 \text{\AA}$ от
20 любой части АВАМ004 или АМФ в кристаллической структуре. Аминокислотные остатки, выделенные серым цветом, показывают остатки, модель которых не была построена из-за неупорядоченности их кристаллической структуры.

Фигура 7. Наложенный рисунок структур антитела и АМФ, извлеченных из
25 кристаллических структур только Fab-фрагмента АВАМ004, комплекса Fab-фрагмента АВАМ004 и АМФ и тройного комплекса Fab-фрагмента АВАМ004, АМФ и CTLA4, как описано в примере 2-15. На рисунке тяжелая цепь антитела обозначена черным цветом, легкая цепь — серым, а АМР – в виде шаростержневой модели. Структура Fab-фрагмента АВАМ004 показана тонкой линией, структура бинарного комплекса с АМР –
30 средней по толщине линией, а структура тройного комплекса - толстой линией.

Фигура 8. Связывающая активность анти-CTLA-4 антитела АВАМ004 и его варианта 04Н0150/04L0072 с CTLA-4, причем активность связывания зависит от концентрации АТФ, АДФ или АМФ, как описано в примере 3-2. В обозначениях на рисунке WT и H150L072 обозначают АВАМ004 и 04Н0150/04L0072, соответственно.

Фигура 9. Нейтрализующая активность анти-CTLA-4-антитела SW1077 в отношении CTLA-4, причем нейтрализующая активность зависит от концентрации АТФ, как описано в примерах 3-6.

5 Фигура 10. Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4-антитела mNS-mFa55 (контрольное антитело) на мышинной модели, трансплантированной клеточной линией FM3A, как описано в примере 3-7-4. Антитело вводят в дозах 0,01 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,25 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг, 30 мг/кг и 100 мг/кг через хвостовую вену. Каждая точка представляет собой средний объем опухоли в группе, n = 4.

10 Фигура 11. Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4-антитела SW1208-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией FM3A, как описано в примере 3-7-4. Антитело вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг, 100 мг/кг и 500 мг/кг через хвостовую вену. Каждая точка представляет собой средний объем опухоли в группе, n = 4.

15 Фигура 12. Изменения в соотношении эффекторных клеток Treg в опухоли при введении анти-CTLA-4-антитела mNS-mFa55 (контрольное антитело) или SW1208-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией FM3A, как описано в примере 3-7-7. Антитело mNS-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг и 100 мг/кг через хвостовую вену, а антитело SW1208-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг, 100 мг/кг и 500 мг/кг через хвостовую вену.
20 Опухоль исследуют через шесть дней после введения и оценивают увеличение или уменьшение эффекторных Treg с помощью анализа FACS. Продольная ось представляет отношение эффекторных клеток Treg ($CD4^+ FoxP3^+ KLRG1^+$) к клеткам $CD45^+$. Показано среднее значение n = 3.

25 Фигура 13. Изменения в соотношении активированных хелперных Т-клеток в селезенке при введении анти-CTLA-4-антитела mNS-mFa55 (контрольное антитело) или SW1208-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией FM3A, как описано в примере 3-7-8. Антитело mNS-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг и 100 мг/кг через хвостовую вену, а антитело SW1208-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг, 100 мг/кг и 500 мг/кг через хвостовую вену.
30 Селезенку извлекают через шесть дней после введения и оценивают увеличение или уменьшение количества активированных хелперных Т-клеток с помощью анализа FACS. Продольная ось представляет собой отношение активированных хелперных Т-клеток ($CD4^+ Foxp3^- ICOS^+$) к $CD45^+$ клеткам. Показано среднее значение, n = 3.

Фигура 14. Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4-антитела SW1389-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией Нера1-6/hGPC3, как описано в примере 4-3-5. Антитело вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг и 100 мг/кг через хвостовую вену. Каждая точка представляет собой

5 средний объем опухоли в группе, n = 4.

Фигура 15. Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4-антитела hNS-mFa55 (контрольное антитело) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией Нера1-6/hGPC3, как описано в примере 4-3-5. Антитело вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг через хвостовую вену. Каждая точка представляет собой средний

10 объем опухоли в группе, n = 4.

Фигура 16. Изменение соотношения эффекторных клеток Treg в опухоли при введении анти-CTLA-4-антитела hNS-mFa55 (контрольное антитело) или SW1389-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной клетками

15 линии Нера1-6/hGPC3, как описано в примере 4-3-8. Антитело hNS-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг, а SW1389-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг, 100 мг/кг и 500 мг/кг через хвостовую вену. Опухоль исследуют через шесть дней после введения и оценивают увеличение или уменьшение эффекторных

20 клеток Treg с помощью анализа FACS. Продольная ось представляет собой отношение эффекторных Treg ($CD4^+ FoxP3^+ CCR7^{low} KLRG1^+$) к клеткам $CD45^+$. Показано среднее значение, n = 3.

Фигура 17. Изменение соотношения активированных хелперных Т-клеток в селезенке при введении анти-CTLA-4-антитела hNS-mFa55 (контрольное антитело) или SW1389-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной

25 клеточной линией Нера1-6/hGPC3, как описано в примере 4-3-9. Антитело hNS-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг, а антитело SW1389-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг, 100 мг/кг и 500 мг/кг через хвостовую вену. Селезенку извлекают через шесть дней после введения и оценивают увеличение или уменьшение

30 количества активированных хелперных Т-клеток с помощью анализа FACS. Продольная ось представляет собой отношение активированных хелперных Т-клеток ($CD4^+ Foxp3^+ ICOS^+$) к $CD45^+$ клеткам. Показано среднее значение, n = 3.

Фигура 18. Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4-антитела SW1610-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией Нера1-6/hGPC3, как описано в примере 5-4-5. Антитело вводят в дозах 0,3 мг/кг,

1 мг/кг и 3 мг/кг через хвостовую вену. Каждая точка представляет собой средний объем опухоли в группе, $n = 5$.

5 **Фигура 19.** Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4-антитела SW1612-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией Нера1-6/hGPC3, как описано в примере 5-4-5. Антитело вводят в дозах 0,3 мг/кг, 1 мг/кг и 3 мг/кг через хвостовую вену. Каждая точка представляет собой средний объем опухоли в группе, $n = 5$.

10 **Фигура 20.** Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4-антитела SW1615-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией Нера1-6/hGPC3, как описано в примере 5-4-5. Антитело вводят в дозах 0,3 мг/кг, 1 мг/кг и 3 мг/кг через хвостовую вену. Каждая точка представляет собой средний объем опухоли в группе, $n = 5$.

15 **Фигура 21.** Изменения соотношения эффекторных клеток Treg в опухоли при введении анти-CTLA-4-антитела SW1610-mFa55, SW1612-mFa55 или SW1615-mFa55 (все они являются переключающими антителами) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией Нера1-6/hGPC3, как описано в примере 5-4-8. Антитело SW1610-mFa55 вводят в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг, SW1612-mFa55 вводят в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг, SW1615-mFa55 вводят в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг и 400 мг/кг и отрицательное контрольное антитело KLN-mFa55 вводят в дозе 400 мг/кг через хвостовую вену. Опухоль исследуют через шесть дней после введения и оценивают увеличение или уменьшение эффекторных клеток Treg с помощью анализа FACS. Продольная ось представляет собой отношение эффекторных клеток Treg ($CD4^+ FoxP3^+ CCR7^{low} KLRG1^+$) к клеткам $CD45^+$. Показано среднее значение, $n = 3$.

25 **Фигура 22.** Изменения в соотношении активированных хелперных Т-клеток в селезенке при введении анти-CTLA-4-антитела SW1610-mFa55, SW1612-mFa55 или SW1615-mFa55 (все они являются переключающими антителами) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией Нера1-6/hGPC3, как описано в примере 5-4-9. Антитело SW1610-mFa55 вводят в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг, SW1612-mFa55 вводят в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг, SW1615-mFa55 вводят в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг и 400 мг/кг, и отрицательное контрольное антитело KLN-mFa55 вводят в дозе 400 мг/кг через хвостовую вену. Селезенку исследуют через шесть дней после введения и оценивают увеличение или уменьшение количества активированных хелперных Т-клеток с помощью анализа FACS. Продольная ось представляет собой

отношение активированных хелперных Т-клеток ($CD4^+$ Foxp3⁻ ICOS⁺) к $CD45^+$ клеткам. Показано среднее значение, n = 3.

5 Фигура 23. Сравнение активности ADCC *in vitro* антител, имеющих различные измененные константные области с повышенным связыванием с FcγR, как описано в примере 6-2. Как показано на фигуре, IgG1 представляет собой MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT, GASDALIE представляет собой MDX10D1H-GASDALIE/MDX10D1L-k0MT, ART6 представляет собой MDX10D1H-Kn462/MDX10D1H-H1445/MDX10D1L-k0MT, ART8 представляет собой MDX10D1H-Kn461/MDX10D1H-H1443/MDX10D1L-k0MT. В данном случае IgG1 представляет
10 собой антитело, имеющее контрольную константную область, GASDALIE представляет собой антитело, имеющее константную область, описанную ранее, ART6 и ART8 представляют собой антитела, имеющие измененную константную область, полученную в примере 6-1.

15 Фигура 24. Сравнение *in vitro* активности ADCP антител, имеющих различные измененные константные области с повышенным связыванием с FcγR, как описано в примере 6-3. На рисунке IgG1 представляет собой MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT, GASDIE представляет собой MDX10D1H-GASDIE/MDX10D1L-k0MT, ART6 представляет собой MDX10D1H-Kn462/MDX10D1H-H1445/MDX10D1L-k0MT и ART8 представляет собой MDX10D1H-Kn461/MDX10D1H-H1443/MDX10D1L-k0MT. В
20 данном случае IgG1 представляет собой антитело, имеющее контрольную константную область, GASDIE представляет собой антитело, имеющее ранее описанную константную область, и ART6 и ART8 представляют собой антитела, имеющие измененную константную область, полученную в примере 6-1.

25 Фигура 25. Активность *in vitro* ADCC переключающего анти-CTLA-4-антитела SW1389-ART6, имеющего измененную константную область с повышенным связыванием с FcγR, как описано в примере 6-4.

 Фигура 26. Активность *in vitro* ADCC переключающего анти-CTLA-4-антитела SW1610-ART6, имеющего измененную константную область с повышенным связыванием с FcγR, как описано в примере 6-4.

30 Фигура 27. Активность *in vitro* ADCC переключающего анти-CTLA-4-антитела SW1612-ART6, имеющего измененную константную область с повышенным связыванием с FcγR, как описано в примере 6-4.

Фигура 28. Нейтрализующая активность переключающего анти-CTLA4 антитела SW1389 (активность по отмене сигнала CTLA4, который действует ингибирующим образом против активации эффекторных клеток), как описано в примере 6-5.

5 Фигура 29. Нейтрализующая активность переключающего анти-CTLA4 антитела SW1610 (активность по отмене сигнала CTLA4, который действует ингибирующим образом против активации эффекторных клеток), как описано в примере 6-5.

Фигура 30. Нейтрализующая активность переключающего анти-CTLA4 антитела SW1612 (активность по отмене сигнала CTLA4, который действует ингибирующим образом против активации эффекторных клеток), как описано в примере 6-5.

10 Фигура 31. Нейтрализующая активность переключающего анти-CTLA4 антитела SW1615 (активность по отмене сигнала CTLA4, который действует ингибирующим образом против активации эффекторных клеток), как описано в примере 6-5.

15 Фигура 32. Цитотоксическая активность *in vitro* переключающего анти-CTLA4 антитела SW1389-ART5+ACT1 против CTLA4-положительных регуляторных Т-клеток, как описано в примере 6-6.

Фигура 33. Цитотоксическая активность *in vitro* переключающего анти-CTLA4 антитела SW1389-ART5+ACT1 против CTLA4-положительных регуляторных Т-клеток, как описано в примере 6-6.

20 Фигура 34. Цитотоксическая активность *in vitro* переключающего анти-CTLA4 антитела SW1610-ART5+ACT1 против CTLA4-положительных регуляторных Т-клеток, как описано в примере 6-6.

25 Фигура 35. Цитотоксическая активность *in vitro* переключающего анти-CTLA4 антитела SW1610-ART5+ACT1 против CTLA4-положительных регуляторных Т-клеток, как описано в примере 6-6.

Описание вариантов осуществления настоящего изобретения

Методы и процедуры, описанные или упомянутые в настоящем документе, как правило, понятны и обычно используются специалистами в данной области, например, широко используемые методологии, описанные в кн.: Sambrook с соавт., «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», 3е изд., 2001, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк; кн.: «Current Protocols in Molecular Biology», под ред. F.M. Ausubel с соавт., ред., 2003; серии «Methods in Enzymology», изд-во Academic Press, Inc: PCR 2: A Practical Approach, под ред. M.J. MacPherson, B.D. Hames, G.R. Taylor, 1995, под ред. Harlow и Lane, 1988, «Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal

Cell Culture», под ред. R.I. Freshney, 1987; «Introduction to Cell and Tissue Culture», под ред. J. P. Mather, P.E. Roberts, 1998, изд-во Plenum Press; «Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures», под ред. A. Doyle, J.B. Griffiths, D.G. Newell, 1993-8, изд-во J. Wiley and Sons; «Handbook of Experimental Immunology», под ред. D.M. Weir и С.С. Blackwell; «Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells», под ред. J.M. Miller и М.Р. Calos, 1987; «PCR: The Polymerase Chain Reaction», под ред. Mullis с соавт., 1994; «Current Protocols in Immunology», под ред. J.E. Coligan с соавт., 1991; «Short Protocols in Molecular Biology», изд-во Wiley and Sons, 1999; «Immunobiology», под ред. С.А. Janeway и P. Travers, 1997; «Antibodies», под ред. P. Finch, 1997; «Antibodies: A Practical Approach», под ред. D. Catty., изд-во IRL Press, 1988-1989; «Monoclonal Antibodies: A Practical Approach», под ред. P. Shepherd и С. Dean, изд-во Oxford University Press, 2000; «Using Antibodies: A Laboratory Manual», под ред. E. Harlow и D. Lane, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); «The Antibodies», под ред. M. Zanetti и J. D. Capra, изд-во Harwood Academic Publishers, 1995; «Cancer: Principles and Practice of Oncology», под ред. V.T. DeVita с соавт., изд-во J.B. Lippincott Company, 1993.

I. Определения

Если не указано иное, используемые в настоящем описании технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области, к которой относится настоящее изобретение. Singleton с соавт., «Dictionary of Microbiology and Molecular Biology», 2-е изд., изд-во J. Wiley & Sons, Нью-Йорк, 1994; March, «Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure», 4-е изд., изд-во John Wiley & Sons, Нью-Йорк, 1992), предоставляют специалистам в данной области общие сведения по многим терминам, используемым в настоящей заявке. Все цитируемые в настоящем описании ссылки, включая заявки на патенты и публикации, полностью включены в настоящий документ посредством ссылок.

Для целей интерпретации настоящего описания применяют следующие определения, и, при необходимости, термины, используемые в единственном числе, также могут означать множественное число и наоборот. Следует учитывать, что используемая в настоящем описании терминология предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначена для ограничения настоящего изобретения. Если какое-либо определение, изложенное ниже, противоречит любому документу, включенному в настоящий документ посредством ссылки, определение, изложенное ниже, имеет преимущественную силу.

«Акцепторный каркас человека» для целей настоящего документа представляет собой каркас, содержащий аминокислотную последовательность каркаса переменного домена легкой цепи (VL) или каркаса переменного домена тяжелой цепи (VH), полученного из каркаса иммуноглобулина человека или консенсусного каркаса человека, как определено ниже. Акцепторный каркас человека, «происходящий из» каркаса иммуноглобулина человека или консенсусного каркаса человека, может содержать ту же аминокислотную последовательность, что и он, или он может содержать изменения в аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество аминокислотных замен составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее или 2 или менее. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения акцепторный каркас VL человека идентичен по последовательности каркасной последовательности иммуноглобулина VL человека или консенсусной каркасной последовательности человека.

«Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность» или «ADCC – Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity» относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый иммуноглобулин, связанный с Fc рецепторами (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (например, клетках НК, нейтрофилах и макрофагах), активирует эти цитотоксические эффекторные клетки специфически связываться с клеткой-мишенью, несущей антиген, и впоследствии убивают клетку-мишень цитотоксинами. Первичные клетки для опосредования ADCC, клетки НК, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на кроветворных клетках представлена в табл. 3 на стр. 464 в публикации Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 1991, 9:457-492. Для оценки активности ADCC исследуемой молекулы можно провести анализ ADCC *in vitro*, например, согласно описанию в US 5500362, US 5821337 или в US 6737056 (Presta). Полезные эффекторные клетки для таких анализов включают клетки МКПК и НК. Альтернативно или дополнительно активность ADCC исследуемой молекулы может быть оценена *in vivo*, например, на животной модели, такой как модель, описанная в статье Clynes с соавт., *PNAS (USA)*, 1998, 95:652-656.

«Цитотоксическая активность» включает, например, антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), как указано выше, комплементзависимую цитотоксичность (CDC), как указано ниже, и Т-клеточно-опосредованную цитотоксическую активность. Активность CDC означает

цитотоксическую активность системы комплемента. С другой стороны, активность ADCC означает активность, при которой антитело связывается с антигеном, присутствующим на клеточной поверхности клетки-мишени, а эффекторная клетка дополнительно связывается с антителом, и тем самым эффекторная клетка повреждает клетку-мишень. Обладает ли интересующее антитело активностью ADCC и имеет ли интересующее антитело активность CDC, можно измерить известными способами (см., например, «Current Protocols in Immunology», глава 7, *Immunologic Studies in people*, издано Coligan с соавт. 1993).

Понятие «нейтрализующая активность» относится к активности антитела по ингибированию некоторой биологической активности путем связывания с молекулой, участвующей в биологической активности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения биологическая активность обеспечивается связыванием между лигандом и рецептором. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело ингибирует связывание между лигандом и рецептором путем связывания с лигандом или рецептором. Антитела, обладающие такой нейтрализующей активностью, называются нейтрализующими антителами. Нейтрализующую активность определенного испытуемого вещества можно измерить, сравнивая биологическую активность в присутствии лиганда между условиями в присутствии и в отсутствие испытуемого вещества.

Термин «антителозависимый клеточный фагоцитоз» или «ADCP – antibody-dependent cellular phagocytosis» означает процесс, при котором либо вся клетка, либо ее часть, покрытая антителом, поглощается фагоцитирующими иммунными клетками (например, макрофагами, нейтрофилами и дендритными клетками), которые связываются с участком Fc иммуноглобулина.

Термин «связывающая активность» относится к общей силе всех нековалентных взаимодействий между одним или более сайтами связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). В настоящем изобретении «связывающая активность» строго не ограничивается взаимодействием 1:1 между членами связывающей пары (например, антителом и антигеном). Например, когда члены связывающейся пары отражают моновалентное взаимодействие 1:1, активность связывания относится к внутренней аффинности связывания («аффинности»). Когда член связывающейся пары способен как к моновалентному, так и к поливалентному связыванию, активность связывания представляет собой сумму сил каждого связывания. Связывающая активность молекулы X с ее партнером Y обычно

может быть представлена константой диссоциации (KD) или «количеством связывания исследуемого соединения на единицу количества лиганда». Связывающая активность может быть измерена обычными способами, известными в данной области, включая описанные в настоящем изобретении. Конкретные примеры в виде иллюстрации вариантов осуществления измерения связывающей активности описаны ниже.

Антитело с «созревшей аффинностью» относится к антителу с одним или более изменениями в одной или более гипервариабельных областях (HVR – hypervariable region) по сравнению с исходным антителом, которое не имеет таких изменений, причем такие изменения приводят к улучшению аффинности антитела к антигену.

Термины «анти-CTLA-4-антитело» и «антитело, которое связывается с CTLA-4» относятся к антителу, которое способно связывать CTLA-4 с достаточной аффинностью, так что это антитело можно использовать в качестве диагностического и/или терапевтического средства для нацеливания на CTLA-4. В одном варианте осуществления настоящего изобретения степень связывания анти-CTLA-4-антитела с неродственным белком, не относящимся к CTLA-4, составляет менее примерно 10% от связывания антитела с CTLA-4, что измерено, например, с помощью радиоиммуноанализа (РИА). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело, которое связывается с CTLA-4, имеет константу диссоциации (KD) 1 мкМ или менее, 100 нМ или менее, 10 нМ или менее, 1 нМ или менее, 0,1 нМ или менее, 0,01 нМ или менее, или 0,001 нМ или менее (например, 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М). В некоторых вариантах осуществления анти-CTLA-4-антитело связывается с эпитопом CTLA-4, который является консервативным среди CTLA-4 разных видов.

Термин «антитело» используют в настоящем изобретении в самом широком смысле, и он охватывает различные структуры антител, включая, помимо прочего, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они проявляют желаемую антигенсвязывающую активность.

Термин «фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но ими перечень не ограничивается, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv); и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Понятие «антитело, которое связывается с тем же эпитопом», что и контрольное антитело, относится к антителу, которое блокирует связывание контрольного антитела с его антигеном в конкурентном анализе, например, на 50% или более, и/или контрольное антитело блокирует связывание антитела с его антигеном в конкурентном анализе, например, на 50% или более. Пример конкурентного анализа представлен в настоящем документе.

«Аутоиммунное заболевание» относится к незлокачественному заболеванию или расстройству, возникающему из собственных тканей человека и направленному против них. Аутоиммунные заболевания в настоящем изобретении специально исключают злокачественные или раковые заболевания или состояния, особенно В-клеточную лимфому, острый лимфобластный лейкоз (ALL – acute lymphoblastic leukemia), хронический лимфолейкоз (CLL – chronic lymphocytic leukemia), волосатоклеточный лейкоз и хронический миелобластный лейкоз. Примеры аутоиммунных заболеваний или нарушений включают, но ими перечень не ограничивается, воспалительные реакции, такие как воспалительные заболевания кожи, включая псориаз и дерматит (например, атопический дерматит); системную склеродермию и склероз; ответы, связанные с воспалительным заболеванием кишечника (такие как болезнь Крона и язвенный колит); респираторный дистресс-синдром (включая респираторный дистресс-синдром взрослых; ОРДС – adult respiratory distress syndrome); дерматит; менингит; энцефалит; увеит; колит; гломерулонефрит; аллергические состояния, такие как экзема и астма, и другие состояния, включающие инфильтрацию Т-клеток и хронические воспалительные реакции; атеросклероз; дефицит адгезии лейкоцитов; ревматоидный артрит; системную красную волчанку (SLE – systemic lupus erythematosus) (включая, но не ограничиваясь ими, волчаночный нефрит, кожную волчанку); сахарный диабет (например, сахарный диабет I типа или инсулинозависимый сахарный диабет); рассеянный склероз; синдром Рейно; аутоиммунный тиреоидит; тиреоидит Хашимото; аллергический энцефаломиелит; Синдром Шегрена; юношеский диабет; и иммунные реакции, связанные с острой и замедленной гиперчувствительностью, опосредованной цитокинами и Т-лимфоцитами, обычно обнаруживаемой при туберкулезе, саркоидозе, полимиозите, гранулематозе и васкулите; пернициозную анемию (болезнь Аддисона); заболевания, сопровождающиеся лейкоцитарным диapedезом; воспалительное заболевание центральной нервной системы (ЦНС); синдром полиорганного поражения; гемолитическая анемия (включая, но ими не ограничиваясь, криоглобулинемию или анемию с положительной реакцией Кумбса); тяжелую миастению; заболевания,

опосредованные комплексом антиген-антитело; заболевание базальной мембраны клубочков; антифосфолипидный синдром; аллергический неврит; Болезнь Грейвса; миастенический синдром Ламберта-Итона; буллезный пемфигоид; пузырчатку; аутоиммунные полиэндокринопатии; болезнь Рейтера; синдром мышечной скованности; болезнь Бехчета; гигантоклеточный артериит; иммунокомплексный нефрит; IgA-нефропатия; полинейропатии IgM; иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП – immune thrombocytopenic purpura) или аутоиммунную тромбоцитопению.

10 Термины «рак» и «злокачественный» относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом/пролиферацией клеток. Примеры рака включают рак молочной железы и рак печени.

15 Термин «комплемент-зависимая цитотоксичность» или «CDC – complement-dependent cytotoxicity» означает механизм индукции гибели клеток, при котором эффекторный домен Fc антитела, связанного с мишенью, активирует ряд ферментативных реакций, приводящих к образованию отверстий в мембране клетки-мишени. Как правило, комплекс антиген-антитело, образующийся на клетке-мишени, связывается с компонентом комплемента C1q и активирует его, что, в свою очередь, активирует каскад комплемента и приводит к гибели клетки-мишени. Более того, активация комплемента также может приводить к отложению компонентов комплемента на поверхности клетки-мишени, что приводит к связыванию с рецепторами комплемента (например, CR3) на лейкоцитах и тем самым способствует ADCC.

25 Термин «химиотерапевтическое средство» относится к химическому соединению, которое может применяться для лечения рака. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN (зарегистрированный товарный знак)); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоккон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метилолмеламины, включая альтретамин, 30 триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилтиофосфорамид и триметилолмеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, МАРИНОЛ (зарегистрированный товарный знак)); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновая кислота; камптотecin (включая синтетический аналог топотекана (НУСАМТИН (зарегистрированный товарный знак)),

СРТ-11 (иринотекан, CAMPTOSAR (зарегистрированный товарный знак)),
 ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин;
 СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин);
 подофиллотоксин; подофиллиновая кислота; тенипозид; криптофицины (в частности,
 5 криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические
 аналоги KW-2189 и СВ1-ТМ1); элеутеробин; панкратистатин; саркодиктин;
 спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид,
 эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид мехлорэтамина оксида,
 мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт;
 10 нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин
 и ранимустин; антибиотики, такие как эндииновые антибиотики (например,
 калихеамицин, особенно калихеамицин гаммаI и калихеамицин омегаI (см.,
 например, публикацию Nicolaou с соавт., *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 1994, 33: 183-186);
 СDP323, пероральный ингибитор интегрин альфа-4; динемидин, включая динемидин
 15 А; эсперамицин; а также неокарзиностатиновый хромофор и родственные
 хромопротеиновые эндииновые антибиотические хромофоры), аклациномицины,
 актиномицин, антрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карубицин,
 карминомицин, карцинофиллин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин,
 деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-оксо-L, доксорубицин (в том числе ADRIAMYCIN
 20 (зарегистрированный товарный знак)), морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-
 доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин, липосомальная инъекция доксорубицина
 HCl (DOXIL (зарегистрированный товарный знак)), липосомальный доксорубицин TLC
 D-99 (MYOCET (зарегистрированный товарный знак)), пегилированный
 липосомальный доксорубицин (CAELYX (зарегистрированный товарный знак) и
 25 дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин,
 митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин,
 оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пурамицин, келамицин, родорубицин,
 стрепторубицин, стрептозорубицин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин;
 антиметаболиты, такие как метотрексат, гемцитабин (GEMZAR (зарегистрированный
 30 товарный знак)), тегафур (UFTORAL (зарегистрированный товарный знак)),
 капецитабин (XELODA (зарегистрированный товарный знак)), эпотилон и 5-
 фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат,
 птероптерин, триметрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин,
 тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-

азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон; средства лечения надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; восполнитель фолиевой кислоты, такой как

5 фолиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидный гликозид; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бесстрабуцил; бисантрен; эдатрексат; дефамин; демеколцин; диазиквон; эльфорнитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитраэрин; пентостатин;

10 фенамет; пирарубицин; лосоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK (зарегистрированная торговая марка) (фирма JHS Natural Products, Юджин, штат Орегон); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2'-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангидин); уретан; виндезин (ELDISINE

15 (зарегистрированная торговая марка), FILDESIN (зарегистрированная торговая марка)); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ага-С»); тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел (TAXOL (зарегистрированная торговая марка)), состав наночастиц паклитаксела, созданный с помощью альбумина (ABRAXANETM), и доцетаксел (TAXOTERE

20 (зарегистрированная торговая марка)); хлорамбуцил; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; агенты платины, такие как цисплатин, оксалиплатин (например, ELOXATIN (зарегистрированный товарный знак)) и карбоплатин; алкалоиды барвинка, которые препятствуют полимеризации тубулина с образованием микротрубочек, включая винбластин (VELBAN (зарегистрированный товарный знак)), винкрестин

25 (ONCOVIN (зарегистрированный товарный знак)), виндезин (ELDISINE (зарегистрированный товарный знак), FILDESIN (зарегистрированный товарный знак)) и винорелбин (NAVELBINE (зарегистрированный товарный знак)); этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; лейковорин; новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифформетилорнитин

30 (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота, включая бексаротен (TARGRETIN (зарегистрированный товарный знак)); бисфосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS (зарегистрированный товарный знак) или OSTAC (зарегистрированный товарный знак)), этидронат (DIDROCAL (зарегистрированный товарный знак)), NE-58095, золедроновая кислота/золедронат (ZOMETA (зарегистрированный товарный

знак)), алендронат (FOSAMAX (зарегистрированный товарный знак)), памидронат (AREDIA (зарегистрированный товарный знак)), тилудронат (SKELID (зарегистрированный товарный знак)) или ризедронат (ACTONEL (зарегистрированный товарный знак)); троксацитабин (аналог 1,3-диоксоланнуклеозида цитозина); антисмысловые олигонуклеотиды, особенно те, которые ингибируют экспрессию генов в сигнальных путях, участвующих в aberrантной клеточной пролиферации, таких как, например, PKC-альфа, Raf, H-Ras и рецептор эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины, такие как вакцина THERATOPE (зарегистрированная торговая марка) и вакцины для генной терапии, например, вакцина ALLOVECTIN (зарегистрированная торговая марка), вакцина LEUVECTIN (зарегистрированная торговая марка) и вакцина VAXID (зарегистрированная торговая марка); ингибитор топоизомеразы I (например, LURTOTECAN (зарегистрированный товарный знак)); gmRH (например, ABARELIX (зарегистрированная торговая марка)); BAY439006 (сорафениб; фирма Bayer); SU-11248 (сунитиниб, SUTENT (зарегистрированная торговая марка), фирма Pfizer); перифозин, ингибитор COX-2 (например, целекоксиб или эторикоксиб), ингибитор протеосом (например, PS341); бортезомиб (VELCADE (зарегистрированная торговая марка)); CCI-779; типифарниб (R11577); сорафениб, ABT510; ингибитор Vcl-2, такой как облимерсен натрия (GENASENSE (зарегистрированный товарный знак)); пиксантрон; ингибиторы EGFR (см. определение ниже); ингибиторы тирозинкиназы (см. определение ниже); ингибиторы серин-треонинкиназы, такие как рапамицин (сиролимус, RAPAMUNE (зарегистрированный товарный знак)); ингибиторы фарнезилтрансферазы, такие как лонафарниб (SCH 6636, SARASARTM); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных агентов; а также комбинации двух или более из вышеперечисленных агентов, такие как CHOP, аббревиатура для комбинированной терапии циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном; и FOLFOX, аббревиатура схемы лечения оксалиплатином (ELOXATINTM) в сочетании с 5-ФУ и лейковорином.

Термин «химерное» антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи получена из определенного источника или вида, а остальная часть тяжелой и/или легкой цепи получена из другого источника или вида.

«Класс» антитела относится к типу константного домена или константной области, которой обладает его тяжелая цепь. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно

разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α , δ , ϵ , γ и μ соответственно.

В настоящем изобретении термин «цитотоксический агент» относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает клеточную функцию и/или вызывает гибель или разрушение клеток. Цитотоксические агенты включают, но ими перечень не ограничивается, радиоактивные изотопы (например, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb и радиоактивные изотопы Lu); химиотерапевтические агенты или лекарства (например, метотрексат, адриамицин, алкалоиды барвинка (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубицин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, даунорубицин или другие интеркалирующие агенты); ингибирующие рост агенты; ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты; антибиотики; токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты; и различные химиотерапевтические агенты, описанные выше.

«Эффекторные клетки» относятся к лейкоцитам, которые экспрессируют один или более FcR и выполняют эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетки экспрессируют по меньшей мере Fc γ RIII и выполняют эффекторную (эффекторные) функцию (функции) ADCC. Примеры лейкоцитов, которые опосредуют ADCC, включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), естественные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы. Эффекторные клетки могут быть выделены из нативного источника, например, из крови. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффекторные клетки могут представлять собой эффекторные клетки человека.

«Эффекторные функции» относятся к биологической активности, которая приписывается Fc-области антитела и зависит от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антител включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (CDC); связывание рецептора Fc; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP); понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток); и активация В-клеток.

Термин «эпитоп» включает любую детерминанту, способную связываться с антителом. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связана с антителом, нацеленным на антиген, и включает в себя специфические аминокислоты, которые непосредственно контактируют с антителом. Эпитопные детерминанты могут включать химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные или сульфонильные группы, и могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики и/или специфические характеристики заряда. Как правило, антитела, специфичные к конкретному антигену-мишени, предпочтительно распознают эпитоп на антигене-мишени в сложной смеси белков и/или макромолекул.

Термин «рецептор Fc» или «FcR» относится к рецептору, который связывается с Fc-областью антитела. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения FcR представляет собой природный FcR человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения FcR связывает антитело IgG (гамма-рецептор), и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, в том числе аллельные варианты и формы альтернативного сплайсинга этих рецепторов. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, отличаются, прежде всего, их цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит мотив активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит иммунорецепторный мотив ингибирования на основе тирозина (ITIM) в своем цитоплазматическом домене (см., например, Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 1997, 15: 203-234). FcR рассмотрены, например, в публикациях Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 1991, 9:457-492; Capel с соавт., *Immunomethods* 1994, 4: 25-34; de Haas с соавт., *J. Lab. Clin. Med.* 1995, 126: 330-341). Другие FcR, в том числе те, которые будут идентифицированы в будущем, относятся к термину «FcR» по настоящему изобретению.

Термин «Fc-рецептор» или «FcR» также включает неонатальный рецептор FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG к плоду (Guye с соавт., *J. Immunol.* 1976, 117: 587; Kim с соавт., *J. Immunol.* 1994, 24: 249) и регуляцию гомеостаза иммуноглобулинов. Известны методы измерения связывания с FcRn (см., например, Ghetie и Ward, *Immunol. Today* 1997, 18(12): 592-598; Ghetie с соавт., *Nature*

Biotechnology, 1997, 15(7): 637-640; Hinton с соавт., *J. Biol. Chem.* 2004, 279(8):6213-6216; WO 2004/92219 (Hinton с соавт.)).

Связывание с FcRn человека *in vivo* и время полужизни в сыворотке высокоаффинно связывающих полипептидов FcRn человека можно анализировать, например, в трансгенных мышцах или трансфицированных клеточных линиях человека, экспрессирующих FcRn человека, или на приматах, которым вводят полипептиды с вариантом Fc-области. WO 2000/42072 (Presta) описывает варианты антител с улучшенным или пониженным связыванием с FcR. См. также например, Shields с соавт., *J. Biol. Chem.* 2001, 9(2): 6591-6604.

10 Термин «Fc-область» в настоящем изобретении используют для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Термин включает Fc-области с нативной последовательностью и варианты Fc-области. В одном варианте осуществления настоящего изобретения Fc-область тяжелой цепи IgG человека простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако C-концевой лизин (Lys447) или глицин-лизин (Gly446-Lys447) Fc-области может присутствовать или отсутствовать. Если здесь не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области соответствует системе нумерации EU, также называемой индексом EU, как описано в работе Kabat с соавт., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Бетесда, Мэриленд, 1991.

20 Термин «антитело, содержащее Fc-область» относится к антителу, содержащему Fc-область. C-концевой лизин (остаток 447 в соответствии с системой нумерации EU) или C-концевой глицин-лизин (остатки 446-447) Fc-области можно удалить, например, во время очистки антитела или путем рекомбинантной инженерии нуклеиновой кислоты, кодирующее антитело. Соответственно, композиция, содержащая антитело, имеющее Fc-области по настоящему изобретению, может содержать антитело с G446-K447, с G446 и без K447, с удаленными всеми G446-K447, или смесь трех типов антител, описанных выше.

30 Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL, соответственно) нативного антитела обычно имеют сходную структуру, при этом каждый домен включает четыре консервативных каркасных участка (FR) и три

гипервариабельных участка (HVR) (см., например, Kindt с соавт., *Kuby Immunology*, 6е изд., 2007, изд-во WH Freeman and Co., стр. 91). Одного домена VH или VL может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, могут быть выделены с использованием домена VH или VL из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов VL или VH, соответственно. См., например, Portolano с соавт., *J. Immunol.* 1993, 150: 880-887; Clarkson с соавт., *Nature* 1991, 352: 624-628.

«Каркас» или «FR» относится к остаткам вариабельного домена, отличным от остатков гипервариабельной области (HVR). FR вариабельного домена обычно состоит из четырех доменов FR: FR1, FR2, FR3 и FR4. Соответственно, последовательности HVR и FR обычно появляются в следующей последовательности в VH (или VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «антитело полной длины» используют в настоящем изобретении взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего структуру, по существу аналогичную структуре нативного антитела, или имеющего тяжелые цепи, которые содержат Fc-область, как определено в настоящем документе.

«Функциональная Fc-область» обладает «эффektorной функцией» Fc-области с нативной последовательностью. Примеры «эффektorных функций» включают связывание C1q; CDC; связывание рецептора Fc; ADCC; фагоцитоз; понижающаяся регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора; BCR) и т.д. Такие эффektorные функции обычно требуют объединения Fc-области со связывающим доменом (например, вариабельным доменом антитела) и могут быть оценены с использованием различных анализов, как описано, например, в определениях, приведенных в настоящем описании.

«Антитело человека» представляет собой антитело, которое обладает аминокислотной последовательностью, соответствующей последовательности антитела, продуцируемого человеком или человеческой клеткой, или полученного из другого источника, в котором используют репертуары человеческих антител или другие последовательности, кодирующие антитела человека. Это определение антитела человека специально исключает гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающие остатки, не происходящие от человека.

«Консенсусный каркас человека» представляет собой каркас, который представляет наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в ряде

последовательностей каркаса VL или VH иммуноглобулина человека. Как правило, выбор последовательностей VL или VH иммуноглобулина человека осуществляют из подгруппы последовательностей вариабельных доменов. Как правило, подгруппа последовательностей является такой подгруппой, как описанная в кн.: Kabat с соавт., «*Sequences of Proteins of Immunological Interest*», т. 1-3, 5е изд., изд-во NIH Publication 91-3242, 1991, Бетесда, Мэриленд. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения для VL подгруппа представляет собой подгруппу KI, как в публикации Kabat с соавт., см. выше. В одном варианте осуществления для VH подгруппа представляет собой подгруппу III, как в публикации Kabat с соавт., см. выше.

10 «Гуманизированное» антитело относится к химерному антителу, содержащему аминокислотные остатки HVR, не происходящие от человека, и аминокислотные остатки FR человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гуманизированное антитело может содержать, по существу все, по меньшей мере один, а обычно два вариабельных домена, в которых все или по существу все HVR
15 (например, CDR) соответствуют таковым у антитела, происходящего не от человека, и все или практически все FR соответствуют FR антитела человека. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, происходящую от антитела человека. «Гуманизированная форма» антитела, например, антитело, происходящее не от человека, относится к антителу,
20 подвергнутому гуманизации.

Термин «гипервариабельная область» или «HVR», используемый в настоящем изобретении, относится к каждой из областей вариабельного домена антитела, которые являются гипервариабельными по последовательности («области, определяющие комплементарность» или «CDR») и/или образуют структурно определенные петли
25 («гипервариабельные петли») и/или содержат остатки, контактирующие с антигеном («антигенные контакты»). Как правило, антитела включают шесть HVR: три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). Примеры HVR в настоящем изобретении включают:

(а) гипервариабельные петли, расположенные на аминокислотных остатках 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia и Lesk, *J. Mol. Biol.* 1987, 196:901-917);

(б) CDR, расположенные на аминокислотных остатках 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) (Kabat с соавт., «*Sequences of Proteins of Immunological Interest*», 5е изд., изд-во Public Health Service, 1991, Бетесда, Мэриленд.

(в) контакты антигена, происходящие по аминокислотным остаткам 27с-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) и 93-101 (H3) (MacCallum с соавт., *J. Mol. Biol.*, 1996, 262: 732-745); а также

5 (г) комбинации (а), (б) и/или (в), включая аминокислотные остатки HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) и 94-102 (H3).

Если не указано иное, остатки HVR и другие остатки в варибельном домене (например, остатки FR) пронумерованы в соответствии с Kabat с соавт., см. выше.

10 «Иммуноконъюгат» представляет собой антитело, конъюгированное с одной или более гетерологичной молекулой (молекулами), включая цитотоксический агент, но не ограничиваясь им.

«Изолированное» антитело представляет собой антитело, которое было отделено от компонентов его естественной среды. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело очищают до чистоты более 95% или 99%, что
15 определяется, например, методом электрофореза (например, SDS-PAGE, изоэлектрическим фокусированием (IEF), капиллярным электрофорезом) или хроматографией (например, ионообменным или обращенно-фазовым ВЭЖХ). Обзор методов оценки чистоты антител см., например, Flatman с соавт., *J. Chromatogr. B*, 2007, 848: 79-87.

20 «Изолированная» нуклеиновая кислота относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была отделена от компонентов ее естественного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно содержат молекулы нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты присутствует внехромосомно или в хромосомном
25 расположении, которое отличается от его естественного хромосомного местоположения.

«Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело» относится к одной или более молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим тяжелую и легкую цепи антитела (или их фрагменты), включая такую молекулу (молекулы) нуклеиновой кислоты в
30 одном векторе или отдельных векторах, и такая молекула нуклеиновой кислоты (кислот) присутствует в одном или более местах в клетке-хозяине.

Термин «вектор», используемый в настоящем изобретении, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к увеличению копий другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Термин включает вектор как самовоспроизводящуюся структуру

нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Некоторые векторы способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются здесь «векторами экспрессии».

5 Термины «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используют взаимозаменяемо и относят к клеткам, в которые была введена экзогенная нуклеиновая кислота, а также к потомству таких клеток. Клетки-хозяева включают «трансформанты» и «трансформированные клетки», которые включают первично трансформированную клетку и полученное из нее потомство независимо от количества
10 пассажей. Потомство может быть не полностью идентичным по содержанию нуклеиновых кислот родительской клетке, и может содержать мутации. Мутантное потомство, обладающее той же функцией или биологической активностью, что и подвергнутые скринингу или отобранные в исходно трансформированной клетке, включены в настоящее описание.

15 Термин «моноклональное антитело», используемый в настоящем изобретении, относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны и/или связывают один и тот же эпитоп, за исключением возможных вариантных антител, например, содержащих природные мутации или возникающие во время получения препарата моноклонального
20 антитела, причем такие варианты обычно присутствуют в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело в препарате моноклональных антител направлено против одной детерминанты антигена. Таким образом, модификатор «моноклональный»
25 указывает на то, что антитело получено из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует толковать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены различными методами, включая, помимо прочего, гибридомный метод, методы рекомбинантной ДНК, методы фагового
30 дисплея и методы с использованием трансгенных животных, содержащих полностью или частично локусы иммуноглобулинов человека, такие способы и другие иллюстративные способы получения моноклональных антител описаны в настоящем изобретении.

Понятие «голое антитело» относится к антителу, которое не конъюгировано с гетерологичным фрагментом (например, цитотоксическим фрагментом) или радиоактивной меткой. Голое антитело может присутствовать в фармацевтическом составе.

5 Понятие «нативные антитела» относится к встречающимся в природе молекулам иммуноглобулина с различной структурой. Например, нативные антитела IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины массой около 150 000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей, связанных дисульфидной связью. От N- до C-конца каждая тяжелая цепь имеет
10 переменную область (VH), также называемую переменным доменом тяжелой цепи или переменным доменом тяжелой цепи, за которой следуют три константных домена (CH1, CH2 и CH3). Аналогично, от N-конца к C-концу каждая легкая цепь имеет переменную область (VL), также называемую переменным доменом легкой цепи, за которой следует константный домен легкой цепи (CL). Легкая цепь антитела может
15 быть отнесена к одному из двух типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), на основании аминокислотной последовательности их константного домена.

Понятие «нативная последовательность Fc-области» содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-области, встречающейся в природе. Fc-область человека с нативной последовательностью
20 включает Fc-область IgG1 человека с нативной последовательностью (аллотипы не-A и A); Fc-область IgG2 человека с нативной последовательностью; Fc-область IgG3 человека с нативной последовательностью; и Fc-область IgG4 человека с нативной последовательностью, а также их природные варианты.

«Вариант Fc-области» содержит аминокислотную последовательность, которая
25 отличается от последовательности Fc-области с нативной последовательностью в силу по меньшей мере одной аминокислотной модификации (изменения), предпочтительно одной или более аминокислотных замен. Предпочтительно вариант Fc-области имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с Fc-областью нативной последовательности или Fc-областью исходного полипептида, например, от примерно
30 одной до примерно десяти аминокислотных замен, предпочтительно от примерно одной до примерно пяти аминокислотных замен в Fc-области нативной последовательности или в Fc-области исходного полипептида. Вариант Fc-области согласно настоящему изобретению предпочтительно обладает по меньшей мере приблизительно 80% гомологией с Fc-областью нативной последовательности и/или с

Fc-областью исходного полипептида, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% гомологией с ними и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95% гомологией.

5 Понятие «процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» по отношению к эталонной последовательности полипептида определяют как процентная
10 доля аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если это необходимо, для достижения максимальной процентной идентичности последовательности и без учета
15 каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание с целью определения процентной идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, известными специалистам в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN, Megalign (DNASTAR) или GENETYX (зарегистрированная торговая марка) (фирма Genetyx Co., Ltd.). Специалисты в данной области техники могут определить
20 подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

20 Автором компьютерной программы сравнения последовательностей ALIGN-2 является фирма Genentech, Inc., а исходный код зарегистрирован вместе с документацией пользователей в Бюро регистрации авторских прав США, Вашингтон, округ Колумбия, 20559, где он зарегистрирован под номером авторского права США № TXU510087. Программа ALIGN-2 находится в свободном доступе от фирмы Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, Калифорния, или может быть скомпилирована из
25 исходного кода. Программа ALIGN-2 должна быть скомпилирована для использования в операционной системе UNIX, включая цифровую версию UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей задаются программой ALIGN-2 и не изменяются.

30 В ситуациях, когда ALIGN-2 используют для сравнения аминокислотных последовательностей, процента идентичности аминокислотной последовательности данной аминокислотной последовательности A относительно данной аминокислотной последовательности B (которая может быть альтернативно выражена как данная аминокислотная последовательность A, которая имеет или содержит определенный %

идентичности аминокислотной последовательности с данной аминокислотной последовательностью В, или против нее), рассчитывают следующим образом:

100-кратная дробь X/Y

5

где X означает количество аминокислотных остатков, признанных идентичными с помощью программы выравнивания последовательностей ALIGN-2 при выравнивании А и В этой программой, и где Y – общее количество аминокислотных остатков в В.

10

Следует учитывать, что если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, то % идентичности аминокислотных последовательностей А и В не будет равен % идентичности аминокислотных последовательностей В и А. Если специально не указано иное, все проценты значений идентичности аминокислотной последовательности, используемые в настоящем изобретении, получают, как описано в предыдущем абзаце, с использованием компьютерной программы ALIGN-2.

15

Термин «фармацевтический состав» относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает эффективную биологическую активность содержащегося в нем активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, являющихся неприемлемо токсичными для субъекта, для которого препарат может быть назначен.

20

Понятие «индивид» или «субъект» относится к млекопитающим. Млекопитающими являются, но ими перечень не ограничивается, домашние животные (например, коровы, овцы, кошки, собаки и лошади), приматы (например, люди и другие приматы, такие как обезьяны), кролики и грызуны (например, мыши и крысы). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения индивидом или субъектом является человек.

25

Понятие «фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту фармацевтического состава, отличному от активного ингредиента, который нетоксичен для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но не ограничивается ими, буфер, вспомогательное вещество, стабилизатор или консервант.

30

Понятие «эффективное количество» агента, например фармацевтического состава, относится к количеству, эффективному в дозах и на протяжении периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата.

Термин «вкладыш в упаковку» используют для обозначения инструкций, обычно включаемых в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях относительно использования таких терапевтических продуктов.

Термин «CTLA-4», используемый в настоящем изобретении, относится к любому нативному CTLA-4 от любого позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. Термин охватывает «полноразмерный» непроцессированный CTLA-4, а также любую форму CTLA-4, полученную в результате процессинга в клетке. Термин также охватывает встречающиеся в природе варианты CTLA-4, например, сплайс варианты или аллельные варианты. Аминокислотная последовательность типичного CTLA-4 человека представлена в SEQ ID NO: 214, аминокислотная последовательность CTLA-4 мыши представлена в SEQ ID NO: 247, аминокислотная последовательность CTLA-4 обезьяны представлена в SEQ ID NO: 248, и аминокислотная последовательность внеклеточного домена CTLA-4 человека представлена в SEQ ID NO: 28. В настоящем изобретении CTLA-4 также может быть описан как CTLA4.

Термин «регуляторные Т-клетки (Treg)» относится к субпопуляции Т-клеток, которые регулируют иммунную систему, поддерживают толерантность к аутоантигенам и подавляют аутоиммунные заболевания. Эти клетки обычно подавляют пролиферацию эффекторных Т-клеток. Наиболее изученными клетками Treg являются клетки, экспрессирующие CD4, CD25 и Foxp3 (клетки CD4⁺ CD25⁺ клетки Treg). Эти клетки Treg отличаются от хелперных Т-клеток. Для идентификации и мониторинга клеток Treg используют несколько различных методов. При определении по экспрессии CD4 и CD25 (клетки CD4⁺ CD25⁺) клетки Treg составляют примерно от 5% до примерно 10% субпопуляции зрелых CD4⁺ Т-клеток у мышей и людей, в то время как примерно от 1% до примерно 2% Treg можно измерить в цельной крови. Идентификацию и мониторинг можно проводить путем дальнейшего измерения экспрессии Foxp3 (клетки CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺). Кроме того, в качестве другого маркера можно использовать отсутствие или низкий уровень экспрессии CD127 в сочетании с наличием CD4 и CD25. Клетки Treg также экспрессируют высокие уровни CTLA-4 и GITR. Treg также можно идентифицировать способами, описанными в примерах ниже.

Используемый в настоящем изобретении термин «практически сходный», «практически равный» или «практически такой же» относится к достаточно высокой

степени сходства между двумя числовыми значениями (например, одно связано с антителом по настоящему изобретению, а другое связанное с эталонным/сравнительным антителом), так что специалист в данной области может определить разницу между двумя значениями незначительной или не имеющей биологической и/или статистической значимости в контексте биологической характеристики, измеряемой указанными значениями (например, значения KD).

Используемый в настоящем изобретении термин «лечение» (и его грамматическая вариация, такая как «лечить») относится к клиническому вмешательству в попытке изменить естественное течение заболевания у индивидуума, проходящего лечение, и может проводиться либо для профилактики, либо во время лечения клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают, но не ограничиваются ими, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или облегчение болезненного состояния, ремиссию или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению используют для задержки развития заболевания или для замедления прогрессирования заболевания.

Термин «опухоль» относится к росту всех неопластическим клеток и к пролиферации, злокачественным или доброкачественным, а также ко всем предраковым и раковым клеткам и тканям. Термины «рак», «злокачественный», «клеточное пролиферативное нарушение», «пролиферативное нарушение» и «опухоль» не являются взаимоисключающими в контексте настоящего описания.

Термин «опухолевая ткань» означает ткань, содержащую по меньшей мере одну опухолевую клетку. Опухолевая ткань обычно состоит из популяции опухолевых клеток, которые образуют основную часть опухоли (паренхиму), и соединительных тканей и кровеносных сосудов, которые существуют между этими клетками и поддерживают опухоль («строма»). Различие между ними в одних случаях очевидно, а в других они смешиваются. Опухолевые ткани могут быть инфильтрированы иммунными клетками и т.п. С другой стороны, «неопухолевая ткань» означает ткань, отличную от опухолевой (опухолевых) ткани (тканей) в живом организме. Здоровые/нормальные ткани, не находящиеся в болезненном состоянии, являются типичными примерами неопухолевых тканей.

II. Составы и композиции

Один из объектов настоящего изобретения частично основан на анти-CTLA-4 антителах и их применении. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены антитела, которые связываются с CTLA-4. Антитела по настоящему изобретению применимы, например, для диагностики или лечения рака.

A. Примеры анти-CTLA-4 антител

В одном из объектов по настоящему изобретению предусматривают выделенные антитела, которые связываются с CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению обладает CTLA-4-связывающей активностью в зависимости от концентрации аденозин-содержащего соединения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения связывающаяся с CTLA-4 активность выше в присутствии аденозин-содержащего соединения по сравнению с активностью в отсутствие аденозин-содержащего соединения. В другом варианте осуществления настоящего изобретения активность связывания с CTLA-4 выше в присутствии высокой концентрации аденозин-содержащего соединения по сравнению с таковой в присутствии низкой концентрации аденозин-содержащего соединения. В других вариантах осуществления настоящего изобретения разница в связывающей активности с CTLA-4 отличается, например, в два раза или более, в 3 раза или более, в 5 раз или более, в 10 раз или более, в 20 раз или более, в 30 раз или более, в 50 раз или более, в 100 раз или более, в 200 раз или более, в 300 раз или более, в 500 раз или более, в 1×10^3 раз или более, в 2×10^3 раз или более, в 3×10^3 раз или более, в 5×10^3 раз или более, в 1×10^4 раз или более, в 2×10^4 раз или более, в 3×10^4 раз или более, в 5×10^4 раз или более или в 1×10^5 раз или более.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения связывающая активность анти-CTLA-4 антитела может быть выражена величиной KD (константа диссоциации). В другом варианте осуществления настоящего изобретения величина KD анти-CTLA-4 антитела в присутствии аденозин-содержащего соединения меньше, чем в отсутствие аденозин-содержащего соединения. В другом варианте осуществления настоящего изобретения значение KD анти-CTLA-4 антитела в присутствии высокой концентрации аденозин-содержащего соединения меньше, чем в присутствии низкой концентрации аденозин-содержащего соединения. В другом варианте осуществления настоящего изобретения различие значений KD анти-CTLA-4 антитела отличается, например в два раза или более, 3 в раза или более, в 5 раз или более, в 10 раз или более,

в 20 раз или более, в 30 раз или более, в 50 раз или более, в 100 раз или более, в 200 раз или более, в 300 раз или более, в 500 раз или более, в 1×10^3 раз или более, в 2×10^3 раз или более, в 3×10^3 раз или более, в 5×10^3 раз или более, в 1×10^4 раз или более, в 2×10^4 раз или более, в 3×10^4 раз или более, в 5×10^4 раз или более, или в 1×10^5 раз или более. Значения KD анти-CTLA-4 антител в присутствии аденозин-содержащего соединения или в присутствии высокой концентрации аденозин-содержащего соединения могут быть, например, 9×10^{-7} М или менее, 8×10^{-7} М или менее, 7×10^{-7} М или менее, 6×10^{-7} М или менее, 5×10^{-7} М или менее, 4×10^{-7} М или менее, 3×10^{-7} М или менее, 2×10^{-7} М или менее, 1×10^{-7} М или менее, 9×10^{-8} М или менее, 8×10^{-8} М или менее, 7×10^{-8} М или менее, 6×10^{-8} М или менее, 5×10^{-8} М или менее, 4×10^{-8} М или менее, 3×10^{-8} М или менее, 2×10^{-8} М или менее, 1×10^{-8} М или менее, 9×10^{-9} М или менее, 8×10^{-9} М или менее, 7×10^{-9} М или менее, 6×10^{-9} М или менее, 5×10^{-9} М или менее, 4×10^{-9} М или менее, 3×10^{-9} М или менее, 2×10^{-9} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 9×10^{-10} М или менее, 8×10^{-10} М или менее, 7×10^{-10} М или менее, 6×10^{-10} М или менее, 5×10^{-10} М или менее, 4×10^{-10} М или менее, 3×10^{-10} М или менее, 2×10^{-10} М или менее, или 1×10^{-10} М или менее. Значения KD анти-CTLA-4 антител в отсутствие аденозин-содержащего соединения или в присутствии низкой концентрации аденозин-содержащего соединения могут быть, например, 1×10^{-8} М или более, 2×10^{-8} М или более, 3×10^{-8} М или более, 4×10^{-8} М или более, 5×10^{-8} М или более, 6×10^{-8} М или более, 7×10^{-8} М или более, 8×10^{-8} М или более, 9×10^{-8} М или более, 1×10^{-7} М или более, 2×10^{-7} М или более, 3×10^{-7} М или более, 4×10^{-7} М или более, 5×10^{-7} М или более, 6×10^{-7} М или более, 7×10^{-7} М или более, 8×10^{-7} М или более, 9×10^{-7} М или более, 1×10^{-6} М или более, 2×10^{-6} М или более, 3×10^{-6} М или более, 4×10^{-6} М или более, 5×10^{-6} М или более, 6×10^{-6} М или более, 7×10^{-6} М или более, 8×10^{-6} М или более, или 9×10^{-6} М или более.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения связывающая активность анти-CTLA-4 антитела может быть представлена значением kd (константа скорости диссоциации) вместо значения KD.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения связывающая активность анти-CTLA-4 антитела может быть представлена количеством связывания CTLA-4 на единицу количества антитела. Например, в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса количество связывания антитела, иммобилизованного на сенсорном чипе, и количество связывания антигена, дополнительно связанного с ним, измеряются как резонансная единица (RU – resonance

unit). Значение, полученное путем деления количества связывания антигена на количество связывания антитела, может быть определено как количество связывания антигена на единицу количества антитела. Конкретные способы измерения и расчета таких количеств связывания описаны в примерах ниже. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество связывания CTLA-4 в присутствии аденозин-содержащего соединения выше, чем в отсутствие аденозин-содержащего соединения. Альтернативно, в другом варианте осуществления настоящего изобретения количество связывания CTLA-4 в присутствии высокой концентрации аденозин-содержащего соединения выше, чем в присутствии низкой концентрации аденозин-содержащего соединения. В другом варианте осуществления настоящего изобретения различие связываемого количества CTLA-4 отличается, например, в два раза или более, 3 в раза или более, в 5 раз или более, в 10 раз или более, в 20 раз или более, в 30 раз или более, в 50 раз или более, в 100 раз или более, в 200 раз или более, в 300 раз или более, в 500 раз или более, в 1×10^3 раз или более, в 2×10^3 раз или более, в 3×10^3 раз или более, в 5×10^3 раз или более, в 1×10^4 раз или более, в 2×10^4 раз или более, в 3×10^4 раз или более, в 5×10^4 раз или более, или в 1×10^5 раз или более. Величина количества связываемого CTLA-4 в присутствии аденозин-содержащего соединения или в присутствии высокой концентрации аденозин-содержащего соединения может составлять, например, 0,01 или более, 0,02 или более, 0,03 или более, 0,04 или более, 0,05 или более, 0,06 или более, 0,07 или более, 0,08 или более, 0,09 или более, 0,1 или более, 0,2 или более, 0,3 или более, 0,4 или более, 0,5 или более, 0,6 или более, 0,7 или более, 0,8 или более, 0,9 или более или 1 или более. Величина количества связываемого CTLA-4 в отсутствие аденозин-содержащего соединения или в присутствии низкой концентрации аденозин-содержащего соединения может составлять, например, 0,5 или менее, 0,4 или менее, 0,3 или менее, 0,2 или менее, 0,1 или менее, 0,09 или менее, 0,08 или менее, 0,07 или менее, 0,06 или менее, 0,05 или менее, 0,04 или менее, 0,03 или менее, 0,02 или менее, 0,01 или менее, 0,009 или менее, 0,008 или менее, 0,007 или менее, 0,006 или менее, 0,005 или менее, 0,004 или менее, 0,003 или менее, 0,002 или менее или 0,001 или менее.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения значения KD, значения kd, значения связываемого количества и т.п., описанные в настоящем изобретении, измеряют или рассчитывают путем проведения анализа поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C (см., например, пример 3 в настоящем описании).

Любая концентрация аденозин-содержащего соединения может быть выбрана при условии, что обнаруживается различие в активности связывания анти-CTLA-4 антитела. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения высокая концентрация может включать, например, 1 нМ или более 1 нМ, 3 нМ или более 3 нМ, 10 нМ или более 10 нМ, 30 нМ или более 30 нМ, 100 нМ или более 100 нМ. нМ, 300 нМ или более 300 нМ, 1 мкМ или более 1 мкМ, 3 мкМ или более 3 мкМ, 10 мкМ или более 10 мкМ, 30 мкМ или более 30 мкМ, 100 мкМ или более 100 мкМ, 300 мкМ или более 300 мкМ, 1 мМ или более 1 мМ, 3 мМ или более 3 мМ, 10 мМ или более 10 мМ, 30 мМ или более 30 мМ, 100 мМ или более 100 мМ, 300 мМ или выше 300 мМ и 1 М или выше 1 М. В другом варианте высокая концентрация в настоящем изобретении может быть достаточным количеством, при котором соответствующее анти-CTLA-4 антитело проявляет максимальную связывающую активность. В одном варианте осуществления настоящего изобретения в качестве высокой концентрации могут быть выбраны 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ или достаточное количество, при котором соответствующее анти-CTLA-4-антитело проявляет максимальную связывающую активность. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения низкая концентрация может включать, например, 1 мМ или менее 1 мМ, 300 мкМ или менее 300 мкМ, 100 мкМ или менее 100 мкМ, 30 мкМ или менее 30 мкМ, 10 мкМ или менее 10 мкМ. мкМ, 3 мкМ или менее 3 мкМ, 1 мкМ или менее 1 мкМ, 300 нМ или менее 300 нМ, 100 нМ или менее 100 нМ, 30 нМ или менее 30 нМ, 10 нМ или менее 10 нМ, 3 нМ или ниже 3 нМ, 1 нМ или ниже 1 нМ, 300 пМ или ниже 300 пМ, 100 пМ или ниже 100 пМ, 30 пМ или ниже 30 пМ, 10 пМ или ниже 10 пМ, 3 пМ или ниже 3 пМ и 1 пМ или ниже 1 пМ. В другом варианте низкая концентрация может представлять собой концентрацию, при которой соответствующее анти-CTLA-4 антитело проявляет минимальную связывающую активность. Случай, когда существенная концентрация равна нулю (в отсутствие аденозин-содержащего соединения), также может быть выбран как вариант осуществления низкой концентрации. В одном варианте осуществления в качестве более низкой концентрации здесь может быть выбрана концентрация 1 мМ, 100 мкМ, 10 мкМ, 1 мкМ, при которой соответствующее анти-CTLA-4 антитело проявляет минимальную связывающую активность, или отсутствие соединения аденозина. В другом варианте осуществления настоящего изобретения в качестве отношения высокой концентрации к низкой концентрации могут быть выбраны следующие значения: например, в 3 раза или более, в 10 раз или более, в 30 раз или более, в 100 раз или более, в 300 раз или более, 1×10^3 раз или более, 3×10^3 раз или более, 1×10^4 раз

или более, 3×10^4 раз или более, 1×10^5 раз или более, 3×10^5 раз или более, 1×10^6 раз
или более, 3×10^6 раз или более, 1×10^7 раз или более, 3×10^7 раз или более, 1×10^8 раз
или более, 3×10^8 раз или более, 1×10^9 раз или более, 3×10^9 раз или более, 1×10^{10}
раз или более, 3×10^{10} раз или более, 1×10^{11} раз или более, 3×10^{11} раз или более или 1
5 $\times 10^{12}$ раз или более.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в качестве более
низкой концентрации может быть выбрана концентрация 1 мМ, 100 мкМ, 10 мкМ, 1
мкМ, при которой соответствующее анти-CTLA-4 антитело проявляет минимальную
связывающую активность, или в отсутствие соединения аденозина. В другом варианте
10 осуществления настоящего изобретения в качестве отношения высокой концентрации к
низкой концентрации могут быть выбраны следующие значения: например, в 3 раза
или более, в 10 раз или более, в 30 раз или более, в 100 раз или более, в 300 раз или
более, в 1×10^3 раз или более, в 3×10^3 раз или более, в 1×10^4 раз или более, в 3×10^4
раз или более, в 1×10^5 раз или более, в 3×10^5 раз или более, в 1×10^6 раз или более, в
15 3×10^6 раз или более, в 1×10^7 раз или более, в 3×10^7 раз или более, в 1×10^8 раз или
более, в 3×10^8 раз или более, в 1×10^9 раз или более, в 3×10^9 раз или более, в 1×10^{10}
раз или более, в 3×10^{10} раз или более, в 1×10^{11} раз или более, в 3×10^{11} раз или более
или в 1×10^{12} раз или более.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4
20 антитела по настоящему изобретению обладают активностью связывания также с
аденозин-содержащими соединениями. Количество связывания аденозин-содержащего
соединения на единицу количества анти-CTLA-4-антитела можно рассчитать с
использованием вышеупомянутого метода и использовать в качестве связывающей
активности антитела с аденозин-содержащим соединением. Конкретные способы
25 измерения и расчета таких количеств связывания описаны в примерах ниже. Величина
количества связывания аденозинсодержащего соединения на единицу количества анти-
CTLA-4 антитела по настоящему изобретению может составлять, например, 0,0001 или
более, 0,0002 или более, 0,0003 или более, 0,0004 или более, 0,0005 или более, 0,0006
или более, 0,0007 или более, 0,0008 или более, 0,0009 или более, 0,001 или более, 0,002
30 или более, 0,003 или более, 0,004 или более, 0,005 или более, 0,006 или более, 0,007 или
более, 0,008 или более, 0,009 или более или 0,01 или более.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4
антитела по настоящему изобретению образуют тройной комплекс с аденозин-
содержащим соединением и CTLA-4. В одном варианте осуществления настоящего

изобретения анти-CTLA-4 антитело связывается с аденозин-содержащим соединением через CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи. В одном варианте осуществления анти-CTLA-4 антитело имеет мотив связывания с аденозин-содержащим соединением. Мотив связывания для аденозин-содержащего соединения может состоять, например, из по меньшей мере одной аминокислоты, присутствующей в положениях 33, 52, 52a, 53, 56, 58, 95, 96, 100a, 100b и 100c в соответствии с нумерацией по Kabat. В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитело связывается с аденозин-содержащим соединением, например, через по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из положений 33, 52, 52a, 53, 56, 58, 95, 96, 100a, 100b и 100c по нумерации Kabat. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитела содержат по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Thr в положении 33, Ser в положении 52, Ser в положении 52a, Arg в положении 53, Tyr в положении 56, Tyr в положении 58, Tyr в положении 95, Gly в положении 96, Met в положении 100a, Leu в положении 100b и Trp в положении 100c согласно нумерации Kabat. CTLA-4 может дополнительно связываться с комплексом, образованным связыванием анти-CTLA-4 антитела и аденозин-содержащего соединения. Более того, аденозин-содержащее соединение может присутствовать на поверхности раздела, где взаимодействуют анти-CTLA-4 антитела и CTLA-4, и может связываться с ними обоими. С помощью таких методов, как описанный ниже анализ кристаллической структуры, можно подтвердить, что анти-CTLA-4 антитело образует тройной комплекс с аденозин-содержащим соединением и CTLA-4 (см. примеры).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению связываются по меньшей мере с одной аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из аминокислот в положении 3 (Met), положении 33 (Glu), положении 35 (Arg), положении 53 (Thr), положении 97 (Glu), положении 99 (Met), положении 100 (Tyr), положении 101 (Pro), положении 102 (Pro), положении 103 (Pro), положении 104 (Tyr), положении 105 (Tyr) и положении 106 (Leu) CTLA-4 человека (внеклеточный домен; SEQ ID NO: 28). Эти аминокислоты могут составлять эпитоп анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению. В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению связываются с областью от аминокислоты в положении 97 (Glu) до аминокислоты в положении 106 (Leu) CTLA-4 человека (внеклеточный домен; SEQ ID №: 28). В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-

4 антитела по настоящему изобретению связываются с областью от аминокислоты в положении 99 (Met) до аминокислоты в положении 106 (Leu) CTLA-4 человека (внеклеточный домен; SEQ ID №: 28).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению конкурируют с АВАМ004 (VH, SEQ ID NO: 10; VL, SEQ ID NO: 11; HVR-H1, SEQ ID NO: 100; HVR-H2, SEQ ID NO: 101; HVR-H3, SEQ ID NO: 102; HVR-L1, SEQ ID NO: 113; HVR-L2, SEQ ID NO: 114; HVR-L3, SEQ ID NO: 115) по связыванию с CTLA-4. В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению связываются с тем же эпитопом, что и АВАМ004. При избытке анти-CTLA-4 антител связывание АВАМ004 с CTLA-4 может быть снижено, например, на 10% или более, 15% или более, 20% или более, 25% или более, 30% или более, 35% или более, 40% или более, 45% или более, 50% или более, 55% или более, 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более или 95% или более. В настоящем описании приводятся примеры анализов конкуренции.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению проявляют цитотоксическую активность в отношении клеток, экспрессирующих CTLA-4. Когда CTLA-4 экспрессируется на поверхности клетки-мишени и с ней связывается анти-CTLA-4 антитело, клетка может быть повреждена. Повреждение клетки может быть вызвано эффекторными клетками, связанными с антителом, например активностью антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и активностью антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), или оно может быть вызвано компонентами, связанными с антителом, такими как комплементзависимая цитотоксичность (CDC). В другом варианте повреждение может быть вызвано цитотоксическим агентом (например, радиоизотопным или химиотерапевтическим агентом), конъюгированным с антителом, таким как иммуноконъюгат. Цитотоксичность в настоящем изобретении может включать эффекты индукции гибели клеток, подавления клеточной пролиферации и нарушения клеточных функций. Когда анти-CTLA-4 антитело присутствует в достаточном количестве, оно может вызвать повреждение, например, 10 % или более, 15% или более, 20% или более, 25% или более, 30% или более, 35% или более, 40% или более, 45% более или, 50% или более, 55% или более, 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, или 95% или более клеток, экспрессирующих CTLA-4. Измерение такой цитотоксической

активности можно проводить, сравнивая ее с измерением в отсутствие антитела или в присутствии антитела отрицательного контроля. В настоящем описании приводятся примеры анализов цитотоксичности.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению проявляют нейтрализующую активность в отношении CTLA-4. Известно, что CTLA-4 функционирует, взаимодействуя со своим лигандом, CD80 (B7-1) или CD86 (B7-2). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитела ингибируют взаимодействие CTLA-4 с CD80 (B7-1) или CD86 (B7-2). Когда анти-CTLA-4 антитело присутствует в достаточном количестве, оно может ингибировать взаимодействие CTLA-4 с CD80 (B7-1) или CD86 (B7-2), например, на 10% или более, 15% или более, 20% или более, 25% или более, 30% или более, 35% или более, 40% или более, 45% или более, 50% или более, 55% или более, 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, или 95% или более. Измерение такой ингибирующей активности можно проводить, сравнивая ее с измерением в отсутствие антитела или в присутствии антитела отрицательного контроля. В настоящем описании представлены конкретные способы измерения нейтрализующей активности.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению связываются с CTLA-4, происходящим от нескольких видов животных. Примеры видов животных могут включать млекопитающих, например, людей, обезьян, мышей, крыс, хомяков, морских свинок, кроликов, свиней, крупного рогатого скота, коз, лошадей, овец, верблюдов, собак и кошек. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитела связываются с CTLA-4, полученными от людей и от других видов (например, обезьян, мышей и крыс). Аминокислотная последовательность CTLA-4 человека представлена в SEQ ID NO: 214, аминокислотная последовательность CTLA-4 обезьян представлена в SEQ ID NO: 247, а аминокислотная последовательность CTLA-4 мыши представлена в SEQ ID NO: 248. Аминокислотные последовательности CTLA-4, полученные от других видов животных, также можно надлежащим образом определить способами, известными специалистам в данной области.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аденозин-содержащие соединения по настоящему изобретению могут включать, например, аденозин (АДО), аденозинтрифосфат (АТФ), аденозиндифосфат (АДФ), аденозинмонофосфат (АМФ), циклический аденозинмонофосфат (цАМФ),

дезоксиаденозин (дАДО), дезоксиаденозин трифосфат (dATP), дезоксиаденозиндифосфат (dADP), дезоксиаденозинмонофосфат (dAMP) и аденозин (γ -тио) трифосфат (ATP γ S).

5 В одном объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, содержащее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (а) последовательности HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223; (б) последовательности HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 224; и (в) последовательности HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 225. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 224; и (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 225.

15 В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, содержащее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (а) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 226; (б) HVR-L2 содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227; и (в) HVR-L3 содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит (а) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 226; (б) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227; и (в) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228.

25 В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, содержащее (а) домен VH, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три VH HVR, выбранные из (i) последовательности HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223, (ii) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 224, и (iii) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 225; и (б) домен VL, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности (i) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 226, (ii) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227, и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, содержащее (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 224; (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 225; (г) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 226; (д) последовательность HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227; и (е) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 228.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, содержащее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (а) последовательности HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; (б) последовательности HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101; и (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102. В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело содержит (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101; и (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, содержащее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (а) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113; (б) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114; и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115. В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело содержит (а) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113; (б) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114; и (в) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее (а) домен VH, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере все три последовательности VH HVR, выбранные из (i) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, (ii) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и (iii) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и (б) домен VL,

содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере все три VL HVR, выбранные из (i) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113, (ii) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114, и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее (а) домен HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; (б) домен HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101; (в) домен HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; (г) домен HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113; (д) домен HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114; и (е) домен HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (а) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; (б) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104; и (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104; и (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (а) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116; (б) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит последовательности: (а) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116; (б) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (в) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее (а) домен VH, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере все три последовательности VH HVR, выбранные из (i) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, (ii) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104, и (iii) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и (б) домен VL, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере все три последовательности VL HVR, выбранные из (i) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116, (ii) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104; (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; (г) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116; (д) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (е) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 115.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (а) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105; (б) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106; и (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело включает последовательности (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106; и (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (а) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122; (б) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 133. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело включает последовательности (а) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122; (б) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (в) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее (а) домен VH, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две, или все три последовательности VH HVR, выбранные из (i) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105, (ii) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, и (iii) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и (б) домен VL, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (i) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122, (ii) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее последовательности (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106; (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; (г) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122; (д) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (е) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 133.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (а) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108; и (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело включает последовательности: (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108; и (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (а) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121; (б) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123; и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит (а) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121; (б) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123; и (в) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее (а) домен VH, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (i) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107, (ii) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108, и (iii) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и (б) домен VL, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (i) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121, (ii) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123, и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее последовательности (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108; (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; (г) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121; (д) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123; и (е) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 153.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (а) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110; и (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102. В одном из вариантов осуществления настоящего

изобретения антитело содержит (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110; и (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

5 В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR выбраны из (а) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122; (б) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит (а) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122; (б) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (в) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

15 В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее (а) домен VH, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (i) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107, (ii) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110, и (iii) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и (б) домен VL, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (i) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122, (ii) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

20 В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее последовательности (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110; (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; (г) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122; (д) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (е) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 133.

30 В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три

последовательности VH HVR, выбранные из (а) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112; и (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112; и (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (а) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128; (б) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (в) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит (а) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128; (б) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (в) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее (а) домен VH содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (i) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107, (ii) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112, и (iii) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и (б) домен VL, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (i) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128, (ii) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее последовательности : (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112; (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; (г) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128; (д) HVR-L2, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 117; и (е) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 133.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (а) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111; и (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело включает (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111; и (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (а) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128; (б) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит последовательности (а) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128; (б) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (в) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее (а) домен VH, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (i) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107, (ii) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111, и (iii) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152; и (б) домен VL, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (i) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128, (ii) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее последовательности (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111; (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152; (г) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128; (д) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (е) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 133.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (а) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112; и (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело включает (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112; и (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (а) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129; (б) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело включает (а) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129; (б) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (в) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее (а) домен VH, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (i) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107, (ii) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112, и (iii) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и (б) домен VL, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (i) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID

NO: 129, (ii) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112; (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; (г) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129; (д) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (е) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 133.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (а) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111; и (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111; и (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR выбраны из (а) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129; (б) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит (а) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129; (б) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (в) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее (а) домен VH, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (i) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107, (ii) HVR-H2, содержащей

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111, и (iii) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152; и (б) домен VL, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (i) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129, (ii) HVR-L2 содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, и (в) HVR-L3 содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (а) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109; и (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело включает (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109; и (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (а) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130; (б) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело включает (а) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130; (б) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (в) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее (а) домен VH, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (i) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107, (ii) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109, и (iii) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и (б) домен VL, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (i) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID

NO: 130, (ii) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, и (v) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее (a) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109; (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; (г) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130; (д) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (е) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 133.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения любая одна или более аминокислот анти-CTLA-4 антитела, как указано выше, заменены в следующих положениях HVR:

- в HVR-H1 (SEQ ID NO: 223): положение 2
- в HVR-H2 (SEQ ID NO: 224): положения 4, 5, 7, 13 и 16
- в HVR-H3 (SEQ ID NO: 225): положение 3
- в HVR-L1 (SEQ ID NO: 226): положения 1, 3, 6, 11, 12 и 14
- в HVR-L2 (SEQ ID NO: 227): положения 1, 3, 4 и 7
- в HVR-L3 (SEQ ID NO: 228): положения 1 и 10

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения замещения являются консервативными, согласно предусмотренному в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения любое одно или несколько замещений может быть выполнено в виде комбинации:

- в HVR-H1 (SEQ ID NO: 100): H2A, R или K
- в HVR-H2 (SEQ ID NO: 101): S4T; R5Q; G7H; D13E или R; K16R
- в HVR-H3 (SEQ ID NO: 102): K3A
- в HVR-L1 (SEQ ID NO: 113): T1D, Q или E; T3P; D6G; N11T; Y12W; S14H
- в HVR-L2 (SEQ ID NO: 114): E1F или Y; S3I; K4S; S7E или K
- в HVR-L3 (SEQ ID NO: 115): S1Q; M10T

Все возможные комбинации вышеуказанных замен охватываются консенсусными последовательностями SEQ ID NO: 223, 224, 225, 226, 227 и 228 для HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, и HVR-L3 соответственно.

В любом из перечисленных выше вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитело является гуманизированным. В одном из вариантов

осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитело содержит области HVR, как в любом из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, и дополнительно содержит акцепторный каркас человека, например, каркас иммуноглобулина человека или консенсусный каркас человека. В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитело содержит HVR, как в любом из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, и дополнительно содержит VH или VL, содержащие последовательность FR. В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитело содержит последовательность (последовательности) FR переменного домена тяжелой цепи и/или легкой цепи, как указано ниже: для переменного домена тяжелой цепи FR1 содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 229-232, FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 233, FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 234, FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 235; и для переменного домена легкой цепи FR1 содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 236-238, FR2 содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 240-241, FR3 содержит любую из аминокислотных последовательностей последовательности SEQ ID NO: 242-244, FR4 содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 245-246.

В другом объекте настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность VH по меньшей мере при идентичности 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% содержит замещения (*например*, консервативные замещения), инсерции или делеции относительно эталонной последовательности, но анти-CTLA-4 антитело, включающее такую последовательность, сохраняет способность связываться с CTLA-4. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения в совокупности от 1 до 10 аминокислот, до 11, до 12, до 13, до 14 или до 15 аминокислот заменены, инсертированы и/или делетированы в SEQ ID NO: 10. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения замещения, инсерции или делеции находятся вне HVR (т.е. в FR). Необязательно анти-CTLA-4 антитело содержит последовательность VH в SEQ ID NO: 10, включая посттрансляционные модификации

этой последовательности. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения VH содержит одну, две или три области HVR, выбранные из: (а) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, (б) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:102.

Посттрансляционные модификации включают, но не ограничиваются ими, модификацию глутамина или глутамата на N-конце тяжелой или легкой цепи в пироглутаминовую кислоту путем пироглутамилирования.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают анти-CTLA-4 антитело, которое содержит переменный домен легкой цепи (VL), последовательность которого по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность VL, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична, содержит замены (например, консервативные замещения), инсерции или делеции относительно эталонной последовательности, но анти-CTLA-4 антитело, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с CTLA-4. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения в совокупности от 1 до 10 аминокислот, до 11, до 12, до 13, до 14 или до 15 аминокислот заменены, инсертированы и/или делетированы в SEQ ID NO: 11. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения замещения, инсерции или делеции находятся вне HVR (т.е. в FR). Необязательно анти-CTLA-4 антитело содержит последовательность VL в SEQ ID NO: 11, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения VL содержит одну, две или три области HVR, выбранные из: (а) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, (б) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:102.

Посттрансляционные модификации включают, но не ограничиваются ими, модификацию глутамина или глутамата на N-конце тяжелой или легкой цепи в пироглутаминовую кислоту путем пироглутамилирования.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают анти-CTLA-4 антитело, которое содержит переменный домен легкой цепи (VL), последовательность которого по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 149. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения VL, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична, содержит замены (например, консервативные замещения), инсерции или делеции относительно эталонной последовательности, но анти-CTLA-4 антитело, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с CTLA-4. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения в совокупности от 1 до 10 аминокислот, до 11, до 12, до 13, до 14 или до 15 аминокислот заменены, инсертированы и/или делетированы в SEQ ID NO: 149. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения замещения, инсерции или делеции находятся вне HVR (т.е. в FR). Необязательно анти-CTLA-4 антитело содержит VL в SEQ ID NO: 149, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения VL содержит одну, две или три области HVR, выбранные из: (а) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, (б) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, и (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133. Посттрансляционные модификации включают, но не ограничиваются ими, модификацию глутамина или глутамата на N-конце тяжелой или легкой цепи в пироглутаминовую кислоту путем пироглутамилирования.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают анти-CTLA-4 антитело, которое содержит VH, как в любом из вариантов осуществления настоящего изобретения, представленных выше, и VL, как в любом из вариантов осуществления настоящего изобретения, представленных выше. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит VH и VL в SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит VH и VL в SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит VH и VL в SEQ ID NO: 83 и SEQ ID NO: 97, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит VH и VL в SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 134, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения

антитело содержит VH и VL в SEQ ID NO: 136 и SEQ ID NO: 95, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит VH и VL в SEQ ID NO: 140 и SEQ ID NO: 146, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит VH и VL в SEQ ID NO: 141 и SEQ ID NO: 146, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит VH и VL в SEQ ID NO: 140 и SEQ ID NO: 147, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит VH и VL в SEQ ID NO: 136 и SEQ ID NO: 149 соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В еще одном объекте настоящего изобретения предусматривают гетеромерное анти-CTLA-4 антитело, которое антитело содержит по меньшей мере две разные вариабельные области, выбранные из вариабельных областей, содержащих последовательности VH и VL, представленные выше. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит VH и VL в SEQ ID NO: 140 и SEQ ID NO: 146, соответственно, и VH и VL в SEQ ID NO: 141 и SEQ ID NO: 146, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит VH и VL в SEQ ID NO: 140 и SEQ ID NO: 147, соответственно, и VH и VL в SEQ ID NO: 141 и SEQ ID NO: 147, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. Посттрансляционные модификации включают, но не ограничиваются ими, модификацию глутамина или глутамата на N-конце тяжелой или легкой цепи в пироглутаминовую кислоту путем пироглутамилирования.

30 Когда аминокислота на N-конце тяжелой цепи или легкой цепи анти-CTLA-4 антитела, предусмотренного в настоящем изобретении, представляет собой глутамин, эта аминокислота может быть заменена глутаматом. Когда аминокислота на N-конце тяжелой цепи или легкой цепи анти-CTLA-4 антитела, предусмотренного в настоящем

изобретении, является глутаматом, эта аминокислота может быть заменена глутамином.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее такой же эпитоп, что и у анти-CTLA-4 антитела, предусмотренного в настоящем изобретении. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и любое из антител, перечисленных в табл. 4, табл. 9, табл. 14 и табл. 19. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают антитело, которое связывается с эпитопом в пределах фрагмента CTLA-4, содержащего по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аминокислот в положении 3 (Met), положении 33 (Glu), положении 35 (Arg), положении 53 (Thr), положении 97 (Glu), положении 99 (Met), положении 100 (Tyr), положении 101 (Pro), положении 102 (Pro), положении 103 (Pro), положении 104 (Tyr), положении 105 (Tyr) и положение 106 (Leu) SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают антитело, которое связывается с эпитопом в пределах фрагмента CTLA-4, состоящего из аминокислот от положениях от 97 (Glu) до положения 106 (Leu) в последовательности SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают антитело, которое связывается с эпитопом в пределах фрагмента CTLA-4, состоящего из аминокислот от положениях от 99 (Met) до положения 106 (Leu) в последовательности SEQ ID NO: 28.

В еще одном объекте настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитело в соответствии с любым из приведенных выше вариантов осуществления настоящего изобретения представляет собой моноклональное антитело, включая химерное, гуманизированное или антитело человека. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело против CTLA-4 представляет собой фрагмент антитела, например, фрагмент F_v, Fab, Fab', scFv, диатело или фрагмент F(ab')₂. В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой антитело полной длины, например, интактное антитело IgG1, интактное антитело IgG4 или антитело другого класса или изотипа по настоящему изобретению.

В другом объекте настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению содержат константные области. Константные области могут представлять собой константные области тяжелой цепи (включая Fc-области), константные области легкой цепи или и то, и другое. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Fc-область является нативной. Примеры константных областей тяжелой

цепи, полученных из нативных антител, могут включать, например, константные области тяжелой цепи, такие как IgG1 человека (SEQ ID NO: 249), IgG2 человека (SEQ ID NO: 250), IgG3 человека (SEQ ID NO: 251) и IgG4 человека (SEQ ID NO: 252). Кроме того, в других примерах константные области тяжелой цепи могут включать

5 константные области тяжелой цепи SEQ ID NO: 82 и 158. Примеры константных областей легкой цепи, полученных из нативных антител, могут включать, например, константные области легкой цепи, такие как κ -цепь человека (SEQ ID NOs : 33, 63 и 159) и λ -цепи человека (SEQ ID NO: 53 и 87).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области

10 представляет собой вариант Fc-области, полученной путем добавления аминокислотных изменений к Fc-области нативной последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области имеет повышенную связывающую активность по меньшей мере с одним рецептором Fc γ ,

15 выбранным из группы, состоящей из Fc γ RIa, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb и Fc γ RIIIa, по сравнению с Fc-областью нативной последовательности. В других вариантах осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области имеет повышенную связывающую активность с Fc γ RIIa и Fc γ RIIIa по сравнению с Fc-областью нативной

20 последовательности. Примеры константных областей тяжелой цепи, содержащих такой вариант Fc-области, включают, например, константные области тяжелой цепи, перечисленные в табл. 26-30, и константные области тяжелой цепи SEQ ID NO: 31, 32, 41-46, 65, 66, 81, 207, 239, 253-271, 276, 277 и 278.

Fc-область нативной последовательности обычно состоит из гомодимера, состоящего из двух идентичных полипептидных цепей. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области может быть гомодимером,

25 состоящим из полипептидных цепей с той же последовательностью, или гетеродимером, состоящим из полипептидных цепей, отличающимися друг от друга. Аналогичным образом константные области тяжелой цепи, содержащие Fc-область, могут быть гомодимерными и состоять из полипептидных цепей с одинаковыми последовательностями, или гетеродимерами, состоящими из полипептидных цепей с

30 отличающимися друг от друга последовательностями. Примеры константных областей гетеромерной тяжелой цепи включают, например, константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 31 и 32; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 43 и 44; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 45 и 46; константные

области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 254 и 256; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 257 и 258; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 259 и 260; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 261 и 263; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 262 и 264; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 265 и 267; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 266 и 268; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 269 и 270; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 271 и 81; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 65 и 66; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 239 и 207; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 259 и 276; и константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 65 и 278.

В другом объекте анти-CTLA-4 антитело в соответствии с любым из приведенных выше вариантов осуществления настоящего изобретения может включать любые признаки, по отдельности или в комбинации, как описано в разделах 1-7 ниже:

1. Связывающая активность антитела

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения с, предусмотренная в настоящем изобретении, представлена константой диссоциации (KD), равной 10 мкМ или менее, 1 мкМ или менее, 100 нМ или менее, 10 нМ или менее, 1 нМ или менее, 0,1 нМ или менее, 0,01 нМ или менее или 0,001 нМ или менее (например, 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающую активность определяют путем анализа с применением радиоактивно-меченого антигена (RIA - radiolabeled antigen binding assay). В еще одном из вариантов осуществления настоящего изобретения RIA проводят с версией Fab исследуемого антитела и его антигена. Например, аффинность связывания Fab в растворе с антигеном измеряют путем уравнивания Fab с минимальной концентрацией (125 I)-меченого антигена в присутствии серии титрования немеченого антигена, а затем захвата связанного антигена с помощью планшета, покрытого анти-Fab антителом (см., например, Chen с соавт., *J. Mol. Biol.* 1999, 293: 865-881). Чтобы определить условия для анализа,

мультилуночные планшеты MICROTITER (зарегистрированная торговая марка) (фирма Thermo Scientific) покрывают в течение ночи 5 мкг/мл захватывающего анти-Fab антитела (фирма Cappel Labs) в 50 мМ карбонате натрия (рН 9,6) и затем блокируют 2% (масса/объем) бычьего сывороточного альбумина (БСА) в фосфатно-солевом буфере (TBS) в течение двух-пяти часов при комнатной температуре (приблизительно 23°C). В планшете без адсорбции (фирма Nunc, номер в каталоге 269620) 100 пМ или 26 пМ [¹²⁵I]-антигена смешивают с серийными разведениями исследуемого Fab (например, в соответствии с оценкой анти-VEGF-антитела, Fab-12, в публикации Presta с соавт., *Cancer Res.* 1997, 57: 4593-4599). Затем исследуемый Fab инкубируют в течение ночи; однако инкубация может продолжаться в течение более длительного периода (например, около 65 ч), чтобы обеспечить достижение равновесия. После этого смеси переносят на планшет для захвата для инкубации при комнатной температуре (например, в течение одного часа). Затем раствор удаляют, и планшет восемь раз промывают 0,1% полисорбатом 20 (TWEEN-20 (зарегистрированная торговая марка)) в TBS. Когда планшеты высохнут, добавляют 150 мкл/лунку сцинтиллятора (MICROSCINT-20TM; фирма Packard) и планшеты подсчитывают на гамма-счетчике TOPCOUNTTM (фирма Packard) в течение десяти минут. Концентрации каждого Fab, дающие меньше или равную 20% от максимального связывания, выбирают для использования в анализах конкурентного связывания.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающую активность антитела измеряют с помощью анализа захвата лиганда с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса в качестве принципа измерения, например, с помощью BIACORE (зарегистрированная торговая марка) T200 или BIACORE (зарегистрированная торговая марка) 4000 (фирма GE Healthcare, Уппсала, Швеция). Программное обеспечение BIACORE (зарегистрированная торговая марка) Control Software используется для работы устройства. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения применяют комплект для соединения аминов (фирма GE Healthcare, Уппсала, Швеция) в соответствии с инструкцией поставщика, а сенсорный чип, покрытый карбоксиметилдекстраном (фирма GE Healthcare, Уппсала, Швеция), иммобилизуют с молекулой для захвата лиганда, например, антителом против метки (анти-tag антителом, антителом против IgG и белком А). Молекулу для захвата лиганда разбавляют 10 мМ раствором ацетата натрия при соответствующем рН и вводят с соответствующими скоростью потока и временем введения. Анализ активности связывания проводят с использованием буфера, содержащего 0,05%

полисорбата 20 (другое название – TWEEN (зарегистрированный товарный знак)-20) в качестве буфера для анализа, при скорости потока от 10 до 30 мкл/мин и при температуре анализа предпочтительно 25°C или 37°C. Когда проводят анализ, позволяя молекуле для захвата лиганда захватить антитело в качестве лиганда, серийное разведение антигена или Fc рецептора, приготовленного с буфером для анализа (аналита), вводят после захвата целевого количества антитела путем инъекции антитела. Когда анализ проводят, позволяя молекуле для захвата лиганда захватить антиген или Fc рецептор в качестве лиганда, серийное разведение антитела, приготовленного с буфером для анализа (аналита), вводят после захвата целевого количества антигена или рецептора Fc путем инъекции, антиген или рецептор Fc.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения результаты анализируют с использованием программного обеспечения для оценки BIACORE (зарегистрированная торговая марка). Параметры кинетики рассчитываются путем одновременной подгонки сенсограмм связывания и диссоциации с использованием модели связывания 1:1, что позволяет рассчитать скорость связывания (k_{on} или k_a), скорость диссоциации (k_{off} или k_d) и равновесную константу диссоциации (KD). Когда связывающая активность слабая, особенно когда диссоциация быстрая и трудно рассчитать кинетические параметры, равновесную константу диссоциации (KD) можно рассчитать с использованием модели стационарного состояния. В качестве другого параметра связывающей активности можно рассчитать «количество связывания анализита на единицу количества лиганда» путем деления количества связывания анализита при определенной концентрации (RU) на количество захваченного лиганда (RU).

2. Фрагменты антитела

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотренное антитело является фрагментом антитела. К фрагментам антитела относятся, но ими перечень не ограничивается, фрагменты Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv и scFv, а также другие фрагменты, описанные ниже. Обзор определенных фрагментов изложен в публикации Hudson с соавт., *Nat. Med.* 2003, 9:129-134. Для обзора фрагментов scFv, см., например, Pluckthün в кн.: «The Pharmacology of Monoclonal Antibodies», под ред. Rosenburg и Moore, (изд-во Springer-Verlag, Нью-Йорк), 1994, т. 113:269-315; см. также WO 93/16185 и US 5571894 и US 5587458. Для обсуждения фрагментов Fab и F(ab')₂, содержащих остатки эпитопа, связывающего рецептор спасения, и имеющих повышенный период полужизни *in vivo*, см. US 5869046.

Диатела представляют собой фрагменты антител с двумя сайтами связывания антигена, которые могут быть бивалентными или биспецифичными. См., например, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson с соавт., *Nat. Med.* 2003, 9: 129-134; Hollinger с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90: 6444-6448. Тритела и тетратела также описаны в работе Hudson с соавт., *Nat. Med.* 2003, 9: 129-134.

Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие весь или часть переменного домена тяжелой цепи или весь или часть переменного домена легкой цепи антитела. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения однодоменное антитело представляет собой однодоменное антитело человека (фирма Domantis, Inc., Уолтем, Массачусетс; см., например, US 6248516 B1).

Фрагменты антител могут быть получены различными способами, включая, но не ограничиваясь ими, протеолитическое расщепление интактного антитела, а также продуцирование рекомбинантными клетками-хозяевами (например, *E. coli* или фагом), как описано в настоящем описании.

3. Химерные и гуманизированные антитела

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматриваемое антитело является химерным антителом. Определенные химерные антитела описаны, например, в US 4816567; и Morrison с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81: 6851-6855. В одном из примеров химерное антитело содержит переменную область, отличную от области человека (например, переменную область, полученную от мыши, крысы, хомяка, кролика или примата, например, обезьяны) и константную область человека. В другом примере химерное антитело представляет собой антитело «переключенного класса», в котором класс или подкласс был изменен по сравнению с классом или подклассом родительского антитела.

Химерные антитела включают их антиген-связывающие фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения химерное антитело представляет собой гуманизированное антитело. Как правило, антитело, полученное не от человека, гуманизируют для снижения иммуногенности для человека, сохраняя при этом специфичность и аффинность родительского антитела, полученного не от человека. Как правило, гуманизированное антитело содержит один или более переменных доменов, в которых HVR, например, CDR (или их части) получены из антитела, полученного не от человека, а FR (или их части) получены из последовательностей антитела человека. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать по меньшей мере часть константной области человека. В

некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения некоторые остатки FR в гуманизированном антителе заменены соответствующими остатками антитела, полученного не от человека, (например, антитела, из которого получены остатки HVR), например, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

5 Гуманизированные антитела и способы их получения рассматриваются, например, в работах Almagro и Fransson, *Front. Biosci.* 2008, 13:1619-1633; Riechmann с соавт., *Nature* 1988, 332: 323-329; Queen с соавт., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1989, 86:10029-10033; US 5821337, US 7527791, US 6982321 и US 7087409; Kashmiri с соавт., 10 *Methods* 2005? 36:25-34 (описание внедрения области, определяющей специфичность (SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 1991, 28:489-498 (описание «обновления»); Dall'Acqua с соавт., *Methods*, 2005, 36:43-60 (описание «перетасовки FR»); Osbourn с соавт., *Methods*, 2005, 36:61-68; Klimka с соавт., *Br. J. Cancer*, 2000, 83:252-260 (описание подхода «направленной селекции» для перетасовки FR).

15 Каркасные области человека, которые можно использовать для гуманизации, включают, но не ограничиваются ими: каркасные области, выбранные с использованием метода «наилучшего соответствия» (см., например, Sims с соавт., *J. Immunol.* 1993, 151:2296); каркасные области, полученные из консенсусной последовательности антител человека конкретной подгруппы вариабельных областей 20 легкой или тяжелой цепи (см., например, Carter с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89:4285; Presta с соавт., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)); зрелые (соматически мутированные) каркасные области человека или каркасные области зародышевой линии человека (см., например, Almagro и Fransson, *Front. Biosci.* 2008, 13:1619-1633); каркасные области, полученные в результате скрининга библиотек FR (см., например, 25 Васа с соавт., *J. Biol. Chem.* 1997, 272:10678-10684; Rosok с соавт., *J. Biol. Chem.* 1996, 271: 22611-22618).

4. Антитела человека

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотренное антитело является антителом человека. Антитела человека могут быть получены с 30 использованием различных методов, известных в данной области. Антитела человека в общем описаны в публикациях van Dijk и van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 2001, 5: 368-374; и Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 2008, 20:450-459.

Антитела человека могут быть получены путем введения иммуногена трансгенному животному, которое было модифицировано для получения интактных

антител человека или интактных антител с переменными областями человека в ответ на антигенную стимуляцию. Такие животные обычно содержат все или часть локусов иммуноглобулинов человека, которые заменяют эндогенные локусы иммуноглобулинов, или которые присутствуют внехромосомно или случайным образом интегрированы в хромосомы животного. У таких трансгенных мышей локусы эндогенного иммуноглобулина обычно инактивированы. Для обзора методов получения антител человека от трансгенных животных см. Lonberg, *Nat. Biotech.* 2005, 23: 1117-1125. См. также, например, патенты US 6075181 и US 6150584, в которых описана технология XENOMOUSE™; US 5770429, описывающую технологию NuMab (зарегистрированная торговая марка); US 7041870 описывает технологию K-M MOUSE (зарегистрированная торговая марка) и US 2007/0061900 описывает технологию VelociMouse (зарегистрированная торговая марка). Переменные области человека из интактных антител, генерируемых такими животными, могут быть дополнительно модифицированы, например, путем объединения с другой константной областью человека.

Антитела человека также могут быть получены методами на основе гибридом. Описаны клеточные линии миеломы человека и мышино-человеческой гетеромиеломы для выработки моноклональных антител человека (см., например, Kozbor *J. Immunol.*, 1984, 133:3001; Brodeur с соавт., «*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*», 1987, стр. 51-63, изд-во Marcel Dekker, Inc., Нью-Йорк); Woerner с соавт., *J. Immunol.*, 1991, 147: 86). Также описаны антитела человека, полученные с помощью гибридомной технологии В-клеток человека в публикации Li с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103:3557-3562. К дополнительным относятся методы, описанные, например, в US 7189826 (выработка моноклональных антител IgM человека из клеточных линий гибридом) и Ni, *Xiandai Mianyixue*, 2006, 26(4):265-268 (описание гибридом между разными клетками человека). Технология гибридомы человека (технология Trioma) также описана в публикациях Vollmers и Brandlein, *Histology and Histopathology*, 2005, 20(3):927-937; и Vollmers и Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 2005, 27(3):185-191.

Антитела человека также могут быть получены путем выделения последовательностей переменных доменов Fv клона, выбранных из библиотек фагового дисплея человеческого происхождения. Затем такие последовательности переменных доменов можно комбинировать с желаемым константным доменом человека. Методы отбора антител человека из библиотек антител описаны ниже.

5. Антитела, разработанные на основе библиотек

Антитела по настоящему изобретению могут быть выделены путем скрининга комбинаторных библиотек на антитела с требуемой активностью или активностями. Например, в данной области известны различные методы создания библиотек фагового дисплея и скрининга таких библиотек на наличие антител, обладающих желаемыми характеристиками связывания. Такие методы рассматривают, например, в публикациях Hoogenboom с соавт., в кн.: «Methods in Molecular Biology» 2001, 178:1-37, под ред. O'Brien с соавт., изд-во Human Press, Тотова, Нью-Джерси; а также описанные, например, в работах McCafferty с соавт., *Nature* 348: 552-554; Clackson с соавт., *Nature* 1991, 352: 624-628; Marks с соавт., *J. Mol. Biol.* 1992, 222: 581-597; Marks и Bradbury, в кн.: «Methods in Molecular Biology» 2003, 248:161-175, под ред. Lo, изд-во Human Press, Тотова, Нью-Джерси; Sidhu с соавт., *J. Mol. Biol.* 2004, 338(2): 299-310; Lee с соавт., *J. Mol. Biol.* 2004, 340(5):1073-1093; Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101(34): 12467-12472; Lee с соавт., *J. Immunol. Methods* 2004, 284(1-2):119-132.

В некоторых методах фагового дисплея репертуары генов VH и VL отдельно клонируют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и случайным образом рекомбинируют в фаговых библиотеках, которые затем можно подвергать скринингу на наличие антигенсвязывающего фага, как описано в Winter с соавт., *Ann. Rev. Immunol.*, 1994, 12: 433-455. Фаг обычно отображает фрагменты антител либо в виде одноцепочечных фрагментов Fv (scFv), либо в виде фрагментов Fab. Библиотеки из иммунизированных источников обеспечивают высокоаффинные антитела к иммуногену без необходимости конструирования гибридом. В качестве альтернативы наивный репертуар может быть клонирован (например, из человека), чтобы обеспечить единый источник антител к широкому спектру чужеродных, а также собственных антигенов без какой-либо иммунизации, как описано Griffiths с соавт., *EMBO J*, 1993, 12: 725-734. В итоге, наивные библиотеки также могут быть получены синтетически путем клонирования нерearанжированных сегментов V-гена из стволовых клеток и использования праймеров ПЦР, содержащих случайную последовательность, для кодирования высоковариабельных областей CDR3 и выполнения реаранжировки *in vitro*, как описано Hoogenboom и Winter, *J. Mol. Biol.*, 1992, 227: 381-388. Патентные публикации, описывающие библиотеки фагов антител человека, включают, например: US 5750373, US 2005/0079574, US 2005/0119455, US 2005/0266000, US 2007/0117126, US 2007/0160598, US 2007/0237764, US 2007/0292936, US 2009/0002360.

Антитела или фрагменты антител, выделенные из библиотек антител человека, в настоящем изобретении считаются антителами человека или фрагментами антител человека.

6. Мультиспецифические антитела

5 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело, предусмотренное в настоящем изобретении, представляет собой мультиспецифическое антитело, например, биспецифическое антитело. Мультиспецифические антитела представляют собой моноклональные антитела, обладающие специфичностью связывания как минимум для двух разных сайтов. В некоторых вариантах

10 осуществления настоящего изобретения одна из специфичностей связывания предназначена для CTLA-4, а другая – для любого другого антигена. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифические антитела могут связываться с двумя разными эпитопами CTLA-4. Биспецифические антитела также можно использовать для локализации цитотоксических агентов в клетках, которые

15 экспрессируют CTLA-4. Биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител.

Методы получения мультиспецифических антител включают, но не ограничиваются ими, рекомбинантную совместную экспрессию двух пар тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, обладающих различной специфичностью (см. Milstein и Cuello, *Nature* 1983, 305: 537), WO 93/08829, Траунеcker *с соавт.*, *EMBO J.* 1991, 10: 20 3655), и конструирование «выступ-во-впадину» (см., например, US 5731168). Мультиспецифические антитела также могут быть получены путем разработки эффектов электростатического управления для создания Fc-гетеродимерных молекул антител (WO 2009/089004A1); перекрестное сшивание двух или более антител или их

25 фрагментов (см., например, US 4676980, и Brennan *с соавт.*, *Science*, 1985, 229:81); использование лейциновых молний для получения биспецифических антител (см., например, Kostelny *с соавт.*, *J. Immunol.*, 1992, 148(5):1547-1553); использование технологии «диатело» для получения биспецифических фрагментов антител (см., например, Hollinger *с соавт.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90: 6444-6448); и с

30 использованием одноцепочечных димеров Fv (scFv) (см., например, Gruber *с соавт.*, *J. Immunol.*, 1994, 152: 5368); и получение триспецифических антител, как описано, например, в Tutt *с соавт.*, *J. Immunol.* 1991, 147:60.

Сюда также включены сконструированные антитела с тремя или более функциональными антигенсвязывающими сайтами, включая «антитела-осьминоги» (см., например, US 2006/0025576A1).

5 Антитело или его фрагмент в настоящем изобретении также включает «Fab двойного действия (DAF – Dual Acting Fab)», содержащий антигенсвязывающий сайт, который связывается с CTLA-4, а также с другим отличающимся антигеном (см., US 2008/0069820, например).

7. Варианты антител

10 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рассматривают варианты аминокислотной последовательности антител, предусмотренных в настоящем изобретении. Например, может быть желательным улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела могут быть получены путем внесения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции, и/или инсерции, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Любая комбинация делеций, инсерций и замещений может быть использована для получения конечной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками, например, связыванием антигена.

20 а) Варианты замещений, инсерций и делеций

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлены варианты антител, имеющие одну или более аминокислотных замен. Сайты, представляющие интерес для заместительного мутагенеза, включают HVR и FR. Консервативные замены показаны в табл. 1 под заголовком «предпочтительные замещения». Более существенные изменения представлены в табл. 1 под заголовком «примеры замещений» и как дополнительно описано ниже в отношении классов боковых цепей аминокислот. Аминокислотные замены могут быть введены в интересующее антитело, а продукты подвергнуты скринингу на желаемую активность, например, на сохранение/улучшение связывания антигена, снижение иммуногенности или улучшение ADCC или CDC.

Таблица 1.

Первоначальные остатки	Примеры замещений	Предпочтительные замещения
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine	Leu

Аминокислоты можно разделить на группы в соответствии с общими свойствами их боковых цепей:

- 5 (1) гидрофобные: норлейцин, метионин (Met), аланин (Ala), валин (Val), лейцин (Leu) и изолейцин (Ile);
- (2) нейтральные и гидрофильные: цистеин (Cys), серин (Ser), треонин (Thr), аспарагин (Asn) и глутамин (Gln);
- (3) кислые: аспартат (Asp) и глутамат (Glu);
- 10 (4) основные: гистидин (His), лизин (Lys) и аргинин (Arg);
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: глицин (Gly) и пролин (Pro); а также
- (6) ароматические: триптофан (Trp), тирозин (Tyr) и фенилаланин (Phe).

Неконсервативная замена относится к замене члена одного из этих классов членом другого класса.

- 15 Один тип варианта замены включает замену одного или более остатков гипервариабельной области исходного антитела (например, гуманизированного антитела или антитела человека). Как правило, полученные варианты, выбранные для дальнейшего исследования, имеют модификации (например, улучшения) определенных

биологических свойств (например, повышенная аффинность, сниженная иммуногенность) по сравнению с исходным антителом и/или в значительной степени сохраняют определенные биологические свойства исходного антитела.

Иллюстративный вариант замены представляет собой антитело с созревшей аффинностью, которое может быть легко получено, например, с использованием методов созревания аффинности на основе фагового дисплея, таких как описанные в настоящем изобретении. Вкратце, один или более остатков HVR мутируют, а вариант антитела экспонируют на фаге и подвергают скринингу на конкретную биологическую активность (например, аффинность связывания).

10 В HVR могут быть внесены изменения (например, замены), например, для улучшения аффинности антител. Такие изменения могут быть сделаны в «горячих точках» HVR, то есть в остатках, кодируемых кодонами, которые подвергаются мутациям с высокой частотой в процессе соматического созревания (см., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 2008, 207: 179-196), и/или остатки, которые контактируют с антигеном, при этом полученный вариант VH или VL тестируют на аффинность связывания. Было описано созревание аффинности путем создания и повторного выбора из вторичных библиотек, описанных, например, Hoogenboom с соавт., *Methods in Molecular Biology*, 2001, 178:1-37, под ред. O'Brien с соавт., изд-во Human Press, Totova, Нью-Джерси. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, касающихся созревания аффинности, разнообразие вводится в 15 переменные гены, выбранные для созревания, любым из множества методов (например, подверженной ошибкам ПЦР, перестановкой цепей или мутагенезом, направленным на олигонуклеотиды). Затем создается вторичная библиотека. После этого библиотеку подвергают скринингу для выявления любых вариантов антител с желаемой аффинностью. Другой метод введения разнообразия включает подходы, направленные на HVR, в которых несколько остатков HVR (например, 4-6 остатков за раз) рандомизируют. Остатки HVR, участвующие в связывании антигена, могут быть специфически идентифицированы, например, с использованием аланинового сканирующего мутагенеза или моделирования. CDR-H3 и CDR-L3, в частности, часто 20 становятся мишенью.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения замены, инсерции или делеции могут происходить в одной или более HVR, если такие изменения существенно не снижают способность антитела связывать антиген. Например, в HVR могут быть внесены консервативные изменения (например,

консервативные замены, как предусмотрено в настоящем изобретении), которые существенно не снижают аффинность связывания. Такие изменения могут, например, быть за пределами остатков, контактирующих с антигеном, в областях HVR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в вариантах VH и VL, предусмотренных выше, каждая HVR либо не изменена, либо содержит не более одной, 5 двух или трех аминокислотных замен.

Полезный метод идентификации остатков или областей антитела, которые могут стать мишенью для мутагенеза, называется «мутагенез со сканированием аланина», как описано Cunningham и Wells, *Science*, 1989, 244: 1081-1085. В этом методе остаток или 10 группу целевых остатков (например, заряженных остатков, таких как arg, asp, his, lys и glu) идентифицируют и заменяют нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или полиаланином) для определения, есть ли влияние взаимодействия антитела с антигеном. Дополнительные замены могут быть введены в места расположения аминокислот, демонстрирующих функциональную 15 чувствительность к исходным заменам. Альтернативно или дополнительно можно анализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки могут быть выбраны или исключены как кандидаты на замену. Варианты могут быть проверены, чтобы определить, содержат ли они 20 желаемые свойства.

Вставки аминокислотной последовательности включают слияния с amino- и/или карбоксиконцом последовательностей разной длины, от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также инсерции внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры 25 концевых ирнсерций включают антитело с N-концевым метионильным остатком. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают слияние фермента (например, антитело-направленного фермента ADEPT) или полипептида, который увеличивает время полужизни антитела в плазме, с N- или C-концом антитела.

б) Варианты гликозилирования

30 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению изменено для увеличения или уменьшения степени гликозилирования антитела. Добавление или удаление сайтов гликозилирования в антителе может быть удобно осуществлено путем изменения аминокислотной

последовательности таким образом, что создается или удаляется один или более сайтов гликозилирования.

Если антитело содержит Fc-область, связанный с ним углевод может быть изменен. Нативные антитела, продуцируемые клетками млекопитающих, обычно содержат разветвленный, биантенный олигосахарид, который обычно присоединен N-связью к Asn297 домена CH2 Fc-области. См., например, Wright с соавт., *TIBTECH* 1997, 15: 26-32. Олигосахарид может включать различные углеводы, например, маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в «стволе» биантенной олигосахаридной структуры. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификации олигосахарида в антителе по настоящему изобретению могут быть выполнены для создания вариантов антител с некоторыми улучшенными свойствами.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают варианты антител, имеющие углеводную структуру, в которой отсутствует фукоза, присоединенная (прямо или косвенно) к Fc-области. Например, количество фукозы в таком антителе может составлять от 1% до 80%, от 1% до 65%, от 5% до 65% или от 20% до 40%. Количество фукозы определяют путем расчета среднего количества фукозы в цепи сахара в Asn297 по отношению к сумме всех гликоструктур, присоединенных к Asn 297 (например, сложных, гибридных структур и структур с высоким содержанием маннозы), по данным масс-спектрометрии MALDI-TOF, как описано, например в WO 2008/077546. Asn297 относится к остатку аспарагина, расположенному примерно в положении 297 в Fc-области (нумерация остатков Fc-области по EU); однако Asn297 также может быть расположен примерно на +/- 3 аминокислоты выше или ниже по цепи положения 297, то есть между положениями 294 и 300, из-за незначительных вариаций последовательности в антителах. Такие варианты фукозилирования могут иметь улучшенную функцию ADCC. См., например, публикации патентов US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Примеры публикаций, относящихся к «дефукозилированным» или «дефицитным по фукозе» вариантам антител, включают: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki с соавт., *J. Mol. Biol.* 2004, 336: 1239-1249; Yamane-Ohnuki с соавт., *Biotech. Bioeng.* 2004, 87: 614. Примеры клеточных линий,

способных продуцировать дефукозилированные антитела, включают клетки Lec13 CHO, дефицитные по фукозилрованию белков (Ripka с соавт., *Arch. Biochem. Biophys.* 1986, 249: 533-545; US Pat Appl 2003/0157108 A1, Presta L.; WO 2004/056312 A1, Adams с соавт., особенно пример 11), и линии клеток с нокаутом, например, гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы, *FUT8*, клетки CHO с нокаутом (см., например, Yamane-Ohnuki с соавт., *Biotech. Bioeng.* 2004, 87: 614; Kanda Y. с соавт., *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 94(4): 680-688; и WO 2003/085107).

Кроме того, предусматривают варианты антител с расщепленными пополам олигосахаридами, например, в которых биантенный олигосахарид, присоединенный к области F антитела, расщеплен пополам под действием GlcNAc. Такие варианты антител могут иметь пониженное фукозилрование и/или улучшенную функцию ADCC. Примеры таких вариантов антител описаны, например, в WO 2003/011878 (Jean-Mairet с соавт.); US 6602684 (Umana с соавт.); и US 2005/0123546 (Umana с соавт.). Также предусмотрены варианты антител по меньшей мере с одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенным к Fc-области. Такие варианты антител могут иметь улучшенную функцию CDC; они описаны, например, в WO 1997/30087 (Patel с соавт.); WO 1998/58964 (Raju S.); и WO 1999/22764 (Raju S.).

в) Варианты Fc-области

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одна или более аминокислотных модификаций могут быть введены в Fc-область антитела, представленного в настоящем изобретении, получая, таким образом, вариант Fc-области. Вариант Fc-области может содержать последовательность Fc-области человека (например, Fc-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащей аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или более аминокислотных положениях.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают вариант антитела, который обладает некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает его желательным кандидатом для применений, в которых важен период полужизни антитела *in vivo*, но некоторые эффекторные функции (такие как комплемент и ADCC) не нужны или вредны. Анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo* могут быть проведены для подтверждения снижения/исчерпания активности CDC и/или ADCC. Например, можно провести анализ связывания Fc-рецептора (FcR), чтобы убедиться, что антитело не связывается с FcγR (следовательно, вероятно, не имеет активности ADCC), но сохраняет способность связывать FcRn. Первичные клетки для

опосредования ADCC, клетки NK, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на кровяных клетках суммирована в табл. 3 на странице 464 в публикации Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 1991, 9: 457-492. Примеры, не являющиеся ограничительными, анализ *in vitro* для оценки активности ADCC исследуемой молекулы описаны в US 5500362 (см., например, Hellstrom I. с соавт., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 1986, 83:7059-7063) и Hellstrom I. с соавт., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 1985, 82:1499-1502; US 5821337 (см. Bruggemann M. с соавт., *J. Exp. Med.* 1987, 166: 1351-1361). В качестве альтернативы можно использовать методы нерадиоактивных анализов (см., например, анализ нерадиоактивной цитотоксичности ACT1™ для проточной цитометрии (фирма CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, Калифорния; и CytoTox 96 (зарегистрированная торговая марка) анализ нерадиоактивной цитотоксичности (фирма Promega, Мэдисон, Висконсин). Полезные эффекторные клетки для таких анализов включают моноклеарные клетки периферической крови (МКПК) и природные клетки-киллеры (NK). В другом варианте или дополнительно активность ADCC исследуемой молекулы может быть оценена *in vivo*, например, в животной модели, например, описанной Clynes с соавт., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 1998, 95:652-656. Анализы связывания C1q также можно проводить для подтверждения того, что антитело не способно связывать C1q и, следовательно, не имеет активности CDC. См., например, связывание ELISA C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента можно провести анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro с соавт., *J. Immunol. Methods* 1996, 202:163; Cragg M.S. с соавт., *Blood* 2003, 101:1045-1052; Cragg M.S., Glennie M.J., *Blood* 2004, 103: 2738-2743). Связывание FcRn и определение клиренса/периода полувыведения *in vivo* также можно проводить с использованием методов, известных в данной области (см., например, Petkova S.B. с соавт., *Int'l. Immunol.* 2006, 18(12):1759-1769).

Антитела со сниженной эффекторной функцией включают антитела с заменой одного или более остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 Fc-области (US 6737056). Такие мутанты Fc включают мутанты Fc с заменами в двух или более аминокислотных положениях из числа 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый мутант Fc «DANA» с заменой остатков 265 и 297 на аланин (US 7332581).

Описаны некоторые варианты антител с повышенным или пониженным связыванием с FcR (см., например, US 6737056; WO 2004/056312, и Shields с соавт., *J. Biol. Chem.* 2001, 9(2):6591-6604).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вариант антитела содержит Fc-область с одной или более аминокислотными заменами, которые улучшают ADCC, например, с заменами в положениях 298, 333 и/или 334 Fc-области (нумерация остатков согласно EU).

5 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения изменения происходят в Fc-области, что приводит к изменению (т. е. увеличению или уменьшению) связывания C1q и/или к комплементзависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в US 6194551, WO 99/51642, Idusogie с соавт., *J. Immunol.* 2000, 164: 4178-4184.

10 Антитела с увеличенным периодом полужизни и повышенным связыванием с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который отвечает за перенос материнских IgG к плоду (Guyer с соавт., *J. Immunol.*, 1976, 117:587; Kim с соавт., *J. Immunol.*, 1994, 24:249), описаны в US 2005/0014934 A1 (Hinton с соавт.). Эти антитела содержат Fc-область с одной или более заменами, которые увеличивают связывание Fc-области с FcRn. Такие варианты Fc включают варианты с заменами в одном или более остатках Fc-области из числа: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например, замена остатка 434 Fc-области (US 7371826).

См. также публикации Duncan и Winter, *Nature* 1988, 322:738-740; US 5648260; US 20 5624821; WO 94/29351, в которых описаны другие примеры вариантов Fc-области.

г) Варианты антител, переработанные с цистеином

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения может оказаться целесообразным переработка антител с цистеином, например, «тиоMAb», в которых один или более остатков антитела заменены остатками цистеина. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения замещенные остатки встречаются в доступных участках антитела. Путем замены этих остатков цистеином реакционноспособные тиоловые группы, таким образом, располагаются в доступных участках антитела и могут быть использованы для конъюгации антитела с другими фрагментами, такими как фрагменты лекарственного средства или фрагменты линкер-лекарственное средство, для создания иммуноконъюгата, как описано далее в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения какой-либо один или более из следующих остатков может быть заменен цистеином: V205 (нумерация по Kabat) легкой цепи; A118 (нумерация EU) тяжелой

цепи; и S400 (нумерация EU) Fc-области тяжелой цепи. Антитела, переработанные с использованием цистеина, могут быть получены согласно описанию EU 7521541.

д) Производные антител

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, может быть дополнительно модифицировано, чтобы содержать дополнительные небелковые фрагменты, которые известны в данной области и легко доступны. Фрагменты, подходящие для дериватизации антитела, включают водорастворимые полимеры, но не ограничиваются ими. Примерами таких водорастворимых полимеров являются, но не ограничиваются ими, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозы, декстрана, поливинилового спирта, поливинилпирролидона, поли-1,3-диоксолана, поли-1,3,6-триоксана, сополимера этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислот (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры) и декстран или поли(н-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры полипропиленгликоля, сополимеры полипропиленоксид/этиленоксид, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси.

Полиэтиленгликольпропионовый альдегид может иметь преимущество при производстве из-за его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, присоединенных к антителу, можно варьировать, и если присоединено более одного полимера, они могут быть одинаковыми или разными молекулами. Как правило, количество и/или тип полимеров, используемых для дериватизации, можно определить исходя из конкретных свойств или функции антитела, которые необходимо улучшить, а также из того, будет ли производное антитела использоваться в терапии согласно определенным условиям и т.д.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрены конъюгаты антитела и небелкового фрагмента, которые можно нагревать избирательно под воздействием излучения. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения небелковая часть представляет собой углеродную нанотрубку (Kam *с соавт.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102: 11600-11605). Излучение может иметь любую длину волны и включает, помимо прочего, длины волн, которые не повреждают обычные клетки, но которые нагревают небелковую часть до температуры, при которой погибают клетки, проксимальные к антитело-небелковой части.

Б. Рекомбинантные методы и составы

Антитела могут быть получены методом рекомбинации и с применением композиций, например, описанных в US 4816567. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую анти-CTLA-4 антитело, описанное в настоящем изобретении. Такая нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, включающую VL, и/или аминокислотную последовательность, включающую VH антитела (например, легкие и/или тяжелые цепи антитела). В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают один или более векторов (например, векторов экспрессии), содержащих такую нуклеиновую кислоту. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают клетку-хозяина, содержащую указанную нуклеиновую кислоту. В одном из таких вариантов осуществления настоящего изобретения клетка-хозяин содержит (например, была трансформирована): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, включающую VL антитела, и аминокислотную последовательность, включающую VH антитела, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, включающую VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, включающую VH антитела. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения клетка-хозяин является эукариотической, например, клетка яичника китайского хомяка (CHO) или лимфоидная клетка (например, клетки Y0, NS0, Sp2/0). В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения описывают способ получения анти-CTLA-4 антитела, который включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, как указано выше, в условиях, подходящих для экспрессии анти-CTLA-4 антитела, и необязательно выделение антитела из клетки-хозяина (или среды для культивирования клеток-хозяев).

Для рекомбинантного получения анти-CTLA-4 антитела нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, как описано выше, выделяют и встраивают в один или более векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такую нуклеиновую кислоту можно легко выделить и секвенировать с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

Клетки-хозяева, подходящие для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, включают описанные в настоящем изобретении прокариотические или эукариотические клетки. Например, антитела могут продуцироваться бактериями, в частности, когда гликозилирование и эффекторная функция Fc не нужны. Для экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях см., например, US 5648237, US 5789199 и US 5840523 (см. также Charlton, *Methods in Molecular Biology*, 2003, том 248, стр. 245-254, под ред. Lo В.К.С., изд-во Humana Press, Тотова, Нью-Джерси, где описывается экспрессия фрагментов антител в *E. coli*). После экспрессии антитело может быть выделено из биомассы бактериальных клеток в виде растворимой фракции и может быть дополнительно очищено.

Помимо прокариот, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, являются эукариотические микробы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были «гуманизированы», что приводит к выработке антитела с паттерном гликозилирования, который частично или полностью соответствует таковому у человека. См. Gerngross, *Nat. Biotech.* 2004, 22:1409-1414; Li с соавт., *Nat. Biotech.* 2006, 24:210-215.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного антитела также получают из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примерами могут быть клетки беспозвоночных, включая насекомых, и клетки растений. Были идентифицированы многочисленные штаммы бакуловирусов, которые можно использовать в сочетании с клетками насекомых, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Клетки растений могут быть клетками-хозяевами. См., например, US 5959177 US 6040498 US 6420548 US 7125978 и US 6417429 (описание технологии PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях).

Клетки позвоночных также могут быть использованы в качестве хозяев. Например, могут быть полезны клеточные линии млекопитающих, адаптированные для роста в виде суспензии. Другими примерами подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почки обезьяны, трансформированная вирусом SV40 (COS-7); линия почки эмбриона человека (клетки 293 или клетки 293, описанные, например, в публикации Graham с соавт., *J. Gen Virol.* 1977, 36: 59); клетки почки детеныша хомячка (ВНК); мышинные клетки Сертоли (клетки ТМ4, как описано, например, в публикации Mather, *Biol. Reprod.* 1980, 23:243-251); клетки почки обезьяны

(CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени серой крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, как описано, например, в публикации Mather с соавт., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1982, 383:44-68; клетки MRC 5; и клетки FS4. Другие пригодные линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), в том числе клетки DHFR-CHO (Urlaub с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980, 77:4216); и линии клеток миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для выработки антител, см., например, Yazaki и Wu, *Methods in Molecular Biology*, 2003, том 248, стр. 255–268, под ред. Lo B.K.C., изд., Humana Press, Totova, Нью-Джерси.

Поликлональные антитела предпочтительно получают у животных путем множественных подкожных (п/к) или внутрибрюшинных (в/б) инъекций соответствующего антигена и адъюванта. Может конъюгировать соответствующий антиген с белком, который является иммуногенным для иммунизируемых видов, например, гемоцианином лимфы улитки, сывороточным альбумином, бычьим тиреоглобулином или ингибитором трипсина сои, используя бифункциональный или дериватирующий агент, например, малеимидобензоил сульфосукцинимидный эфир (конъюгация через остатки цистеина), N-гидроксисукцинимид (через остатки лизина), глутаровый альдегид, янтарный ангидрид, SOCl_2 или $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, где R и R^1 — разные алкильные группы.

Животных (обычно млекопитающим, не являющимся человеком) иммунизируют против антигена, иммуногенных конъюгатов или производных путем объединения, например, 100 мкг или 5 мкг белка или конъюгата (для кроликов или мышей, соответственно) с 3 объемами полного адъюванта Фрейнда, и вводят раствор внутривожно в несколько мест. Через месяц животным повторно вводят от 1/5 до 1/10 исходного количества пептида или конъюгата в полном адъюванте Фрейнда путем подкожной инъекции в несколько мест. Через 7-14 дней у животных берут кровь и анализируют титр антител в сыворотке. Животным вводят бустерные инъекции до тех пор, пока титр не выйдет на плато. Предпочтительно животное ревакцинируют конъюгатом того же антигена, но конъюгированного с другим белком и/или с помощью другого сшивающего реагента. Конъюгаты также могут быть получены в культуре рекомбинантных клеток в виде белковых слияний. Кроме того, для усиления иммунного ответа применимы агрегирующие агенты, такие как квасцы.

Моноклональные антитела получают из популяции по существу гомогенных антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных природных мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, в результате изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Таким образом, модификатор «моноклональный» указывает на то, что антитело не является смесью отдельных антител.

Например, моноклональные антитела могут быть получены с использованием гибридного метода, впервые описанного Kohler с соавт., *Nature*, 1975, 256(5517):495-497. В методе гибридом мышью или другое подходящее животное-хозяин, например, хомяка, иммунизируют, как описано выше, для выявления лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые специфически связываются с белком, используемым для иммунизации. Альтернативно лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*.

Иммунизирующий агент обычно включает антигенный белок или его слитый вариант. Обычно используются либо лимфоциты периферической крови (PBL – peripheral blood lymphocytes), если предпочтительны клетки человеческого происхождения, либо клетки селезенки или клетки лимфатических узлов, если предпочтительны млекопитающие других видов. Затем лимфоциты сливают с иммортализованной клеточной линией с использованием подходящего связующего агента, такого как полиэтиленгликоль, с образованием гибридной клетки (Goding, «Monoclonal Antibodies: Principles and Practice», 1986, стр. 59-103, изд-во Academic Press).

Иммортализованные клеточные линии обычно представляют собой трансформированные клетки млекопитающих, особенно клетки миеломы грызунов, крупного рогатого скота и человека. Обычно используют клеточные линии крысиной или мышьи миеломы. Полученные таким образом гибридные клетки высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или более веществ, ингибирующих рост или выживание неслитых родительских клеток миеломы. Например, если в родительских клетках миеломы отсутствует фермент гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), культуральная среда для гибридом обычно будет включать гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), которые представляют собой вещества, предотвращающие рост клеток, дефицитных по HGPRT.

Предпочтительными иммортализованными клетками миеломы являются те клетки, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильно высокий уровень продукции антител выбранными клетками, продуцирующими антитела, и чувствительны к среде, такой как среда НАТ. Среди них предпочтительными являются линии мышинной миеломы, такие как линии, полученные из опухолей мышей МОРС-21 и МРС-11, доступные в Центре распределения клеток Института Солка, Сан-Диего, Калифорния, США, и клетки SP-2 (и их производные, например, X63-Ag8-653), доступные из Американской коллекции типовых культур, Манассас, Вирджиния, США. Клеточные линии миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека также были описаны для получения моноклональных антител человека (Kozbor с соавт., *J. Immunol.* 1984, 133(6):3001-3005; Brodeur с соавт., «Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications», 1987, стр. 51-63, изд-во Marcel Dekker, Inc., Нью-Йорк).

Культуральную среду, в которой растут клетки гибридомы, анализируют на продукцию моноклональных антител против антигена. Предпочтительно специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, определяют с помощью иммунопреципитации или анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммуноанализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Такие методики и анализы известны в данной области. Например, аффинность связывания можно определить с помощью анализа Скэтчарда (Munson, *Anal. Biochem.* 1980, 107(1): 220-239).

После идентификации гибридомных клеток, которые продуцируют антитела с требуемой специфичностью, аффинностью и/или активностью, клоны могут быть субклонированы с помощью процедур лимитирующих разведений, и выращены стандартными способами (публикация Goding, см. выше). Подходящие для этой цели питательные среды включают, например, среду D-МЕМ или RPMI-1640. Кроме того, клетки гибридомы можно выращивать *in vivo* в виде опухолей у млекопитающих.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, соответствующим образом выделяют из культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки с помощью обычных процедур очистки иммуноглобулина, таких как, например, протеин А-сефароза, хроматография на гидроксипатите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

Антитела могут быть получены путем иммунизации соответствующего животного-хозяина против антигена. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антиген представляет собой полипептид, содержащий полноразмерный

антиген CTLA-4. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антиген представляет собой полипептид, содержащий растворимый CTLA-4. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антиген представляет собой полипептид, содержащий область, соответствующую аминокислотам в положении от 97 (Glu) до положения 106 (Leu) CTLA-4 человека (внеклеточный домен, SEQ ID NO: 28). В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антиген является полипептидом, содержащим область, соответствующую аминокислотам в положении от 99 (Met) до положения 106 (Leu) CTLA-4 человека (внеклеточный домен, SEQ ID NO: 28). Также в настоящее изобретение включены антитела, полученные путем иммунизации животного против антигена. Антитела могут включать любые признаки, по отдельности или в комбинации, как описано выше в разделе «Примеры анти-CTLA-4 антител».

В. Исследования

Предусмотренные в настоящем изобретении анти-CTLA-4-антитела могут быть идентифицированы, подвергнуты скринингу или охарактеризованы в отношении их физических/химических свойств и/или биологической активности с помощью различных исследований, известных в данной области.

1. Связывание и другие исследования

В другом объекте настоящего изобретения антитело проверяют на антигенсвязывающую активность, например, с помощью известных методов, таких как ELISA, вестерн-блоттинг, метод поверхностного плазмонного резонанса и т.д.

В другом объекте настоящего изобретения конкурентные исследования можно использовать для идентификации антитела, которое конкурирует с анти-CTLA-4 антителами, описанными в настоящем изобретении (например, анти-CTLA-4 антителами, описанными в табл. 4, табл. 9, табл. 14 и табл. 19) за связывание с CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, если такое конкурирующее антитело присутствует в избытке, связывание эталонного антитела с CTLA-4 предотвращается (например, уменьшается) по меньшей мере на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50 %, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или выше. В некоторых примерах связывание предотвращено по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или выше. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения такое конкурирующее антитело связывается с тем же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), который связывается анти-CTLA-4 антителами, описанными в настоящем изобретении (например, анти-CTLA-4 антителами,

описанными в табл. 4, табл. 9, табл. 14 и табл. 19). Подробные стандартные методы картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлены в публикации Morris «Epitope Mapping Protocols» в кн.: «*Methods in Molecular Biology*» том 66, изд. Humana Press, Тотова, Нью-Джерси.

5 В примере конкурентного анализа иммобилизованный CTLA-4 инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается с CTLA-4, и второе немеченое антитело, которое тестируют на его способность конкурировать с первым антителом за связывание с CTLA-4. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный CTLA-4
10 инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не второе немеченое антитело. После инкубации в условиях, допускающих связывание первого антитела с CTLA-4, удаляют избыток несвязавшегося антитела и измеряют количество метки, связанной с иммобилизованным CTLA-4. Если количество метки, связанной с иммобилизованным CTLA-4, существенно снижено в тестируемом образце по
15 сравнению с контрольным образцом, то это указывает на то, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с CTLA-4. См. «Antibodies: A Laboratory Manual», 1988, глава 14, под ред. E. Harlow и D. Lane, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Нью-Йорк.

2. Исследование активности

20 В одном объекте настоящего изобретения предусматривают анализы для идентификации анти-CTLA-4 антител, обладающих биологической активностью. Биологическая активность может включать, например, активность ингибирующую пролиферацию клеток, цитотоксическую активность (например, активность ADCC/CDC и активность ADCP), иммуностимулирующую активность и
25 ингибирующую активность CTLA-4. Также предусматривают антитела, обладающие такой биологической активностью *in vivo* и/или *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению тестируют на такую биологическую активность.

30 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению тестируют на его способность ингибировать рост или пролиферацию клеток *in vitro*. Анализы ингибирования роста или пролиферации клеток хорошо известны в данной области. Определенные анализы клеточной пролиферации, например описанные в настоящем изобретении анализы «уничтожения клеток», измеряют жизнеспособность клеток. Одним из таких анализов является

люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo™, который коммерчески доступен от фирмы Promega (Мэдисон, Висконсин). Этот анализ определяет количество жизнеспособных клеток в культуре на основе количественного определения присутствующего АТФ, что является признаком метаболически активных

5 клеток. См. Stouch с соавт. *J. Immunol. Meth.* 1993, 160:81-88, US 6602677.

Исследование может быть выполнено в 96- или 384-луночном формате, что делает его пригодным для автоматизированного высокопроизводительного скрининга. См. Cree с соавт. *AntiCancer Drugs*, 1995, 6:398-404. Процедура анализа включает добавление единственного реагента (реагент CellTiter-Glo (зарегистрированная торговая марка))

10 непосредственно к культивируемым клеткам. Это приводит к лизису клеток и генерации люминесцентного сигнала, вызванного люциферазной реакцией.

Люминесцентный сигнал пропорционален количеству присутствующей АТФ, которое прямо пропорционально количеству жизнеспособных клеток, присутствующих в культуре. Данные могут быть зарегистрированы с помощью люминометра или

15 устройства формирования изображения камеры ССD. Выход люминесценции выражается в относительных световых единицах (RLU – relative light units).

Другим тестом на пролиферацию клеток является анализ «МТТ» – колориметрический анализ, который измеряет окисление бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия до формазана под действием

20 митохондриальной редуктазы. См., например, Mosmann, *J. Immunol. Meth.*, 1983, 65:55-63; Zhang с соавт., *Cancer Res.* 2005, 65:3877-3882.

Клетки для применения в любом из вышеперечисленных анализов *in vitro* включают клетки или клеточные линии, которые естественным образом экспрессируют CTLA-4 или которые были сконструированы для экспрессии CTLA-4. Такие клетки

25 также включают клеточные линии, которые экспрессируют CTLA-4, и клеточные линии, которые в норме не экспрессируют CTLA-4, но трансфицированы нуклеиновой кислотой, кодирующей CTLA-4.

В одном объекте настоящего изобретения описанное анти-CTLA-4 антитело тестируют на способность ингибировать рост или пролиферацию клеток *in vivo*. В

30 некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитело тестируют на способность ингибировать рост опухоли *in vivo*. В таком тестировании могут быть применены модельные системы *in vivo*, например модели ксенотрансплантата. В иллюстративной системе ксенотрансплантата опухолевые клетки человека вводят подходящему животному с ослабленным иммунитетом,

отличному от человека, например бестимусной «голой» мыши. Антитело по настоящему изобретению вводят животному. Измеряют способность антитела ингибировать или уменьшать рост опухоли. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, касающихся выше указанной системы ксенотрансплантата, опухолевые клетки человека представляют собой опухолевые клетки от пациента-человека. Такие модели ксенотрансплантатов коммерчески доступны от фирмы Oncotest GmbH (Фриберг, Германия). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения опухолевые клетки человека вводят животному с подходящим иммунодефицитом, но не человеку, путем подкожной инъекции или путем трансплантации в подходящее место, такое как жировая ткань молочной железы.

Очевидно, что любое из вышеперечисленных исследований можно проводить с использованием иммуноконъюгата по настоящему изобретению в место или в дополнение к анти-CTLA-4 антителу.

Типичный анализ для измерения активности ADCC терапевтического антитела основан на анализе высвобождения ^{51}Cr и включает следующие этапы: мечение клеток-мишеней [^{51}Cr]Na₂CrO₄; опсонизацию клеток-мишеней, экспрессирующих антиген на клеточной поверхности, антителом; объединение опсонизированных меченных радиоактивным изотопом клеток-мишеней с эффекторными клетками в подходящем соотношении в микротитрационном планшете в присутствии или в отсутствие тестируемого антитела; инкубация смеси клеток предпочтительно в течение от 16 до 18 часов, предпочтительно при 37°C сбор супернатанта; и анализ радиоактивности в образце супернатанта. Затем определяют цитотоксичность тестируемого антитела, например, по следующему уравнению: степень удельной цитотоксичности (%) = (радиоактивность в присутствии антитела – радиоактивность в отсутствие антитела) / (максимальная радиоактивность – радиоактивность в отсутствие антитела) × 100. График можно построить, изменив соотношение клеток-мишеней и эффекторных клеток или концентрацию антител.

Для оценки активации комплемента можно провести анализ комплементзависимой цитотоксичности (CDC), как описано, например, в Gazzano-Santoro с соавт., *J. Immunol. Methods*, 1996, 202:163. Вкратце, различные концентрации варианта полипептида и комплемента человека разводят буфером. Клетки, экспрессирующие антиген, с которым связывается вариант полипептида, разводят до плотности приблизительно 1×10^6 клеток/мл. Смесь варианта полипептида, разбавленного комплемента человека и антигенэкспрессирующих клеток добавляют в

плоскодонный 96-луночный планшет для тканевых культур и инкубируют при 37°C и в атмосфере 5% CO₂ в течение 2 ч для стимулирования опосредованного комплементом клеточного лизиса. Затем в каждую лунку добавляют по 50 мкл красителя Alamar Blue (фирма Accumed International) и инкубируют при 37°C в течение ночи. Поглощение измеряют с использованием 96-луночного флуориметра с возбуждением при 530 нм и испусканием при 590 нм. Результаты представлены в относительных единицах флуоресценции (RFU – relative fluorescence units). Концентрации образца можно рассчитать по стандартной кривой, и процент активности по сравнению с невариантным полипептидом указывается для представляющего интерес варианта полипептида.

Один из способов анализа активности ADCP может включать следующее: покрытие биочастиц-мишеней, таких как *E. coli*, меченных FITC (фирма Molecular Probes), или *Staphylococcus aureus*-FITC, тестируемым антителом; формирование опсонизированных частиц; добавление вышеуказанных опсонизированных частиц к эффекторным клеткам ТНР-1 (моноцитарная клеточная линия, доступная в АТСС) в соотношении 1:1, 10:1, 30:1, 60:1, 75:1 или 100:1 для индукции FcγR-опосредованного фагоцитозу; предпочтительно инкубировать клетки и *E. coli*-FITC/антитело при 37° в течение 1,5 ч; после инкубации добавление к клеткам красителя трипанового синего (желательно при комнатной температуре в течение двух-трех минут) для гашения флуоресценции бактерий, не внедрившихся в клетки и прикрепившихся к внешней поверхности клеток; перенос клеток в буфер FACS (например, 0,1% БСА и 0,1% азида натрия в PBS) для анализа флуоресценции клеток ТНР-1 с использованием FACS (например, BD FACS Calibur). Чтобы оценить степень ADCP, гейт предпочтительно устанавливают на клетках ТНР-1 и измеряют среднюю интенсивность флуоресценции. В наиболее предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения анализ ADCP проводят с использованием *E. coli*-FITC в среде (контроль); клетки *E. coli*-FITC и ТНР-1 (используют как FcγR-независимую активность ADCP); и *E. coli*-FITC, клетки ТНР-1 и тестируемое антитело (используемое как FcγR-зависимая активность ADCP).

Цитотоксическая активность антитела обычно включает связывание антитела с клеточной поверхностью. Экспрессия антигена на поверхности клетки-мишени может быть надлежащим образом подтверждена способами, известными специалистам в данной области, такими как FACS.

Активацию иммунитета можно обнаружить, используя в качестве индикаторов клеточный или гуморальный иммунный ответ. Активация иммунитета включает, в частности, повышение уровня экспрессии цитокинов (например, IL-6, G-CSF, IL-12, TNF α и IFN γ) или их рецепторов, стимулирование пролиферации иммунных клеток (например, В-клеток, Т-клеток, клеток НК, макрофагов и моноцитов), повышенное состояние активации, повышенные функции и повышенная цитотоксическая активность. В частности, активацию Т-клеток можно обнаружить путем измерения повышенной экспрессии маркеров активации, таких как CD25, CD69 и ICOS. Например, известно, что у пациентов, которым вводят анти-CTLA-4 антитело, ипилимумаб, после введения наблюдают повышение ICOS⁺ CD4⁺ Т-клеток в периферической крови, и это рассматривают в качестве эффекта активации системного иммунного статуса введением анти-CTLA-4 антитела (*Cancer Immunol. Res.*, 2013, 1(4): 229-234).

Для активации Т-клеток требуется не только стимуляция через антигенный рецептор (TCR), но и вспомогательная стимуляция через CD28. Когда CD28 на поверхности Т-клетки связывается с B7-1 (CD80) или B7-2 (CD86) на поверхности антигенпрезентирующей клетки, вспомогательный сигнал передается на Т-клетку, и затем Т-клетка активируется. С другой стороны, CTLA-4 экспрессируется на поверхности активированных Т-клеток. Поскольку CTLA-4 связывается с CD80 и CD86 с большей аффинностью, чем с CD28, он взаимодействует с CD80 и CD86 в большей степени, чем с CD28, что приводит к подавлению активации Т-клеток.

Основываясь на таком механизме действия, ингибирующую активность в отношении CTLA-4 можно измерить как активность ингибирования связывания CTLA-4 с CD80 или CD86. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анализ измерения ингибирующей активности в отношении CTLA-4 включает следующие этапы: обеспечение возможности связывания очищенного белка CTLA-4 с подложкой, такой как планшет для микротитрования или магнитные гранулы; добавление тестируемого антитела и меченого растворимого CD80 или CD86; вымывание несвязавшихся компонентов; и количественное определение связанного меченого CD80 или CD86. Реагирует ли тестируемое антитело перекрестно с CD28 или нет, можно подтвердить, выполнив аналогичный анализ, в котором вместо CTLA-4 используется CD28. Более того, в другом варианте осуществления настоящего изобретения функциональный анализ, который выявляет активацию Т-клеток, как описано выше, также можно использовать для измерения ингибирующей активности в

отношении CTLA-4. Например, когда тестируемое антитело, обладающее ингибирующей активностью в отношении CTLA-4, добавляется в систему, в которой активация Т-клеток измеряется путем стимуляции популяции Т-клеток клетками, экспрессирующими CD80 или CD86, активация Т-клеток дополнительно усиливается.

5 Г. Иммуноконъюгаты

В настоящем изобретении также предлагаются иммуноконъюгаты, включающие анти-CTLA-4 антитело, конъюгированное в настоящем документе с одним или более цитотоксическими агентами, такими как химиотерапевтические агенты или лекарственные средства, ингибирующие рост агенты, токсины (например, белковые
10 токсины, ферментативно активные токсины бактерий, грибов, растений, или животного происхождения, или их фрагменты) или радиоактивные изотопы.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения иммуноконъюгат представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC – antibody-drug conjugate), в котором антитело конъюгировано с одним или несколькими
15 лекарственными средствами, включая, помимо прочего, майтансиноид (см. патенты US 5208020, US5416064 и европейский патент EP 0425235 B1); ауристатин, такой как молекулы монометилауристатина DE и DF (MMAE и MMAF) (см. US 5635483, US 5780588 и US 7498298); доластатин; калихеамицин или его производное (см. патенты US 5712374, US 5714586, US 5739116, US 5767285, US 5770701, US 5770710,
20 US 5773001 и US 5877296; Hinman с соавт., *Cancer Res.* 1993, 53: 3336-3342; Lode с соавт., *Cancer Res.* 1998, 58: 2925-2928); антрациклин, такой как дауномицин или доксорубин (см. Kratz с соавт., *Current Med. Chem.* 2006, 13: 477-523; Jeffrey с соавт., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 2006, 16: 358-362; Torgov с соавт., *Bioconj. Chem.* 2005, 16: 717-721; Nagy с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97: 829-834; Dubowchik с
25 соавт., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 2002, 12: 1529-1532; King с соавт., *J. Med. Chem.* 2002, 45:4336-4343; US 6630579); метотрексат; виндезин; таксан, такой как доцетаксел, паклитаксел, ларотаксел, тезетаксел и ортатаксел, трихотецен; и CC1065.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения иммуноконъюгат содержит антитело, как описано в настоящем изобретении, конъюгированное с
30 ферментативно активным токсином или его фрагментом, включая, помимо прочего, цепь А дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, куриц,

каротин, ингибитор *Saponaria officinalis*, Галанин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения иммуноконъюгат содержит описанное в настоящем изобретении антитело, конъюгированное с радиоактивным атомом с образованием радиоконъюгата. Для производства радиоконъюгатов доступны различные радиоактивные изотопы. Примеры включают ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb и радиоактивные изотопы Lu. Когда радиоконъюгат используют для обнаружения, он может содержать радиоактивный атом для сцинтиграфических исследований, например, Tc-99m или ^{123}I или спиновую метку для визуализации методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также известным как магнитно-резонансная томография, МРТ), такой как йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Конъюгаты антитела и цитотоксического агента могут быть получены с использованием различных бифункциональных связывающих белков агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат) и биактивные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2, 4-динитробензол). Например, рициновый иммунотоксин можно получить, как описано в Vitetta с соавт., *Science* 1987, 238:1098. Меченая углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является типичным хелатирующим агентом для конъюгации радионуклида с антителом. См. WO 94/11026. Линкер может быть «расщепляемым линкером», облегчающим высвобождение цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, можно использовать кислотолабильный линкер, пептидазочувствительный линкер, фотолабильный линкер, диметиллинкер или дисульфид-содержащий линкер (Chari с соавт., *Cancer Res.* 1992, 52: 127-131; US 5208020).

Иммуноконъюгаты или ADC в настоящем изобретении предусматривают, но не ограничиваются ими, такие конъюгаты, полученные с использованием сшивающих

реагентов, включая, наряду с другими, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB, а также SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), которые являются коммерчески
5 доступными (например, от фирмы Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Иллинойс, США).

Д. Способы и композиции для диагностики и изыскания

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения любое из представленных в настоящем изобретении анти-CTLA-4 антител применимо для
10 обнаружения присутствия CTLA-4 в биологическом образце. Используемый в настоящем изобретении термин «изыскание» включает количественное или качественное обнаружение. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения биологический образец включает клетку или ткань, такую как сыворотка, цельная кровь, плазма, образец биопсии, образец ткани, клеточная суспензия, слюна,
15 мокрота, ротовая жидкость, мозговая жидкость, амниотическая жидкость, асцитическая жидкость, молоко, молозиво, секрет молочной железы, лимфа жидкость, моча, пот, слезная жидкость, желудочный сок, синовиальная жидкость, асцитическая жидкость, глазная жидкость и слизь.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CTLA-4 антитело для использования в методе диагностики или изыскания. В еще
20 одном объекте настоящего изобретения предложен способ обнаружения присутствия CTLA-4 в биологическом образце. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения способ включает приведение биологического образца в контакт с анти-CTLA-4 антителом как описано в настоящем документе, в условиях,
25 допускающих связывание анти-CTLA-4 антитела с CTLA-4, и определение того, образуется ли комплекс между анти-CTLA-4 антителом и CTLA-4. Такой способ может выполняться *in vitro* или *in vivo*. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитело используют для отбора субъектов, подходящих для терапии анти-CTLA-4 антителом, например, где CTLA-4 является биомаркером для
30 отбора пациентов.

Антитело по настоящему изобретению можно использовать, например, для проверки состояния иммунного ответа и диагностики дисфункции иммунной системы.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают меченые анти-CTLA-4 антитела. Метки включают, но не

ограничиваются ими, метки или фрагменты, которые обнаруживаются непосредственно (например, флуоресцентные, хромофорные, электронно-плотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), а также фрагменты, такие как ферменты или лиганды, которые обнаруживаются косвенно, например, посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия. Примеры меток включают, но не ограничиваются ими, радиоизотопы ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H и ^{131}I , флуорофоры, такие как хелаты редкоземельных элементов или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон, люциферазы, например, люцифераза светлячка и бактериальная люцифераза (US 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофталазиндионы, пероксидаза хрена (HRP), щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, глюкоамилаза, лизоцим, сахаридоксидазы, например, глюкозооксидаза, галактозооксидаза и глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа, гетероциклические оксидазы, такие как уриказа и ксантинооксидаза, соединенные с ферментом, который использует перекись водорода для окисления предшественника красителя, такого как HRP, лактопероксидаза или микропероксидаза, биотин/авидин, спиновые метки, бактериофаговые метки, стабильные свободные радикалы и другие.

Е. Фармацевтические составы

Фармацевтические составы анти-CTLA-4 антитела, как описано в настоящем изобретении, готовят путем смешивания такого антитела, имеющего желаемую степень чистоты, с одним или более необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences, 1980, 16-е издание, под ред. Osol A.) в виде лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители обычно нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают, но не ограничиваются ими: буферы, такие как фосфатный, цитратный и других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как

ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, Zn-белковые комплексы); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Примеры фармацевтически приемлемых носителей в настоящем изобретении дополнительно включают интерстициальные агенты для диспергирования лекарственных средств, такие как растворимые нейтрально-активные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20 человека, такие как rHuPH20 (HYLENEX (зарегистрированная торговая марка), Baxter International, Inc.). Некоторые показательные sHASEGP и способы применения, включая rHuPH20, описаны в патентных публикациях US 2005/0260186 и US 2006/0104968. В одном из объектов настоящего изобретения sHASEGP сочетается с одной или несколькими гликозаминогликаназами, такими как хондроитиназы.

Примеры лиофилизированных составов антител описаны в патенте US 6267958. Водные составы антител включают составы, описанные в патенте US 6171586 и WO 2006/044908, последние составы включают гистидин-ацетатный буфер.

Состав по настоящему изобретению может также содержать более одного активного ингредиента, если это необходимо для конкретного показания, подлежащего лечению, предпочтительно с дополнительными активностями, которые не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. Такие активные ингредиенты подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для намеченной цели.

Активные ингредиенты могут быть заключены в микрокапсулы, приготовленные, например, методами коацервации или межфазной полимеризации, например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы, желатина или поли(метилметакрилата), соответственно, для систем доставки коллоидных лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или макроэмульсий. Такие методы описаны в кн.: «Remington's Pharmaceutical Sciences», 1980, 16е изд., под ред Osol A.

Могут быть приготовлены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, причем матрицы представлены в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул.

Составы, используемые для введения *in vivo*, обычно стерильны. Стерильность может быть легко достигнута, например, путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

Ж. Терапевтические способы и композиции

5 Любое из анти-CTLA-4 антител, предусмотренных в настоящем изобретении, может применяться в терапевтических способах.

В одном из объектов настоящего изобретения предусматривают анти-CTLA-4 антител для применения в качестве лекарственного средства. В других объектах предусматривают анти-CTLA-4 антитело для применения в лечении опухолей. В
10 определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CTLA-4 антитело для применения в способе лечения опухолей. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CTLA-4 антитело для применения в способе лечения индивида с опухолью, включающем
15 введение индивиду эффективного количества анти-CTLA-4 антитела. В одном подобном варианте осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает введение индивиду эффективного количества, по меньшей мере, одного
20 дополнительного терапевтического агента, например, согласно описанному выше. В других вариантах осуществления настоящего изобретения относится к анти-CTLA-4 антителу, применяемому для повреждения клеток. В определенных вариантах
25 осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CTLA-4 антитело для применения в способе повреждения клеток у индивидуума, включающем введение индивидууму эффективного количества анти-CTLA-4 антитела для повреждения клеток. В других вариантах осуществления предусматривают анти-CTLA-4 антитело, применяемое для активизации иммунитета. В определенных вариантах осуществления
30 настоящего изобретения предусматривают анти-CTLA-4 антитело, применяемое в способе активизации иммунитета у индивида, включающий введение индивиду эффективного количества анти-CTLA-4 антитела для активизации иммунитета. «Индивидом» в любом из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения преимущественно является человек.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения опухолью является солидная опухоль. В солидной опухоли опухолевые клетки обычно пролиферируют, образуя популяцию, и опухолевая ткань образована в основном этими
клетками. Кроме того, опухолевые ткани живых организмов часто инфильтрированы
иммунными клетками, такими как лимфоциты, которые также составляют часть

опухолевых тканей. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения опухолевые ткани инфильтруются иммунными клетками, особенно регуляторными Т-клетками (Treg). В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения повреждение клеток вызывается активностью ADCC, активностью CDC или активностью ADCP. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения клетки, экспрессирующие CTLA-4 на своей клеточной поверхности, повреждаются. В другом варианте осуществления настоящего изобретения клетки, подлежащие повреждению, представляют собой клетки Treg. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения клетки Treg, проникшие в ткани опухоли, повреждаются. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения иммунитет активируется повреждением клеток Treg (отменяется иммуносупрессия клетками Treg). В других вариантах осуществления настоящего изобретения активируется иммунитет (в частности, противоопухолевый иммунитет) в опухолевых тканях. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения активация иммунитета является активацией Т-клеток.

В других объектах осуществления настоящего изобретения степень воздействия лекарственного средства, производимого анти-CTLA-4 антителом по настоящему изобретению, варьирует в зависимости от ткани человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения степень лекарственного воздействия изменяется в зависимости от концентрации аденозин-содержащего соединения в ткани. В других вариантах осуществления настоящего изобретения эффект усиливается в ткани с высокой концентрацией аденозин-содержащего соединения по сравнению с тканью с низкой концентрацией аденозин-содержащего соединения. К тканям с высокой концентрацией аденозин-содержащего соединения относятся, например, опухолевые ткани. Ткани с низкой концентрацией аденозин-содержащего соединения включают, например, неопухолевые ткани, такие как здоровые ткани. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения иммунитет сильнее активируется в опухолевой ткани, чем в неопухолевой. Такие различия в ответе необязательно должны наблюдаться для всех доз анти-CTLA-4 антител, а должны наблюдаться только для определенного диапазона доз. В другом варианте осуществления настоящего изобретения иммунитет активируется при более низкой дозе в опухолевой ткани, чем в неопухолевой ткани. Более того, в другом варианте осуществления настоящего изобретения терапевтический эффект наблюдается при более низкой дозе, чем та, при которой наблюдается побочный эффект. В определенных вариантах осуществления

настоящего изобретения терапевтический эффект заключается в проявлении противоопухолевого эффекта (например, регрессия опухоли и индукция клеточной гибели или торможение роста опухолевых клеток), а побочный эффект заключается в развитии аутоиммунного заболевания (включая повреждение здоровых тканей вследствие избыточных иммунных ответов).

В другом объекте осуществления настоящего изобретения степень лекарственного эффекта, вырабатываемого анти-CTLA-4 антителом по настоящему изобретению, варьирует в зависимости от того, обладает ли оно активностью по связыванию с CTLA-4, которая зависит от аденозин-содержащего соединения (т.е. изменяется ли в соответствии с концентрации аденозин-содержащего соединения). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению представляют собой антитела, связывающая активность с CTLA-4 у которых увеличивается по мере увеличения концентрации аденозин-содержащего соединения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения контрольным анти-CTLA-4 антителом является антитело, которое не обладает активностью по связыванию CTLA-4, зависящей от концентрации аденозин-содержащего соединения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело, которое не обладает CTLA-4-связывающей активностью, зависящей от концентрации аденозинсодержащего соединения, означает антитело, в котором разница в CTLA-4-связывающей активности в присутствии и в отсутствие соединения отличается, например, менее чем в два раза, менее чем в 1,8 раза, менее чем в 1,5 раза, менее чем в 1,3 раза, менее чем в 1,2 раза или менее чем в 1,1 раза. Желательно, чтобы анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению и контрольное анти-CTLA-4 антитело имели CTLA-4-связывающую активность, по существу, равную, в присутствии достаточного количества аденозин-содержащего соединения.

В некоторых объектах настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению и контрольное анти-CTLA-4 антитело как лекарственные средства различаются по оказываемому действию. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения они отличаются по действию как лекарственные средства в ткани с низкой концентрацией аденозин-содержащего соединения. Ткани с низкой концентрацией аденозин-содержащего соединения включают, например, неопухолевые ткани, то есть нормальные ткани. Анти-CTLA-4 антитела также могут быть предусмотрены в виде фармацевтического состава, содержащего антитело. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения

в ткани с низкой концентрацией аденозин-содержащего соединения анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению проявляет низкий уровень активации иммунитета по сравнению с контрольным анти-CTLA-4 антителом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в ткани с низкой концентрацией аденозин-содержащего соединения дозы анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению, необходимые для активации иммунитета, являются высокими по сравнению с дозами контрольного анти-CTLA-4 антитела. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в ткани с низкой концентрацией аденозин-содержащего соединения анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению проявляет на низком уровне побочные эффекты по сравнению с контрольным антителом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в ткани с низкой концентрацией аденозин-содержащего соединения дозы анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению, при которых наблюдается побочный эффект, являются высокими по сравнению с дозами контрольного анти-CTLA-4 антитела. Такие различия в реакции не обязательно должны наблюдаться во всех тканях (например, во всех тканях с низкой концентрацией аденозин-содержащего соединения), но должны наблюдаться только в некоторых тканях. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения побочным эффектом является аутоиммунное заболевание (включая повреждение нормальных тканей из-за чрезмерного иммунного ответа).

В некоторых объектах настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению и контрольное анти-CTLA-4 антитело как лекарственные средства по существу оказывают равное действие. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения они проявляют по существу равное действие как лекарственные средства в ткани с высокой концентрацией аденозин-содержащего соединения. К тканям с высокой концентрацией аденозин-содержащего соединения относятся, например, опухолевые ткани. Анти-CTLA-4 антитела также могут быть предусмотрены в виде фармацевтических составов, содержащих антитело. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в ткани с высокой концентрацией аденозин-содержащего соединения анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению и контрольное анти-CTLA-4 антитело проявляют по существу равный уровень активации иммунитета. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в ткани с высокой концентрацией аденозин-содержащего соединения анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению и контрольное анти-CTLA-4 антитело проявляют равный уровень активации иммунитета по существу в одинаковой

дозе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в ткани с высокой концентрацией аденозин-содержащего соединения анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению и контрольное анти-CTLA-4 антитело по существу проявляют одинаковый уровень терапевтического эффекта. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в ткани с высокой концентрацией аденозин-содержащего соединения анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению и контрольное анти-CTLA-4 антитело проявляют одинаковый уровень терапевтического эффекта по существу в одинаковой дозе. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения терапевтический эффект представляет проявление противоопухолевого эффекта (например, регрессию опухоли и индукцию гибели клеток или ингибирование роста опухолевых клеток).

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения опухоль выбирают из группы, состоящей из рака молочной железы и рака печени.

В еще одном объекте настоящего изобретения предусматривают применение анти-CTLA-4 антитело в производстве или приготовлении лекарственного средства. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения лекарственное средство предназначено для лечения опухолей. В другом варианте осуществления настоящего изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения опухоли, включающем введение индивидууму, имеющему опухоль, эффективного количества лекарственного средства. В одном из подобных вариантов осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, например, описанного ниже. В другом варианте осуществления настоящего изобретения лекарственное средство предназначено для разрушения клеток. В другом варианте осуществления настоящего изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе разрушения клеток у индивиду, включающий введение индивиду эффективного количества лекарственного средства для разрушения клеток. В другом варианте осуществления настоящего изобретения лекарственное средство предназначено для активирования иммунитета. В другом варианте осуществления настоящего изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе активирования иммунитета у индивида, включающем введение индивиду эффективного количества лекарственного средства для активирования иммунитета. «Индивидом» в любом из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения может быть человек.

В еще одном объекте настоящего изобретения предусматривают способ лечения рака. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ включает введение индивиду с такой опухолью эффективного количества анти-CTLA-4 антитела. В одном из подобных вариантов осуществления настоящего изобретения способ
5 дополнительно включает введение индивиду эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, как описано ниже. «Индивидом» в соответствии с любым из вышеприведенных вариантов осуществления может быть человек.

В еще одном объекте настоящее изобретение предусматривает способ
10 повреждения клеток у индивида. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ включает введение индивиду эффективного количества анти-CTLA-4 антитела для повреждения клеток. В другом объекте настоящего изобретения предусматривают способ активации иммунитета у индивида. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ включает введение индивиду
15 эффективного количества анти-CTLA-4 антитела для активации иммунитета. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения понятие «индивид» означает человека.

В еще одном объекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтические составы, включающие любое из предусмотренных в настоящем изобретении анти-
20 CTLA-4 антител, например, для использования в любом из вышеперечисленных терапевтических способов. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения фармацевтический состав включает любое из предусмотренных в настоящем изобретении анти-CTLA-4 антител и фармацевтически приемлемый носитель. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения
25 предусматривают фармацевтический состав для применения в лечении опухолей. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают фармацевтический состав для применения в разрушении клеток. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение предусматривает фармацевтический состав для применения при стимулировании иммунитета. В другом варианте осуществления
30 настоящего изобретения фармацевтический состав содержит любое из предусмотренных в настоящем изобретении анти-CTLA-4 антител и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, как описано ниже.

В другом объекте настоящее изобретение предусматривает способы получения лекарственного средства или фармацевтического состава (например, для использования

в любом из вышеупомянутых терапевтических способов), включающие перемешивание любого из анти-CTLA-4 антител, предусмотренных в настоящем изобретении, с фармацевтически приемлемом носителем. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ получения лекарственного средства или фармацевтического состава дополнительно включает добавление по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента к лекарственному средству или фармацевтическому составу.

Антитела по настоящему изобретению можно использовать в терапии либо отдельно, либо в комбинации с другими агентами. Например, антитело по настоящему изобретению можно вводить совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительным терапевтическим агентом является ингибитор контрольной точки иммунного ответа, ингибитор EGFR, ингибитор HER2 или химиотерапевтический агент. Ингибитором иммунной контрольной точки может быть, например, ингибитор анти-CTLA-4, ингибитор анти-PD-1, ингибитор анти-PD-L1, ингибитор анти-PD-L2, ингибитор анти-TIM-3, ингибитор анти-LAG-3, анти-TIGIT ингибитор, анти-BTLA ингибитор и анти-VISTA ингибитор. Ингибитор анти-CTLA-4 может включать, например, ипилимумаб и тремелимумаб. Ингибитором анти-PD-1 могут быть, например, ниволумаб и пембролизумаб. Ингибитором анти-PD-L1 могут быть, например, атезолизумаб, дурвалумаб и авелумаб. Анти-PD-L2 ингибитором может быть, например, анти-PD-L2 ингибирующее антитело. Ингибитором анти-TIM-3 может быть, например, анти-TIM-3 ингибирующее антитело. Анти-LAG-3 ингибитором может быть, например, анти-LAG-3 ингибирующее антитело. Ингибитором анти-TIGIT может быть, например, анти-TIGIT ингибирующее антитело. Анти-BTLA ингибитором может быть, например, ингибирующее антитело анти-BTLA. Анти-VISTA ингибитором может быть, например, ингибирующее анти-VISTA антитело. К ингибиторам EGFR могут относиться, например, цетуксимаб, панитумумаб, нимотузумаб, нецитумумаб и залутумумаб. К ингибиторам HER2 могут относиться, например, трастузумаб, трастузумаб эмтансин и пертузумаб.

Такие комбинированные терапии, упомянутые выше, охватывают комбинированные введения (где два или более терапевтических агента включены в один и тот же или в отдельные составы) и отдельное введение, при котором введение антитела по настоящему изобретению могут быть введены до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента или агентов. В одном из

вариантов осуществления настоящего изобретения введение анти-CTLA-4 антитела и введение дополнительного терапевтического агента происходят в течение примерно одного месяца, или в течение примерно одной, двух или трех недель, или в течение 5
каждых примерно одного, двух, трех, четырех, пяти или шести дней. Антитела по настоящему изобретению можно также использовать в сочетании с лучевой терапией.

Антитела по настоящему изобретению (и любой дополнительный терапевтический агент) могут вводиться любым подходящим способом, включая парентеральное, внутрилегочное и интраназальное введение, и, при необходимости для 10
местного лечения, внутриочаговое введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Дозирование может осуществляться любым подходящим путем, например, инъекциями, такими как внутривенные или подкожные инъекции, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или постоянным. В 15
настоящем изобретении рассматриваются различные схемы дозирования, включая, но не ограничиваясь ими, однократное или многократное введение в различные моменты времени, болюсное введение и импульсные инфузии.

Антитела по настоящему изобретению должны быть составлены, дозированы и введены в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, которые 20
следует учитывать в этом контексте, включают конкретное подвергаемое лечению заболевание, конкретное подвергаемое лечению млекопитающее, клиническое состояние конкретного пациента, причину расстройства, место доставки агента, способ введения, график введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Антитело необязательно должно быть включено в состав одного или более агентов, 25
используемых в настоящее время для профилактики или лечения рассматриваемого расстройства. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антител, присутствующих в составе, типа нарушения или лечения и других факторов, рассмотренных выше. Они обычно используются в тех же дозировках и теми же 30
путями введения, которые описаны в настоящем описании, или примерно от 1 до 99% доз, описанных в настоящем описании, или в любой дозировке и любым путем, которые эмпирически/клинически определены как подходящие.

Для профилактики или лечения заболевания подходящая доза антитела по настоящему изобретению (при использовании отдельно или в сочетании с одним или несколькими или другими дополнительными терапевтическими агентами) будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа антитела, тяжести и течения

заболевания, от того, вводится ли антитело в профилактических или терапевтических целях, предшествующая терапия, история болезни пациента и реакция на антитело, а также с учетом мнения и принятым решением лечащего врача. Антитело подходящим образом вводят пациенту за один раз или в течение серии обработок. В зависимости от 5 типа и тяжести заболевания примерно от 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг) антитела могут быть первоначальной рекомендуемой дозой для введения пациенту, будь то, например, одно или более отдельных введений или непрерывная инфузия. Одна типичная суточная доза может варьировать от 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от упомянутых выше факторов. При повторных введениях в 10 течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение обычно продолжают до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Одна типичная доза антитела может находиться в диапазоне от примерно 0,05 мг/кг до примерно 10 мг/кг. Таким образом, пациенту можно вводить одну или более доз примерно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг или 10 мг/кг (или любую их 15 комбинацию). Такие дозы можно вводить с перерывами, например, каждую неделю или каждые три недели (например, таким образом, что пациент получает примерно от двух до примерно двадцати или, например, примерно шести доз антитела). Можно вводить первоначальную более высокую нагрузочную дозу, а затем одну или более пониженных доз. Ход этой терапии легко контролировать с помощью обычных 20 методов и анализов.

Очевидно, что любой из вышеуказанных составов или терапевтических способов можно осуществлять с использованием иммуноконъюгата по настоящему изобретению вместо или в дополнение к анти-CTLA-4 антителу.

3. Продукция

В другом объекте настоящего изобретения предлагают изделие, содержащее материалы, полезные для лечения, профилактики и/или диагностики описанных выше 25 нарушений. Промышленное изделие включает контейнер и этикетку или вкладыш в упаковку, связанный с контейнером. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты для внутривенных растворов и т.д. Контейнеры 30 могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией эффективна для лечения, профилактики и/или диагностики состояния, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, которую можно

проколоть игла для подкожных инъекций). По меньшей мере один активный ингредиент в композиции представляет собой антитело по настоящему изобретению. На этикетке или листке-вкладыше указано, что композиция используется для лечения определенного состояния. Кроме того, промышленное изделие может включать (а) первый контейнер с содержащейся в нем композицией, которая содержит антитело по настоящему изобретению; и (б) второй контейнер с содержащейся в нем композицией, содержащей дополнительный цитотоксический или иной терапевтический агент. Промышленное изделие в этом варианте осуществления настоящего изобретения может дополнительно содержать вкладыш в упаковку, указывающий, что композиции могут быть использованы для лечения конкретного состояния. Альтернативно или дополнительно изделие может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, он может включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Понятно, что любое из вышеуказанных промышленных изделий может включать иммуноконъюгат по настоящему изобретению вместо или в дополнение к анти-CTLA-4 антителу.

Полипептиды, содержащие вариант Fc-области

В одном объекте настоящего изобретения описаны выделенные полипептиды, содержащие вариант Fc-области. В некоторых объектах полипептиды представляют собой антитела. В некоторых объектах полипептиды представляют собой слитые белки Fc. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения варианты Fc-области содержат по меньшей мере одно изменение аминокислотного остатка (например, замену) по сравнению с соответствующей последовательностью в Fc-области нативной последовательности или сопоставляемого варианта последовательности (в настоящем изобретении все они могут называться «исходной» Fc-областью). Fc-область нативной последовательности обычно состоит из гомодимера, состоящего из двух идентичных полипептидных цепей. Аминокислотные изменения в вариантах Fc-области по настоящему изобретению могут быть введены либо в одну из двух полипептидных цепей исходного участка Fc, либо в обе полипептидные цепи.

В некоторых объектах настоящего изобретения предусматривают варианты Fc-области, функция которых изменена по сравнению с исходной Fc-областью. В

некоторых объектах варианты Fc-области по настоящему изобретению обладают повышенной активностью связывания с рецептором Fcγ по сравнению с исходной Fc-областью. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения варианты Fc-областей по настоящему изобретению обладают повышенной активностью связывания по меньшей мере с одним рецептором Fcγ, выбранным из группы, состоящей из FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa, по сравнению с исходной Fc-областью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения варианты Fc-областей по настоящему изобретению обладают повышенной активностью связывания с FcγRIIa. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения варианты Fc-областей по настоящему изобретению обладают повышенной активностью связывания с FcγRIIIa. В других вариантах осуществления настоящего изобретения варианты Fc-областей по настоящему изобретению обладают повышенной активностью связывания с FcγRIIa и FcγRIIIa.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения варианты Fc-областей по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одно изменение аминокислоты по меньшей мере в одном положении, выбранном из группы, состоящей из положений 234, 235, 236, 298, 330, 332 и 334 по нумерации EU. В другом варианте аминокислотные изменения такие, как описано в WO 2013/002362 и WO 2014/104165, могут быть сходным образом использованы в настоящем изобретении.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения связывающая активность исходной Fc-области и вариантов Fc-областей может быть представлена значением KD (константы диссоциации). В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения величина отношения [значение KD исходной Fc-области для FcγRIIa] / [значение KD варианта Fc-области для FcγRIIa] составляет, например, 1,5 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 15 или более, 20 или более, 25 или более, 30 или более, 40 или более, или 50 или более. В других вариантах осуществления настоящего изобретения FcγRIIa может быть FcγRIIa R или FcγRIIa H, или обоими рецепторами. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения величина отношения [связывающая активность исходной Fc-области с FcγRIIIa] / [связывающая активность варианта Fc-области с FcγRIIIa] равно, например, 2 или более, 3 или более, 5 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 50 или более, 100 или более, 200 или более, 300 или более, 500 или более, 1×10^3 или более, 2×10^3 или более, 3×10^3 или более,

или 5×10^3 или более. В других вариантах осуществления настоящего изобретения FcγRIIIa может быть FcγRIIIa F или FcγRIIIa V, или и тем, и другим.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения значения KD вариантов Fc-областей для FcγRIIIa составляют, например, $1,0 \times 10^{-6}$ М или менее, $5,0 \times 10^{-7}$ М или менее, $3,0 \times 10^{-7}$ М или менее, $2,0 \times 10^{-7}$ М или менее, $1,0 \times 10^{-7}$ М или менее, $5,0 \times 10^{-8}$ М или менее, $3,0 \times 10^{-8}$ М или менее, $2,0 \times 10^{-8}$ М или менее, $1,0 \times 10^{-8}$ М или менее, $5,0 \times 10^{-9}$ М или менее, $3,0 \times 10^{-9}$ М или менее, $2,0 \times 10^{-9}$ М или менее, или $1,0 \times 10^{-9}$ М или менее. В других вариантах осуществления настоящего изобретения FcγRIIIa может быть FcγRIIIa R или FcγRIIIa H, или и тем, и другим. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения значения KD вариантов Fc-областей для FcγRIIIa составляют, например, $1,0 \times 10^{-6}$ М или менее, $5,0 \times 10^{-7}$ М или менее, $3,0 \times 10^{-7}$ М или менее, $2,0 \times 10^{-7}$ М или менее, $1,0 \times 10^{-7}$ М или менее, $5,0 \times 10^{-8}$ М или менее, $3,0 \times 10^{-8}$ М или менее, $2,0 \times 10^{-8}$ М или менее, $1,0 \times 10^{-8}$ М или менее, $5,0 \times 10^{-9}$ М или менее, $3,0 \times 10^{-9}$ М или менее, $2,0 \times 10^{-9}$ М или менее, $1,0 \times 10^{-9}$ М или менее, $5,0 \times 10^{-10}$ М или менее, $3,0 \times 10^{-10}$ М или менее, $2,0 \times 10^{-10}$ М или менее, или $1,0 \times 10^{-10}$ М или менее. В других вариантах осуществления настоящего изобретения FcγRIIIa может быть FcγRIIIa F или FcγRIIIa V, или и тем, и другим.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения связывающая активность исходной и вариантной Fc-областей может быть представлена значением kd (константа скорости диссоциации) вместо значения KD.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения связывающая активность исходной и вариантной Fc-областей может быть представлена количеством связывания с рецептором Fcγ на единицу количества Fc-области. Например, в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса связанное количество Fc-области, иммобилизованной на сенсорном чипе, и связанное количество рецептора Fcγ, дополнительно связанного с ним, измеряют как резонансную единицу (RU). Значение, полученное путем деления количества связывания рецептора Fcγ на количество связывания Fc-области, можно определить как количество связывания с рецептором Fcγ на единицу количества Fc-области. Конкретные способы измерения и расчета таких количеств связывания описаны в примерах ниже. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения значение отношения [количество связанного варианта Fc-области с FcγRIIIa]/[количество связанной исходной Fc-области с FcγRIIIa] составляет, например, 1,5 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 15 или более, 20 или

более, 25 или более, 30 или более, или 40 или более, или 50 или более. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения значение отношения [количество связанного варианта Fc-области с FcγRIIIa]/[количество связанной исходной Fc-области с FcγRIIIa] составляет, например, 2 или более, 3 или более, 5 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 50 или более, 100 или более, 200 или более, 300 или более, 500 или более, 1×10^3 или более, 2×10^3 или более, 3×10^3 или более, 5×10^3 или более.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения значения KD, значения kd, значения количества связывания и другие, описанные в настоящем изобретении, измеряют или рассчитывают путем проведения анализа методом поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C (см., например, пример 6 в настоящем описании).

В некоторых объектах настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению обладает улучшенной селективностью в отношении активирующих и ингибирующих рецепторов Fcγ по сравнению с исходной Fc-областью. Другими словами, активность связывания варианта Fc-области по настоящему изобретению с активирующим рецептором Fcγ значительно выше, чем активность связывания с ингибирующим рецептором Fcγ, по сравнению с исходной Fc-областью. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения активирующий рецептор Fcγ представляет собой по меньшей мере один рецептор Fcγ, выбранный из группы, состоящей из FcγRIa, FcγRIIa R, FcγRIIa H, FcγRIIIa F и FcγRIIIa V, а ингибирующим рецептором Fcγ является FcγRIIb. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения варианты Fc-области в настоящем изобретении имеют улучшенную селективность среди FcγRIIa и FcγRIIb. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области в настоящем изобретении имеет улучшенную селективность среди FcγRIIIa и FcγRIIb. В других вариантах осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области в настоящем изобретении имеет улучшенную селективность среди FcγRIIa и FcγRIIb, а также среди FcγRIIIa и FcγRIIb.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения варианты Fc-областей по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одно аминокислотное изменение по меньшей мере в одном положении, выбранном из группы, состоящей из положений 236, 239, 268, 270 и 326 в соответствии с нумерацией EU. В другом варианте аминокислотные изменения, описанные в WO 2013/002362 и

WO 2014/104165, могут быть аналогичным образом использованы в настоящем изобретении.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения связывающая активность исходной Fc-области и ее вариантов может быть представлена значением KD (константа диссоциации). Варианты осуществления настоящего изобретения, касающиеся связывающей активности с Fc γ RIIIa и Fc γ RIIIa, описаны выше. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения значение отношения [величина KD исходной Fc-области для Fc γ RIIIb]/[величина KD варианта Fc-области для Fc γ RIIIb] составляет, например, 10 или менее, 5 или менее, 3 или менее, 2 или менее, 1 или менее, 0,5 или менее, 0,3 или менее, 0,2 или менее или 0,1 или менее. В другом варианте осуществления настоящего изобретения связывающая активность исходной и вариантной Fc-областей может быть представлена значением kd (константа скорости диссоциации) вместо значения KD.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения связывающая активность исходной Fc-области и ее вариантов может быть представлена указанным выше количеством связывания с рецептором Fc γ на единицу количества Fc-области. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения величина отношения [количество связанного варианта Fc-области с Fc γ RIIIb]/[количество связанной исходной Fc-области с Fc γ RIIIb] составляет, например, 10 или менее, 5 или менее, 3 или менее, 2 или менее, 1 или менее, 0,5 или менее, 0,3 или менее, 0,2 или менее или 0,1 или менее. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество связывания варианта Fc-области с Fc γ RIIIb составляет, например, 0,5 или менее, 0,3 или менее, 0,2 или менее, 0,1 или менее, 0,05 или менее, 0,03 или менее, 0,02 или менее, 0,01 или менее, 0,005 или менее, 0,003 или менее, 0,002 или менее или 0,001 или менее.

В некоторых объектах настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению обладает улучшенной стабильностью по сравнению с исходной Fc-областью. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения стабильность является термодинамической стабильностью. О термодинамической стабильности полипептида можно судить, например, используя значение T_m в качестве показателя. Значения T_m можно измерить с использованием способов, известных специалистам в данной области, таких как круговой дихроизм (CD – circular dichroism), дифференциальный сканирующий калориметр (DSC – differential scanning calorimeter) и дифференциальная сканирующая флуориметрия (DSF – differential scanning fluorimetry). В одном из вариантов осуществления настоящего

изобретения в варианте Fc-области по настоящему изобретению значение Tm области CH2 увеличивается на 0,1 градуса или более, 0,2 градуса или более, 0,3 градуса или более, 0,4 градуса или более, 0,5 градуса или более, 1 градуса или более, 2 градуса или более, 3 градуса или более, 4 градуса или более, 5 градусов или более или 10 градусов или более по сравнению с исходной Fc-областью.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения варианты Fc-областей по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одно аминокислотное изменение по меньшей мере в одном положении, выбранном из группы, состоящей из положений 250 и 307 в соответствии с нумерацией EU. В другом варианте изменения аминокислот, описанные в WO 2013/118858, могут быть аналогичным образом использованы в настоящем изобретении.

В некоторых объектах настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению состоит из двух полипептидных цепей с отличающимися друг от друга последовательностями. В дополнительном объекте настоящего изобретения в варианте Fc-области по настоящему изобретению простимулирована гетеродимеризация между первым полипептидом и вторым полипептидом. Когда гетеродимерный белок получают методом рекомбинации, предпочтительно, чтобы пептидные цепи, отличающиеся друг от друга, предпочтительно связывались с образованием гетеродимера, а неидентичные полипептидные цепи связывались с образованием гомодимера. Полезна ли гетеродимеризация в варианте Fc-области или нет, можно судить, например, путем отделения гомодимеров и гетеродимеров от полученных вариантов Fc-областей с помощью такого метода, как хроматография, и путем определения доли каждого компонента.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения варианты Fc-областей по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одно аминокислотное изменение по меньшей мере в одном положении, выбранном из группы, состоящей из положений 349, 356, 366, 368, 407 и 439 в соответствии с нумерацией EU. В другом варианте аминокислотные изменения, описанные в WO 2006/106905 и WO 1996/027011, могут быть аналогичным образом использованы в настоящем изобретении.

В некоторых объектах настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению обладает повышенной активностью связывания с FcRn при кислом pH. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения кислый pH означает величину pH от 4,0 до 6,5. В других вариантах осуществления настоящего

изобретения кислый рН представляет собой по меньшей мере одну величину, выбранную из группы, состоящей из рН 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 и 6,5. В вариантах осуществления настоящего изобретения кислый рН составляет величину рН 5,8.

5 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения варианты Fc-областей по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одно аминокислотное изменение по меньшей мере в одном положении, выбранном из группы, состоящей из положений 428, 434, 436, 438 и 440 в соответствии с нумерацией EU. В другом варианте аминокислотные изменения, описанные в WO 2016/125495, могут быть
10 аналогичным образом использованы в настоящем изобретении.

В одном из объектов настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одно аминокислотное изменение по меньшей мере в одном положении, выбранном из группы, состоящей из положений 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326, 330, 332, 334, 349, 356, 366, 368, 407, 428, 434, 436,
15 438, 439 и 440 согласно нумерации EU.

В некоторых объектах настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению содержит изменения аминокислот в положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326 и 334 согласно нумерации EU. В еще одном аспекте вариант Fc-области содержит изменения аминокислот в (i) положениях 234,
20 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307 и 326 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области, и в (ii) положения 236, 250, 270, 298, 307, 326 и 334 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

В другом объекте настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению дополнительно содержит изменение аминокислоты в положении 332 в соответствии с нумерацией EU. В еще одном объекте настоящего изобретения вариант Fc-области содержит изменение аминокислоты в положении 332 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области.
25

В другом объекте настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению дополнительно содержит изменение аминокислоты в положении 356 в соответствии с нумерацией EU. В еще одном объекте настоящего изобретения вариант Fc-области содержит изменение аминокислоты в положении 356 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области.
30

В другом объекте настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению дополнительно содержит изменение аминокислоты в положении 366 в

В некоторых объектах настоящего изобретения варианты Fc-области по
настоящему изобретению содержат изменения аминокислот в положениях 234, 235,
236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326, 334, 349, 356, 366, 368 и 407 по нумерации EU. В
еще одном объекте настоящего изобретения вариант Fc-области содержит изменения
5 аминокислот в (i) положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326, 349 и 366
в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области и в (ii)
положения 236, 250, 270, 298, 307, 326, 334, 356, 366, 368 и 407 согласно нумерации EU
во втором полипептиде исходной Fc-области.

10 В некоторых объектах настоящего изобретения варианты Fc-области по
настоящему изобретению содержат изменения аминокислот в положениях 234, 235,
236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326, 334, 349, 356 и 439 по нумерации EU. В других
объектах настоящего изобретения вариант Fc-области содержит изменения
аминокислот в (i) положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326 и 356 в
соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области и в (ii)
15 положениях 236, 250, 270, 298, 307, 326, 334 и 439 согласно нумерации EU во втором
полипептиде исходной Fc-области.

В некоторых объектах настоящего изобретения варианты Fc-области по
настоящему изобретению содержат изменения аминокислот в положениях 234, 235,
236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326, 330, 332, 334, 349, 356, 366, 368 и 407 согласно
20 нумерации EU. В других объектах настоящего изобретения вариант Fc-области
содержит изменения аминокислот в (i) положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270,
298, 307, 326, 349 и 366 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде
исходной Fc-области и в (ii) положениях 236, 250, 270, 298, 307, 326, 330, 332, 334, 356,
366, 368 и 407 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

25 В некоторых объектах настоящего изобретения варианты Fc-области по
настоящему изобретению содержат изменения аминокислот в положениях 234, 235,
236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326, 330, 332, 334, 356 и 439 согласно нумерации EU. В
других объектах настоящего изобретения вариант Fc-области содержит изменения
аминокислот в (i) положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326 и 356 в
30 соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области и в (ii)
положениях 236, 250, 270, 298, 307, 326, 330, 332, 334 и 439 согласно нумерации EU во
втором полипептиде исходной Fc-области.

В некоторых объектах настоящего изобретения варианты Fc-области по
настоящему изобретению содержат изменения аминокислот в положениях 234, 235,

236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326, 332, 334, 349, 356, 366, 368 и 407 согласно нумерации EU. В других объектах настоящего изобретения вариант Fc-области содержит изменения аминокислот в (i) положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326, 332, 349 и 366 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области и в (ii) положениях 236, 250, 270, 298, 307, 326, 332, 334, 356, 366, 368 и 407 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

В некоторых объектах настоящего изобретения варианты Fc-области по настоящему изобретению содержат изменения аминокислот в положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326, 332, 334, 356 и 439 согласно нумерации EU. В других объектах настоящего изобретения вариант Fc-области содержит изменения аминокислот в (i) положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326, 332 и 356 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области и в (ii) положениях 236, 250, 270, 298, 307, 326, 332, 334 и 439 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

В некоторых объектах настоящего изобретения варианты Fc-области по настоящему изобретению содержат изменения аминокислот в положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326, 330, 332, 334, 366, 368 и 407 согласно нумерации EU. В других объектах настоящего изобретения вариант Fc-области содержит изменения аминокислот в (i) положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326 и 366 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области и в (ii) положениях 236, 250, 270, 298, 307, 326, 330, 332, 334, 366, 368 и 407 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

В некоторых объектах настоящего изобретения варианты Fc-области по настоящему изобретению содержат изменения аминокислот в положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326, 332, 334, 366, 368 и 407 согласно нумерации EU. В других объектах настоящего изобретения вариант Fc-области содержит изменения аминокислот в (i) положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326, 332 и 366 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области и в (ii) положениях 236, 250, 270, 298, 307, 326, 332, 334, 366, 368 и 407 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

В некоторых объектах настоящего изобретения варианты Fc-области по настоящему изобретению содержат изменения аминокислот в положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326, 330, 332, 334, 349, 356, 366, 368 и 407 согласно нумерации EU. В других объектах настоящего изобретения вариант Fc-области

содержит изменения аминокислот в (i) положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326, 349 и 366 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области и в (ii) положениях 236, 250, 270, 298, 307, 326, 330, 332, 334, 356, 366, 368 и 407 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

5 В некоторых объектах настоящего изобретения варианты Fc-области по настоящему изобретению содержат изменения аминокислот в положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326, 332, 334, 349, 356, 366, 368 и 407 согласно нумерации EU. В других объектах настоящего изобретения вариант Fc-области содержит изменения аминокислот в (i) положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270,
10 298, 307, 326, 332, 349 и 366 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области и в (ii) положениях 236, 250, 270, 298, 307, 326, 332, 334, 356, 366, 368 и 407 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения варианты Fc-областей по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одно аминокислотное
15 изменение, выбранное из группы, состоящей из: (i) Tyr или Phe в положении 234, Gln в положении 235, Trp в положении 236, Met в положении 239, Val в положении 250, Asp в положении 268, Glu в положении 270, Ala в положении 298, Pro в положении 307, Asp в положении 326, Glu в положении 332, Cys в положении 349, Lys в положении 356 и Trp в положении 366, согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-
20 области; и (ii) Ala в положении 236, Val в положении 250, Glu в положении 270, Ala в положении 298, Pro в положении 307, Asp в положении 326, Met или Lys в положении 330, Asp или Glu в положении 332, Glu в положении положение 334, Cys в положении 356, Ser в положении 366, Ala в положении 368, Val в положении 407 и Glu в положении 439, согласно нумерации EU, во втором полипептиде исходной Fc-области.

25 В других объектах варианты Fc-областей по настоящему изобретению дополнительно содержат любое из аминокислотных изменений (a)-(г), приведенных ниже:

(a) Ala в положении 434 согласно нумерации EU;

(б) Ala в положении 434, Thr в положении 436, Arg в положении 438 и Glu в
30 положении 440 согласно нумерации EU;

(в) Leu в положении 428, Ala в положении 434, Thr в положении 436, Arg в положении 438 и Glu в положении 440 согласно нумерации EU; а также

(г) Leu в положении 428, Ala в положении 434, Arg в положении 438 и Glu в положении 440 согласно нумерации EU.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность любой из последовательностей SEQ ID NO: 43- 46, 65, 66, 81, 207, 239, 253-271, 276, 277 и 278.

Обозначение «рецепторы Fc γ » (в настоящем описании называемые рецепторами Fc γ , Fc γ R или Fc γ R) относится к рецепторам, которые могут связываться с Fc-областью моноклональных антител IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и практически означают любого представителя семейства белков, кодируемых генами рецептора Fc γ . У человека это семейство включает Fc γ RI (CD64), в том числе изоформы Fc γ RIa, Fc γ RIb и Fc γ RIc; Fc γ RII (CD32), включая изоформы Fc γ RIIa (включая аллотипы H131 (тип H) и R131 (тип R)), Fc γ RIIb (включая Fc γ RIIb-1 и Fc γ RIIb-2) и Fc γ RIIc; и Fc γ RIII (CD16), включая изоформы Fc γ RIIIa (включая аллотипы V158 и F158) и Fc γ RIIIb (включая аллотипы Fc γ RIIIb-NA1 и Fc γ RIIIb-NA2), и любые рецепторы Fc γ R человека, изоформы или аллотипы Fc γ R, которые еще предстоит обнаружить, но не ограничиваются ими. Сообщалось, что Fc γ RIIb1 и Fc γ RIIb2 являются вариантами сплайсинга Fc γ RIIb человека. Кроме того, сообщалось о варианте сплайсинга, названном Fc γ RIIb3 (*J Exp Med*, 1989, 170:1369-1385). В дополнение к этим вариантам сплайсинга Fc γ RIIb человека включает все варианты сплайсинга, зарегистрированные в NCBI, а именно NP_001002273.1, NP_001002274.1, NP_001002275.1, NP_001177757.1 и NP_003992.3. Кроме того, Fc γ RIIb человека включает в себя все описанные ранее генетические полиморфизмы, а также Fc γ RIIb (*Arthritis Rheum.* 2003, 48:3242-3252); Копо с соавт., *Hum. Mol. Genet.* 2005, 14:2881-2892; и Куогою с соавт., *Arthritis Rheum.* 2002, 46:1242-1254), и каждый генетический полиморфизм, о котором будет известно в будущем.

У Fc γ RIIa существует два аллотипа: в одном аминокислота в положении 131 Fc γ RIIa представляет собой гистидин (тип H), а в другом аминокислота в положении 131 заменена аргинином (тип R) (Wartmerdam, *J. Exp. Med.* 1990, 172: 19-25).

Fc γ R подразумевает рецепторы Fc γ R, производные от человека, мыши, крысы, кролика и обезьяны, но не ограничивается ими, и может быть получен из любого организма. К Fc γ R мыши относятся Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16) и Fc γ RIII-2 (CD16-2) и любые Fc γ R мыши или изоформы Fc γ R, но ими возможный перечень не ограничивается.

Аминокислотная последовательность Fc γ RI человека представлена в SEQ ID NO: 131 (NP_000557.1); аминокислотная последовательность Fc γ RIIa человека представлена в SEQ ID NO: 132 (AAH20823.1), SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143 или SEQ ID NO: 150; аминокислотная последовательность Fc γ RIIb человека представлена в SEQ ID NO:

151 (AAI46679.1), SEQ ID NO: 169 или SEQ ID NO: 172; аминокислотная последовательность Fc γ RIIIa человека представлена в SEQ ID NO: 174 (AAH33678.1), SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176 или SEQ ID NO: 177; и аминокислотная последовательность Fc γ RIIIb человека представлена в SEQ ID NO: 178 (AAI28563.1).

5 В отличие от рецептора Fc γ , принадлежащего к надсемейству иммуноглобулинов, FcRn человека структурно сходен с полипептидами главного комплекса гистосовместимости (МНС – major histocompatibility complex) класса I, демонстрируя 22-29% идентичности последовательности с молекулами МНС класса I (Ghetie с соавт., *Immunol. Today*, 1997, 18 (12):592-598). FcRn экспрессируется в виде гетеродимера, состоящего из растворимой β -цепи или легкой цепи (β 2-микроглобулина), образующей комплекс с трансмембранной α -цепью или тяжелой цепью. Как и МНС, α -цепь FcRn содержит три внеклеточных домена (α 1, α 2 и α 3), и его короткий цитоплазматический домен закрепляет белок на поверхности клетки. Домены α 1 и α 2 взаимодействуют с FcRn-связывающим доменом Fc-области антитела (Raghavan с соавт., *Immunity*, 1994, 1: 303-315). Аминокислотная последовательность FcRn человека представлена в SEQ ID NO: 179 (NP_004098.1), а аминокислотная последовательность β 2-микроглобулина представлена в SEQ ID NO: 180.

Обозначение «исходная Fc-область» в настоящем изобретении относится к Fc-области до интродукции изменения (изменений) аминокислот, описанных в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения исходная Fc-область означает Fc-область нативной последовательности (или Fc-область нативного антитела). Антитело включает, например, IgA (IgA1, IgA2), IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) и IgM. Антитело может быть получено от человека или обезьяны (например, яванского макака, макаки-резуса, мартышки, шимпанзе или бабуина). Нативное антитело может включать встречающиеся в природе мутации. Множество аллотипических последовательностей IgG, обусловленных генетическим полиморфизмом, описано в «Sequences of proteins of immunological interest», публикация NIH № 91-3242, и любая из них может быть использована в настоящем изобретении. В частности, для IgG1 человека аминокислотная последовательность в положениях с 356 по 358 (нумерация EU) может быть либо DEL, либо EEM. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения исходная Fc-область представляет собой Fc-область, полученную из константной области тяжелой цепи IgG1 человека (SEQ ID NO: 249), IgG2 человека (SEQ ID NO: 250), IgG3 человека (SEQ ID NO: 251) или IgG4 человека (SEQ ID NO: 252). В другом варианте осуществления

настоящего изобретения исходная Fc-область представляет собой Fc-область, полученную из константной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 82 или SEQ ID NO: 158.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения исходная Fc-область может представлять собой Fc-областью, полученную путем добавления
5 аминокислотного изменения (изменений), отличных от аминокислотного изменения (изменений), описанных в настоящем изобретении, к Fc-области нативной последовательности (Fc-области эталонного варианта последовательности). Fc-область нативной последовательности обычно представляет собой гомодимер, состоящий из двух идентичных полипептидных цепей.

10 Кроме того, аминокислотные изменения, выполненные для других целей, могут быть объединены с описанным в настоящем изобретении вариантом Fc-области. Например, могут быть добавлены замещения, которые улучшают активность по связыванию FcRn (Hinton *с соавт.*, *J. Immunol.* 2006, 176(1):346-356; Dall'Acqua *с соавт.*, *J. Biol. Chem.* 2006, 281(33): 23514-23524; Petkova *с соавт.*, *Intl. Immunol.* 2006,
15 18(12): 1759-1769; Zalevsky *с соавт.*, *Nat. Biotechnol.* 2010, 28(2):157-159; WO 2006/019447; WO 2006/053301; WO 2009/086320), и замещения аминокислот для улучшения гетерогенности или стабильности антител (WO 2009/041613). В другом варианте полипептиды, способные стимулировать клиренс антигена, которые описаны в WO 2011/122011, WO 2012/132067, WO 2013/046704 или WO 2013/180201,
20 полипептиды со свойством специфического связывания с тканью-мишенью, которые описаны в WO 2013/180200, полипептиды со свойством многократного связывания с множеством молекул антигена, которые описаны в WO 2009/125825, WO 2012/073992 или WO 2013/047752, можно комбинировать с вариантом Fc-области, описанным в настоящем изобретении. В другом варианте с целью придания связывающей
25 способности другим антигенам аминокислотные изменения, описанные в EP 1752471 и EP 1772465, могут быть объединены в СН3 варианта Fc-области, описанного в настоящем изобретении. В другом варианте с целью увеличения удерживания в плазме, аминокислотные изменения, которые снижают pI константной области (WO 2012/016227), могут быть объединены с вариантом Fc-области, описанным в настоящем
30 изобретении. В другом варианте с целью стимуляции поглощения клетками аминокислотные изменения, повышающие pI константной области (WO 2014/145159), могут быть объединены с описанным в настоящем изобретении вариантом Fc-области. В другом варианте с целью стимуляции элиминации молекулы-мишени из плазмы аминокислотные изменения, повышающие pI константной области (WO 2016/125495),

могут быть объединены в вариант Fc-области, описанный в настоящем изобретении. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения такое изменение может включать, например, замену по меньшей мере по одному положению, выбранному из группы, состоящей из положений 311, 343, 384, 399, 400 и 413 согласно нумерации EU.

5 В другом варианте осуществления настоящего изобретения такая замена может представлять собой замену аминокислоты на Lys или Arg в каждом положении.

Кроме того, также могут быть использованы методы получения гетеродимеризованных антител, в которых используют ассоциацию CH1 и CL антитела и ассоциацию VH и VL, которые описаны в WO 2011/028952.

10 Как и в случае со способом, описанным в WO 2008/119353 и WO 2011/131746, также можно использовать метод получения гетеродимеризованных антител путем предварительного получения двух типов гомодимеризованных антител, инкубации антител в восстанавливающих условиях для их диссоциации и последующей заново осуществляемой ассоциации.

15 Кроме того, как и в случае со способом, описанным в WO 2012/058768, также можно использовать метод получения гетеродимеризованных антител путем добавления изменений в домены CH2 и CH3.

При одновременной экспрессии двух полипептидов, содержащих вариант Fc-области, которые имеют разные аминокислотные последовательности, для получения полипептидов, содержащих гетерологичные варианты Fc-областей, полипептиды, содержащие гомологичные варианты Fc-областей, также обычно получают в виде примесей. В таких случаях полипептиды, содержащие гетерологичные варианты Fc-областей, могут быть эффективно получены путем их отделения и очистки от полипептидов, содержащих гомологичные варианты Fc-областей, с использованием известных технологий. Сообщалось о способе эффективного отделения и очистки гетеродимеризованных антител от гомодимеризованных антител с использованием ионообменной хроматографии путем внесения аминокислотных изменений в переменные области двух типов тяжелых цепей антител для создания различий в изоэлектрических точках между гомодимеризованными антителами и гетеродимеризованными антителами (WO 2007/114325). Сообщалось о другом методе очистки гетеродимеризованных антител с использованием хроматографии с белком А путем конструирования гетеродимеризованного антитела, содержащего два типа тяжелых цепей, полученных из IgG2a мыши, который связывается с белком А, и IgG2b крысы, который не связывается с белком А.

Сообщалось о другом методе очистки гетеродимеризованных антител с использованием хроматографии с белком А путем конструирования гетеродимеризованного антитела, содержащего два типа тяжелых цепей, полученных из IgG2a мыши, который связывается с белком А, и IgG2b крысы, который не связывается с белком А (WO 1998/050431 и WO 1995/033844).

Кроме того, гетеродимеризованное антитело можно эффективно очистить с помощью хроматографии с белком А путем замены аминокислотных остатков в положениях 435 и 436 (нумерация EU), которые расположены в сайте связывания белка А тяжелой цепи антитела, аминокислотами, такими как Туг или His, чтобы получить различную аффинность связывания с белком А.

В настоящем изобретении изменение аминокислоты означает любую замену, делецию, добавление, инсерцию и модификацию или их комбинацию. В настоящем изобретении изменение аминокислоты может быть перефразировано как мутация аминокислоты.

Число аминокислотных изменений, интродуцированных в Fc-область, не ограничиваются. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения их может быть 1, 2 или менее, 3 или менее, 4 или менее, 5 или менее, 6 или менее, 8 или менее, 10 или менее, 12 или менее, 14 или менее, 16 или менее, 18 или менее или 20 или менее.

В одном объекте настоящее изобретение относится к способам получения полипептида, содержащего вариант Fc-области. В дополнительных объектах настоящее изобретение относится к способам получения полипептида, содержащего вариант Fc-области, функция которого была изменена. В некоторых объектах полипептиды представляют собой антитела. В некоторых объектах полипептиды представляют собой слитые Fc белки. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения эти способы включают введение по меньшей мере одной замены аминокислоты в исходную Fc-область. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения эти способы включают: (i) получение полипептида (полипептидов), включающих исходную Fc-область; и (ii) введение по меньшей мере одного изменения аминокислоты в исходной Fc-области. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения эти способы могут дополнительно включать (iii) измерение функции полипептида (полипептидов), содержащих вариант Fc-области. Нативная Fc-область обычно состоит из двух идентичных полипептидных цепей. Аминокислотные

изменения в исходной Fc-области могут быть введены либо в одну из двух полипептидных цепей исходной Fc-области, либо в обе из двух полипептидных цепей.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения способ получения полипептида (полипептидов), содержащих вариант Fc-области, включает: (i) получение 5 одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды, содержащие исходную Fc-область; (ii) введение по меньшей мере одной мутации в область (области), кодирующие исходную Fc-область в нуклеиновых кислотах; (iii) введение нуклеиновых кислот, полученных в (ii), в клетку-хозяина; и (iv) культивирование клетки, описанной в (iii), таким образом, что экспрессируется полипептид 10 (полипептиды), содержащий вариант Fc-области. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения вышеуказанные способы могут дополнительно включать (v) выделение полипептида (полипептидов), содержащих вариант Fc-области, из культуры клеток-хозяев, описанной в (iv).

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновые 15 кислоты, полученные в (ii), могут быть включены в один или более векторов (например, в векторы экспрессии).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислотные изменения, используемые в способах получения по настоящему изобретению, 20 выбирают из любых одиночных изменений, выбранных из аминокислотных изменений, которые могут содержаться в вышеупомянутых вариантах Fc-областей, комбинаций отдельных изменений или комбинированных изменений, перечисленные в табл. 26–30.

Fc-область может быть получена повторным элюированием фракции, адсорбированной на колонке с белком А, после частичного расщепления 25 моноклональных антител IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или подобных им антител с использованием протеазы, такой как пепсин. Протеаза определенным образом не ограничена, если она может расщеплять полноразмерное антитело таким образом, что Fab и F(ab')₂ продуцируются ограниченно путем соответствующего установления условий ферментативной реакции, таких как pH, примерами являются пепсин и папаин.

Полипептиды, содержащие вариант Fc-области по настоящему изобретению, 30 могут быть получены другими способами, известными в данной области, в дополнение к вышеупомянутым способам получения. Полипептиды, включающие вариант Fc-области, полученные описанными в настоящем изобретении способами получения, также включены в настоящее изобретение.

Способы анализа, описанные в настоящем изобретении, или различные способы измерения, известные в данной области, могут быть использованы для идентификации или скрининга вариантов Fc-областей, представленных в настоящем изобретении, или для выяснения их физических или химических свойств или биологической активности.

5 Анализы для определения связывающей активности полипептида, содержащего вариант Fc-области, в отношении одного или более рецепторов семейства FcR описаны в настоящем изобретении или иным образом известны в данной области. Такие анализы связывания включают, но им не ограничиваются, анализ поверхностного плазмонного резонанса, скрининг методом Amplified Luminescent Proximity
10 Homogeneous Assay (ALPHA), ELISA и сортировку клеток, активированных флуоресценцией (FACS) (Lazar с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103(11): 4005-4010).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения активность связывания полипептида, содержащего вариант Fc-области, с членами семейства FcR
15 можно измерить с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса. Например, различные FcR в качестве исследуемых соединений подвергают взаимодействию с полипептидом, содержащим вариант Fc-области, иммобилизованный или захваченный на сенсорном чипе, с использованием известных методов и реагентов (например, белка A, белка L, белка A/G, белка G, антитела с анти- λ цепью, антитела с
20 анти- κ цепью, антигенные пептиды и антигенные белки). В другом варианте FcR могут быть иммобилизованы или захвачены на сенсорном чипе, а полипептид, содержащий вариант Fc-области, может быть использован в качестве анализируемого вещества. В результате таких взаимодействий получают сенсограммы связывания и, анализируя их, можно рассчитать значения констант диссоциации (KD) таких связываний. Более того,
25 разница в значении резонансной единицы (RU) на сенсограммах до и после взаимодействия с FcR (т.е. количество связывания FcR) может быть использована в качестве индикатора связывающей активности полипептида, включающего вариант Fc-области к FcR. Кроме того, скорректированное значение, полученное путем деления указанного выше количества связывания FcR на разницу значений RU на сенсограммах
30 до и после иммобилизации или захвата полипептида, содержащего вариант Fc-области, на сенсорном чипе (т.е. количество полипептида, содержащего вариант Fc-области) (то есть поправочное значение представляет собой количество связывания FcR на единицу количества полипептида, содержащего вариант Fc-области), можно использовать в качестве индикатора активности связывания.

В другом объекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтические составы, содержащие полипептид, включающий вариант Fc-области, согласно описанному в настоящем изобретении. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения указанные выше фармацевтические составы дополнительно содержат фармацевтически приемлемые носители.

Примеры

Ниже показаны примеры способов и композиций по настоящему изобретению. Следует учитывать, что различные другие варианты осуществления могут быть реализованы с учетом упомянутого выше общего описания.

Пример 0. Концепция переключающего антитела, которое проявляет антителозависимую цитотоксическую активность в отношении маркеров клеточной поверхности регуляторных Т-клеток только в микроокружении рака

Считалось, что ипилимумаб оказывает противоопухолевое действие путем ингибирования подавления активации эффекторных Т-клеток с помощью CTLA4, экспрессируемого на поверхности эффекторных Т-клеток; однако недавно сообщалось, что антителозависимая цитотоксическая активность (активность ADCC) в отношении Т-клеток, экспрессирующих CTLA4, важна, и было обнаружено, что удаление регуляторных Т-клеток в опухолях и активность ADCC являются важными механизмами действия противоопухолевого эффекта анти-CTLA4 антител.

Кроме того, известно, что активность ADCC антител IgG1 является результатом индукции цитотоксической активности за счет связывания константной области антитела с Fc γ R клеток НК и макрофагов, а антитела с константной областью, модифицированной для усиления такого связывания, индуцируют более сильное цитотоксическое действие, проявляемое как противоопухолевое действие.

С другой стороны, сообщалось, что удаление регуляторных Т-клеток из всего организма вызывает системную реакцию, подобную аутоиммунному заболеванию, и считается, что регуляция баланса между цитотоксической активностью для оказания противоопухолевого эффекта и системным ответом является очень важной задачей.

Более конкретно, ожидается, что антитело будет проявлять более мощную цитотоксическую активность и будет способно подавлять системные ответы при условии, что антитело может прочно связываться с регуляторными Т-клетками или истощенными Т-клетками в микроокружении рака, оказывать сильное противоопухолевое действие путем удаления регуляторных Т-клеток или истощенных Т-клеток по цитотоксической активности, и ограничивают ответ только на

микроокружение рака. Об антителах с таким механизмом действия пока не сообщается. Поэтому в настоящем описании фактически созданы и проверены антитела (антитела переключения CTLA4), которые действуют против CTLA4 только локально в опухоли и содержат константную область с усиленным связыванием с FcγR, экспрессируемыми на клетках НК и макрофагах.

Пример 1. Получение антител, которые связываются с антигенами в присутствии АТФ или его метаболита, из наивной библиотеки и библиотеки антител рационального дизайна с использованием техники фагового дисплея

Пример 1-1. Подготовка антигенов для получения антител, которые связываются с антигеном в присутствии малой молекулы

В качестве антигенов получают биотинилированную внеклеточную область CTLA4 мыши (mCTLA4), внеклеточную область CTLA4 человека (hCTLA4) и белок абатацепт. В частности, что касается внеклеточной области hCTLA4, был синтезирован ген hCTLA4-His-BAP (SEQ ID NO: 1), в котором His-метка и BAP-метка слиты с C-концом внеклеточной области hCTLA4, которые встраивают в экспрессионную плазмиду животного. Белок-антиген экспрессируют и очищают, используя следующий метод. Подготовленную плазмиду вводят методом липофекции в линию клеток FreeStyle 293-F, полученную из клеток эмбриональной почки человека (фирма Invitrogen), и клетки высевают в колбу после суспендирования в экспрессионной среде FreeStyle 293 (фирма Invitrogen) при плотности клеток $1,33 \times 10^6$ клеток/мл. Через три часа после введения плазмиды добавляют биотин до конечной концентрации 100 мкМ, культивируют в инкубаторе в атмосфере CO₂ (37°C, 8% CO₂, 125 об/мин) в течение 4 суток и очищают антиген из культурального супернатанта по методике, известной специалистам в данной области. Поглощение очищенного раствора антигена при 280 нм измеряют с помощью спектрофотометра. Концентрацию очищенного антигена рассчитывают из полученного значения с использованием коэффициента экстинкции, рассчитанного методом PACE (*Protein Science*, 1995, 4: 2411-2423). С другой стороны, mCTLA4-His (фирма Sino Biologicals Inc. 50503-M08H, номер в каталоге NP_033973.2), в котором His-метка слита с внеклеточной областью mCTLA4, и абатацепт (фирма Alfresa Corporation), в котором константная область IgG1 человека слита с hCTLA4, биотинилируют методом сочетания с амином (фирма PIERCE, номер в каталоге 21329).

Пример 1-2. Получение антител, которые связываются с CTLA4 мыши в присутствии малых молекул из библиотеки наивных антител человека, путем пэннинга с применением гранул

Библиотека фагового дисплея человеческих антител, состоящая из множества фагов, которые представляют домены Fab последовательностей антител человека, отличающиеся друг от друга, сконструирована в соответствии со способом, известным специалистам в данной области, с использованием в качестве матрицы поли-А РНК, полученные из человеческих МКПК, коммерчески доступные поли-А РНК человека и т.п.

Из сконструированной библиотеки фагового дисплея наивных антител человека отбирают антитела, связывающая активность которых с внеклеточной областью CTLA4 мыши (mCTLA4) изменяется в присутствии и в отсутствие малой молекулы. Точнее, собирают фаги, презентующие антитела, которые проявляют активность по связыванию с mCTLA4 и захватываются на гранулах в присутствии малой молекулы. Фаги выделяли из фагового элюата, элюированного с гранул в отсутствие малой молекулы. В этом методе получения в качестве антигена использовали меченый биотином mCTLA4 (mCTLA4-His-Biotin).

Фаги, полученные из клеток *E. coli*, несущих сконструированную фагмиду для фагового дисплея, очищают по общей методике. Затем получают раствор фаговой библиотеки, диализованный против TBS. Пэннинг проводят с использованием антигена, иммобилизованного на магнитных гранулах. В качестве магнитных гранул используют гранулы, покрытые NeutrAvidin (гранулы Sera-Mag SpeedBeads, покрытые NeutrAvidin) или гранулы, покрытые стрептавидином (Dynabeads M-280 Streptavidin).

Для эффективного получения зависимо от малых молекул антитела-переключателя малых молекул, которое может действовать как переключатель в раковых тканях, проводили пэннинг, ссылаясь на метод, описанный в предшествующей патентной литературе WO 2013/180200. Этот метод пэннинга обогащает антитела, которые связываются с антигеном в присутствии аденозин-5'-трифосфата (АТФ) и метаболитов АТФ, но не связываются с антигеном в отсутствие АТФ.

Пример 1-3. Оценка активности связывания в присутствии и в отсутствие малой молекулы с помощью фагового ИФА (ELISA)

Из одиночных колоний *E. coli*, полученных в примере 1-2 получают культуральный супернатант, содержащий фаг, в соответствии с общепринятым методом (*Methods Mol. Biol.* 2002, 178:133-145). Супернатанты культур, полученные с

помощью NucleoFast 96 (фирма MACHERY-NAGEL), подвергают ультрафильтрации. По 100 мкл супернатанта каждой культуры вносят в каждую лунку NucleoFast 96 и центрифугируют в режиме 4500 g в течение 45 мин для удаления протока. Добавляют по 100 мкл H₂O и снова промывают центрифугированием при 4500 g в течение 30 мин. Затем добавляют по 100 мкл TBS и смесь оставляют при комнатной температуре в течение 5 мин, после чего растворы фагов, содержащиеся в супернатантах, извлекают.

Очищенные фаги, к которым добавляют TBS, анализируют ELISA по следующей методике. Планшет для микротитрования StreptaWell 96 (фирма Roche) на ночь покрывают 100 мкл TBS, содержащего mCTLA4-His-биотин. После промывания каждой лунки TBST для удаления mCTLA4-His-биотина, не связанного с планшетом, лунки блокируют 250 мкл 2% обезжиренного молока-TBS на 1 ч или дольше. После удаления 2% обезжиренного молока-TBS в каждую лунку добавляют подготовленные очищенные фаги и планшет оставляют стоять при комнатной температуре в течение 1 ч, что позволяет фагам, презентующим антигена, связываться с mCTLA4-His-биотином, присутствующим в каждой лунке в отсутствие или в присутствии АТФ. После промывания каждой лунки TBST или ATP/TBST туда добавляют HRP-конъюгированное анти-M13 антитело (фирма Amersham Pharmacia Biotech), разведенное TBS или ATP/TBS, и планшет инкубируют в течение 1 ч. После промывки TBST или ATP/TBST реакцию развития окраски раствора в каждой лунке, в которую добавляли один раствор ТМВ (ZYMED), останавливают добавлением серной кислоты, а затем измеряют изменение окраски по поглощению при 450 нм. В результате были подтверждены множественные антитела, которые связывались с mCTLA4 только в присутствии АТФ. Результаты фагового ELISA показаны в табл. 2. В данном случае клоны, имеющие коэффициент поглощения выше 0,2 в присутствии АТФ, определены как положительные, а клоны, имеющие коэффициент поглощения выше 2 в присутствии/отсутствии АТФ, определены как положительные клоны, обладающие АТФ-зависимой антигенсвязывающей способностью (переключающие клоны). В этом примере SM может использоваться как аббревиатура для малой молекулы (small molecule)/низкомолекулярной молекулы, такой как АТФ.

Таблица 2.

	Общее количество
Количество ELISA-обработанных клонов	192
Количество положительных клонов (абсорбция >0,2)	103
Количество переключающих клонов (SM± соотношение >2)	28

Пример 1-4. Получение антител, которые связываются с антигеном в присутствии малой молекулы из библиотеки рационального дизайна с использованием АТФ или его метаболита

Из библиотеки фагового дисплея с рациональным дизайном антител, созданной в предшествующей практике (WO 2015/083764), антитела, проявляющие антигенсвязывающую активность в условиях присутствия АТФ или метаболита АТФ (например, АДФ, АМФ, аденозина (АДО) и т.д.) были получены. Для получения антител собирают фаги, презентующие антитела, демонстрирующие способность связывания с антигеном, захваченным на гранулах, в присутствии АТФ или метаболита АТФ, после чего фаги выделяют из элюата, элюированного с шариков, в условиях отсутствия АТФ или метаболита АТФ.

Фаги получают обычным способом из *E. coli*, несущей сконструированную фагмиду для фагового дисплея. Раствор фаговой библиотеки получают разбавлением TBS популяции фагов, осажденных путем добавления 2,5 М NaCl/10% ПЭГ к культуральному раствору *E. coli*, в котором были получены фаги. Затем к раствору фаговой библиотеки добавляют БСА до конечной концентрации 4%. Пэннинг проводят с использованием антигена, иммобилизованного на магнитных гранулах. В качестве магнитных гранул используют гранулы, покрытые NeutrAvidin (гранулы Sera-Mag SpeedBeads, покрытые NeutrAvidin), или гранулы, покрытые стрептавидином (Dynabeads M-280 Streptavidin). В качестве антигена используют биотинилированный абатацепт (Abatacept-Biotin).

Чтобы эффективно получить зависимое от малых молекул низкомолекулярное антитело-переключатель, которое может действовать как переключатель в раковой ткани, пэннинг для обогащения антител, которые связываются с антигеном в присутствии аденозин-5'-трифосфата (АТФ) или метаболита АТФ, и не связываться с антигеном в отсутствие АТФ или метаболита АТФ, проводят со ссылкой на метод, показанный в предшествующей патентной литературе (WO 2015/083674).

Пример 1-5. Оценка активности связывания в присутствии и в отсутствие АТФ или его метаболита с помощью фагового ИФА (ELISA)

Из одиночных колоний *E. coli*, полученных вышеописанным способом, получают культуральный супернатант, содержащий фаг, в соответствии с общепринятым методом (*Methods Mol. Biol.* 2002, 178:133-145). Восстановленный культуральный супернатант подвергают ультрафильтрации с использованием NucleoFast 96 (MACHEREY-NAGEL). Проток удаляют центрифугированием (4500 g, 45 минут)

NucleoFast 96 с добавлением 100 мкл культурального супернатанта в каждую лунку. NucleoFast 96 с добавлением 100 мкл H₂O в каждую лунку снова промывают центрифугированием (4500 g, 30 мин). В итоге добавляют по 100 мкл TBS и получают раствор фага, содержащийся в супернатанте каждой лунки NucleoFast 96, который оставляют при комнатной температуре на 5 мин.

TBS или TBS, содержащий АТФ или его метаболит (SM/TBS), добавляют к очищенным фагам, и фаги подвергают анализу ELISA по следующей процедуре. Планшет для микротитрования StreptaWell 96 (фирма Roche) покрывают в течение ночи 100 мкл TBS, содержащего меченый биотином антиген (абатацепт-биотин), полученный в примере 1-1. После того как свободный абатацепт-биотин удаляют путем промывания каждой лунки планшета TBST, лунки блокируют 250 мкл 2% обезжиренного молока-TBS на 1 ч или дольше. После удаления 2% обезжиренного молока-TBS в каждую лунку добавляют подготовленные очищенные фаги и планшет оставляют при 37°C в течение 1 ч, что позволяет фагам, презентующим антитела, связываться с абатацептом-биотином, присутствующим в каждой лунке в отсутствие или присутствие АТФ или его метаболита. После того как каждую лунку планшета промывают TBST или TBST, содержащим АТФ или его метаболит (SM/TBST), туда добавляют HRP-конъюгированное анти-M13-антитело (фирма Amersham Pharmacia Biotech), разведенное TBS или SM/TBS, и этот планшет инкубируют 1 ч.

После промывки TBST или ATP/TBST реакцию развития окраски раствора в каждой лунке, в которую добавляли один раствор TMB (ZYMED), останавливают добавлением серной кислоты, а затем измеряют изменение окраски по поглощению при 450 нм. В результате были подтверждены множественные антитела, которые связывались с mCTLA4 только в присутствии АТФ. Результаты фагового ELISA показаны в табл. 3. В данном случае клоны, имеющие коэффициент поглощения выше 2 в присутствии АТФ, определены как положительные, а клоны, имеющие коэффициент поглощения выше 2 в присутствии/отсутствии АТФ или его метаболита, определены как клоны, обладающие антигенсвязывающей способностью, которая зависит от АТФ или его метаболита (переключение клонов).

Таблица 3.

	4й тест	5й тест	Общее количество
Количество ELISA-обработанных клонов	288	288	576
Количество положительных клонов (S/N > 2)	157	159	316

	4й тест	5й тест	Общее количество
Количество переключающих клонов (SM± соотношение>2)	6	16	22

Пример 1-6.

(1-6) Анализ последовательности переключающих антител, антигенсвязывающая активность которых изменяется в зависимости от наличия или отсутствия АТФ и ее метаболитов

Нуклеотидные последовательности генов, амплифицированных с использованием специфических праймеров lacPF (SEQ ID NO: 2) и G1seqR (SEQ ID NO: 3) из клонов, обладающих антигенсвязывающей активностью, при условии наличия АТФ и ее метаболитов в результате анализа методом фагового ИФА (ELISA). В результате анализа были получены клоны ABADh11-4_020, ABADh11-4_086, ABADh12-4_014, ABADh12-5_001, ABADh12-5_046 и ABADh5-5_041, которые, как было установлено, обладают активностью связывания с меченым биотином абатацептом в присутствии АТФ и его метаболитов. Имена клонов были переименованы и стали обозначаться как АВАМ001, АВАМ002, АВАМ003, АВАМ004, АВАМ005 и АВАМ006, соответственно (табл. 4).

Таблица 4.

Клоны	Антитела	VH SEQ ID NO	VL SEQ ID NO
ABADh11-4_020	АВАМ001	4	5
ABADh11-4_086	АВАМ002	6	7
ABADh12-4_014	АВАМ003	8	9
ABADh12-5_001	АВАМ004	10	11
ABADh12-5_046	АВАМ005	12	13
ABADh5-5_041	АВАМ006	14	15

Пример 1-7. Экспрессия и очистка переключающих антител, у которых антигенсвязывающая активность изменяется в зависимости от присутствия и отсутствия АТФ и ее метаболитов

Гены, кодирующие переменные области АВАМ001, АВАМ002, АВАМ003, АВАМ004, АВАМ005 и АВАМ006, полученные из библиотеки фагов рационального дизайна человека, встраивают в экспрессионную плазмиду животных IgG1/Lambda человека. Антитела экспрессируют с использованием следующего метода. Полученную плазмиду вводят методом липофекции в линию клеток FreeStyle 293-F, полученную из клеток эмбриональной почки человека (фирма Invitrogen), которая была

супендирована в экспрессионной среде FreeStyle 293 (фирма Invitrogen) при плотности клеток $1,33 \times 10^6$ клеток/мл, и высевают по 3 мл/лунку в каждую лунку 6-луночных планшетов. Антитела очищают из культурального супернатанта, культивируемого в CO₂-инкубаторе (37°C, 8% CO₂, 90 об/мин) в течение 4 дней с использованием среды

5 gProtein A Sepharose™ Fast Flow (фирма Amersham Biosciences) методом, известным специалистам в данной области. Поглощение растворов очищенных антител при 280 нм измеряют с использованием спектрофотометра. По полученным измеренным значениям рассчитывают концентрацию очищенных антител с использованием коэффициента экстинкции, рассчитанного методом PACE (*Protein Science*, 1995, 4: 10 2411-2423).

Пример 1-8. Оценка связывающей активности полученных антител против hCTLA4 в присутствии и в отсутствие АМП методом IgG ELISA

Полученные шесть антител АВАМ001, АВАМ002, АВАМ003, АВАМ004, АВАМ005 и АВАМ006 анализируют методом IgG ELISA. Буферы, показанные в табл.

15 5, готовят надлежащим образом. В качестве антигена используют меченный биотином CTLA4 человека (hCTLA4-His-Biotin).

Таблица 5.

Буфер	Состав
Буфер для промывки	TSB, 0,1% Tween20
Блокирующий буфер	TSB, 2% БСА
Буфер для образцов	TSB, 1 мМ АМП

Сначала планшет для микротитрования StreptaWell 96 (фирма Roche) покрывают

20 100 мкл TBS, содержащего hCTLA4-His-биотин, при комнатной температуре на 1 ч или дольше. После того как каждую лунку планшета промывают буфером для промывки для удаления hCTLA4-His-биотина, не связанного с планшетом, лунки блокируют 250 мкл блокирующего буфера на 1 ч или дольше. В каждую лунку, из которой удаляли блокирующий буфер, добавляют по 100 мкл каждого очищенного IgG в итоговой

25 концентрации 2,5 мкг/мл в буфере для образцов, содержащем АМП, в конечной концентрации 1 мМ, и планшет оставляют при комнатной температуре в течение 1 ч, что позволяет каждому IgG связываться с hCTLA4-His-биотином, присутствующим в каждой лунке. После промывки промывочным буфером, содержащим АМП в конечной

30 концентрации 1 мМ, планшет, в каждую лунку которого было добавлено HRP-конъюгированное анти-IgG антитело человека (фирма BIOSOURCE), разведенное буфером для образцов, инкубируют в течение 1 ч. После промывки промывочным

буфером, содержащим малую молекулу, реакцию изменения окраски раствора в каждой лунке, в которую добавляли раствор ТМВ (фирма ZYMED), останавливают добавлением серной кислоты, а затем измеряют развитие окраски по поглощению при 450 нм. В качестве буферов использовали буферы, содержащие композиции, показанные в табл. 5.

Результаты измерений представлены в табл. 6. Переполненным лункам присваивают оценку 5,00. Результаты показывают, что у всех клонов АВАМ001, АВАМ002, АВАМ003, АВАМ004, АВАМ005 и АВАМ006 поглощение в отсутствие АМФ было значительно ниже, чем в присутствии АМФ. Этот результат подтверждает, что все клоны АВАМ001, АВАМ002, АВАМ003, АВАМ004, АВАМ005 и АВАМ006 обладают свойством изменять связывание с антигеном в зависимости от присутствия или отсутствия малых молекул.

Таблица 6.

Антитела	Поглощение при 450 нм		
	Наличие малой молекулы	Отсутствие малой молекулы	S/N
АВАМ001	5,000	3,455	1,45
АВАМ002	5,000	0,139	35,97
АВАМ003	5,000	3,180	1,57
АВАМ004	5,000	0,643	7,78
АВАМ005	0,303	0,069	4,46
АВАМ006	2,995	0,776	3,86

Примет 1-9. Оценка воздействия АТФ и его метаболитов на связывание с СТЛА4 человека методом поверхностного плазмонного резонанса

АВАМ004 дополнительно оценивают как антитело-переключатель СТЛА4.

Взаимодействие реакции антиген-антитело между АВАМ004 и hCTLA4-His-ВАР анализируют с использованием Biacore T200 (фирма GE Healthcare). После захвата АВАМ004 сенсорным чипом CM5 (фирма GE Healthcare), на котором иммобилизован белок A/G (фирма Pierce) в соответствующем количестве методом сочетания с амином, допускают взаимодействие с антигеном hCTLA4-His-ВАР, полученным в примере 1-1. TBS используют в качестве подвижного буфера, а 10 мМ глицин-HCl (pH 1,5) используют в качестве раствора для регенерации.

После захвата 1 мкг/мл АВАМ004, суспендированного в TBS, раствор, содержащий 500 нМ hCTLA4-His-ВАР и 10 концентраций АТФ, АДФ или АМФ, разбавленных до концентрации от 4 из 4000 мкМ, и 2 мМ MgCl₂ вводят в каждую

проточную кювету со скоростью потока 10 мкл/мин в течение 3 мин. Эти 3 минуты используют в качестве фазы связывания hCTLA4-His-BAP. После завершения фазы связывания инъекцией вводят уже рабочий буфер в течение 2 мин, которые используют в качестве фазы диссоциации hCTLA4-His-BAP. После завершения фазы диссоциации вводят регенерирующий раствор со скоростью потока 30 мкл/мин в течение 30 сек. Указанное выше определяют как цикл измерения связывающей активности АВАМ004. Количество связывания hCTLA-4-His-BAP, которое взаимодействует с АВАМ004 в фазе связывания, корректируют в отношении количества захваченного антитела. Для анализа и построения графика по полученным результатам используют программное обеспечение Biacore T200 Evaluation Software Version: 2.0 и Microsoft Excel 2013 (фирма Microsoft).

Фиг. 1 представляет количество связывания АВАМ004 и hCTLA4-His-BAP в присутствии АТФ и его метаболитов, полученное с помощью описанного измерения.

На фиг. 1 подтверждается подтверждено, что АВАМ004 обладает свойством связываться с hCTLA4, используя в качестве переключателя не только АТФ, но и метаболиты АТФ. Кроме того, показано, что это антитело обладает наиболее сильной связывающей активностью, особенно в присутствии АМР.

Пример 1-10. Оценка связывания антител с клетками, экспрессирующими CTLA4 человека

Проточный цитометр используют для оценки изменений взаимодействия антиген-антитело между АВАМ004 и CTLA4 человека в присутствии и в отсутствие АМР. Клетки СНО, которые стабильно экспрессируют CTLA4 человека (клетки hCTLA4-СНО), получают в соответствующей концентрации. Одновременно для суспензии используют PBS, содержащий 0,1% БСА (буфер FACS). К 100 мкл клеточного раствора добавляют антитело до конечной концентрации 10 мг/мл, затем добавляют АМФ до конечной концентрации 0, 0,4, 4, 40, 200 и 1000 мкМ и оставляют при 4°C в течение 30 мин. После этого клеточную линию промывают промывочным буфером, который представляет собой буфер FACS, содержащий АМФ в конечной концентрации 0, 0,4, 4, 40, 200 и 1000 мкМ, а затем вторичное антитело, меченное FITC ((Goat F(ab'2) Anti-Human IgG Mouse ads-FITC, фирма Beckman, номер в каталоге 732598), и снова оставляют при 4°C в течение 30 мин в темноте. После повторной промывке измеряют и анализируют с использованием проточного цитометра (FACS CyAn™ ADP). Результаты представлены на фиг. 2.

Приведенные выше результаты показывают, что АВАМ004 проявляет связывающую активность, зависящую от концентрации АМФ, с клетками, экспрессирующими hCTLA4, и зависит от концентрации АМФ активность связывания не только с растворимыми антигенами, но также и с антигенами мембранного типа.

5 Пример 1-11. Активность ADCC исследуемого антитела с использованием моноклеарных клеток периферической крови человека (МКПК) в качестве эффекторных клеток

Активность ADCC исследуемого антитела, которое связывается с антигеном АТФ-зависимым образом, измеряют в соответствии со следующим методом.

10 Активность ADCC исследуемого антитела одновременно измеряют следующим образом с использованием моноклеарных клеток периферической крови человека (далее называемых МКПК человека) в качестве эффекторных клеток.

Сначала готовят раствор МКПК человека. У здоровых добровольцев (взрослых мужчин) отбирают по 50 мл периферической крови с помощью шприца, уже
15 содержащего 200 мкл раствора гепарина 1000 ЕД/мл (Ново-гепарин для инъекций 5000 ЕД, фирма Novo Nordisk). Периферическую кровь, разведенную в 2 раза PBS(-), делят на 4 аликвоты и добавляют в пробирки для разделения лимфоцитов Leucosep (фирма Greiner Bio-One), которые центрифугируют после предварительной инъекции 15 мл Ficoll-Paque PLUS. Пробирки для разделения, в которые вносили аликвоты
20 периферической крови, центрифугируют в режиме 2150 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем разделяют фракции моноклеарных клеток. После однократной промывки содержащихся во фракциях клеток однократно препаратом RPMI-1640 (фирма Nacalai Tesque), содержащим 10 % FBS (далее – 10 % FBS/RPMI), клетки суспендируют в 10 % FBS/RPMI до плотности клеток 1×10^7 клеток/мл.
25 Суспензию клеток используют в качестве раствора МКПК человека для последующих экспериментов.

Затем в качестве клеток-мишеней клетки hCTLA4-CHO, полученные путем принудительной экспрессии внеклеточной области CTLA4 человека в клетках CHO, суспендируют и получают в 10% FBS/RPMI, чтобы получить 2×10^5 клеток/мл. Кроме
30 того, АМФ (фирма Sigma), разбавленный до 4 мМ с помощью RPMI, используют в качестве раствора АМФ для последующих анализов.

Активность ADCC оценивают по высвобождению ЛДГ (лактатдегидрогеназы). Сначала в каждую лунку 96-луночного планшета с U-образным дном добавляют по 50 мкл раствора антител, приготовленного в каждой из концентраций (0, 0,04, 0,4, 4 и 40

мкг/мл), и в лунки высевали по 50 мкл из клеток-мишеней (1×10^4 клеток/лунку).

Кроме того, в каждую лунку добавляют по 50 мкл раствора АМФ и смесь оставляют при комнатной температуре на 15 мин. В каждую лунку добавляют по 50 мкл (5×10^5 клеток/лунку) раствора МКПК человека, центрифугируют планшет и затем оставляют

5 на 4 ч при 37°C в инкубаторе с 5% углекислым газом. После завершения реакции 100 мкл культурального супернатанта собирают и переносят в 96-луночный планшет для измерения, а затем катализатор (С) и раствор красителя (D), присоединенные к набору для обнаружения ЛДГ (TaKaRa), смешивают 1:45, и добавляют 100 мкл этой смеси.

10 После реакции при комнатной температуре в течение 15 мин добавляют 50 мкл 1N HCl для остановки реакции. Измеряют поглощение при 492 нм и активность ADCC оценивают по высвобождению ЛДГ. Активность ADCC определяют на основе следующей формулы:

$$\text{Активность ADCC (\%)} = \{(A-D) - (C-D)\} \times 100 / \{(B-D) - (C-D)\}$$

15

В приведенной выше формуле А означает среднее значение активности ЛДГ (ОП при 492 нм) в лунках, в которые добавляют каждое тестируемое антитело. В означает среднее значение активности ЛДГ (ОП при 492 нм) в лунках, в которые после реакции добавляют 10 мкл 20% водного раствора Triton-X. С означает среднее значение

20 активности ЛДГ (ОП при 492 нм) в лунках, в которые к клеткам-мишеням добавляют 150 мкл 10% FBS/RPMI или 100 мкл 10% FBS/RPMI и 50 мкл раствора АМФ. D означает среднее значение активности ЛДГ (ОП при 492 нм) в лунках, содержащих только 10% FBS/RPMI. Тест проводят в двух повторностях и рассчитывают среднее значение активности ADCC (%) в тесте, отражающее активность ADCC исследуемого

25

антитела. Результаты представлены на фиг. 3.

Из приведенных выше результатов следует, что антитело АВАМ004 обладает антигенсвязывающей активностью в присутствии АМФ и обладает способностью убивать клетки-мишени, проявляя активность ADCC.

Пример 2. Анализ кристаллической структуры анти-CTLA4 антитела, обладающего АТФ-зависимыми связывающими свойствами

30

Пример 2-1. Рентгеноструктурный анализ анти-CTLA4-связывающего антитела АВАМ004, в котором АМР используется в качестве переключателя

Для hCTLA4-связывающего антитела АВАМ004, которое использует АМФ в качестве переключателя и получено из библиотеки в примере 1, анализируют

кристаллические структуры отдельно фрагмента Fab АВАМ004, комплекса фрагмента Fab АВАМ004 и АМФ и комплекса фрагмента Fab АВАМ004, АМФ и внеклеточного домена hCTLA4.

Пример 2-2. Приготовление антитела АВАМ004 полной длины для кристаллизации

Получение и очистку антитела АВАМ004 полной длины для кристаллизации осуществляют методом, известным специалистам в данной области.

Пример 2-3. Приготовление фрагмента Fab для анализа кристаллической структуры фрагмента Fab АВАМ004

Фрагмент Fab антитела АВАМ004 получают обычным методом рестрикционного расщепления протеазой rLys-C (фирма Promega, номер в каталоге V1671) с последующей загрузкой в колонку с белком А (MabSelect SuRe, фирма GE Healthcare), катионообменную колонку (HiTrap SP HP, фирма GE Healthcare) и колонку для геле-фильтрации (Superdex200 16/60, фирма GE Healthcare) для удаления фрагментов Fc. Фракции, содержащие фрагменты Fab, объединяют и хранят при -80°C.

Пример 2-4. Получение кристаллов фрагмента Fab АВАМ004

Фрагмент Fab антитела АВАМ004 для кристаллизации, очищенный методом из примера 2-3, концентрируют примерно до 13 мг/мл и кристаллизуют при 20°C методом диффузии паров в сидячей капле. Резервуарный раствор состоит из 0,1 М MES, pH 6,5, 25 % масс./об. полиэтиленгликоля 4000. Полученные кристаллы погружают в раствор 0,08 М MES, pH 6,5, 20 % масс./об. полиэтиленгликоля 4000 и 20 % этиленгликоля.

Пример 2-5. Сбор данных рентгеноструктурного анализа по кристаллам фрагмента Fab АВАМ004 и определение структуры

Данные рентгеновской дифракции измеряют с помощью BL-17A радиационной установки Photon Factory Исследовательской организации ускорителей высоких энергий (High Energy Accelerator Research Organization). Во время измерения кристаллы постоянно выдерживают в замороженном состоянии в токе азота при температуре -178°C, в общей сложности было получено 360 рентгеновских дифракционных изображений с помощью CCD-детектора Quantum 270 (ADSC), подключенного к каналу луча, при вращении кристаллы за раз поворачиваются на 0,5°. Определение параметров ячейки, индексирование дифракционных пятен и обработку дифракционных данных по дифракционным изображениям проводят с помощью программы Xia2 (*J. Appl. Cryst.* 2010, 43:186-190), пакета XDS (*Acta. Cryst.* 2010, D66:125-132. Scala (*Acta. Cryst.* 2006, D62:72-82), и в результате получают данные

интенсивности дифракции с разрешением до 1,70 Å. Статистика кристаллографических данных представлена в табл. 7.

Структуру определяют методом молекулярного замещения с использованием программы Phaser (*J. Appl. Cryst.* 2007, 40, 658-674). Модель поиска фрагментов Fab получена из опубликованной кристаллической структуры Fab (код PDB: 4NKI). Модель была построена с помощью программы Coot (*Acta Cryst.* 2010, D66: 486-501) и уточнена с помощью программы Refmac5 (*Acta Cryst.* 2011, D67: 355-467). Фактор кристаллографической достоверности (R) данных интенсивности дифракции от 52,92 до 1,70 Å составил 16,92%, а значение свободного R составило 21,22%. Статистика структурного уточнения представлена в табл. 7.

Таблица 7. Сводка данных рентгеноструктурного анализа и статистические уточнения.

Собранные данные	АВАМ004fab	АВАМ004fab -АМФ	АВАМ004fab -АМФ-CTLA4
Пространственная группа	$P2_12_12_1$	$P42_12$	$P4_12_12$
Габариты одной ячейки			
a,b,c (Å)	64,27, 70,86, 79,59	135,75, 135,75, 66,04	72,29, 72,29, 309,31
α,β,γ (°)	90,00, 90,00, 90,00,	90,00, 90,00, 90,00,	90,00, 90,00, 90,00,
Разрешение (Å)	52,92-1,70	47,33-2,89	52,81-3,09
Число общих отражений	296585	181799	157732
Число уникальных отражений	40500	14366	16037
Комплектность (крайняя оболочка)	99,6 (98,8)	100,0 (100,0)	99,9 (99,9)
R_{merge}^a (крайняя оболочка)(%)	5,8 (67,6)	17,3 (88,7)	14,1 (63,2)
Обработка			
Разрешение (Å)	52,92-1,70	47,33-2,89	52,81-3,09
Число отражений	38523	13658	15145
Rфакторы ^o (R_{free}^b) (%)	16,92 (21,22)	19,97 (25,62)	23,49 (63,2)
rms отклонение от идеального значения			
длина связей (Å)	0,0128	0,0037	0,0038
углы связей (°)	1,7102	0,9275	0,8442

Пример 2-6. Получение фрагмента Fab АВАМ004 из антитела полной длины для анализа кристаллической структуры комплекса фрагмента Fab антитела АВАМ004 с АМФ, и комплекса фрагмента Fab антитела АВАМ004, АМФР и hCTLA4

Фрагмент Fab АВАМ004 получают обычным методом рестрикционного расщепления папаином (фирма Roche Diagnostics, номер в каталоге 1047825) с последующей загрузкой в колонку с белком А (MabSelect SuRe, фирма GE Healthcare), катионообменную колонку (HiTrap SP HP, фирма GE Healthcare) и колонку для гель-

фильтрации (Superdex200 16/60, фирма GE Healthcare) для удаления фрагментов Fc. Фракции, содержащие фрагменты Fab, объединяют и хранят при -80°C .

Пример 2-7. Получение кристаллов комплекса фрагмента Fab АВАМ004 и АМФ

5 Фрагмент Fab АВАМ004 для кристаллизации, очищенный по способу примера 2-6, концентрируют примерно до 13 мг/мл, к которому добавляют АМФ, чтобы получить конечную концентрацию 2 мМ, и кристаллизацию проводят при 20°C с помощью метода диффузии паров в сидячей капле. Резервуарный раствор состоит из 0,1 М буфера Morphueus 2, pH 7,5, 37,5% мас./об. MPD_P1K_P3350, 10% карбоновых кислот Morphueus (Morpheus, фирма Molecular Dimensions).

10 Пример 2-8. Сбор данных рентгеноструктурного анализа кристаллов комплекса фрагмента Fab АВАМ004 с АМФ и определение структуры

Данные рентгеновской дифракции были измерены с помощью BL-1A радиационной установки Photon Factory в Исследовательской организации ускорителей высоких энергий (High Energy Accelerator Research Organization). Во время измерения кристаллы постоянно выдерживают в замороженном состоянии в токе азота при 15 температуре -178°C , было получено 720 рентгеновских дифракционных изображений с помощью детектора Pilatus 2M (фирма DECTRIS), подключенного к пучку, при повороте кристаллов на $0,25^{\circ}$ за один раз. Определение параметров ячейки, индексирование дифракционных пятен и обработку данных по дифракционным изображениям проводят с помощью программы Xia2 (*J. Appl. Cryst.* 2010, 43:186-190), 20 пакета XDS (*Acta. Cryst.* 2010, D66:125-132) и Scala (*Acta. Cryst.* 2006, D62:72-82), и в результате получены данные интенсивности дифракции до разрешения $1,70 \text{ \AA}$. Статистика кристаллографических данных представлена в табл. 7.

Структуру определяют методом молекулярного замещения с использованием 25 программы Phaser (*J. Appl. Cryst.* 2007, 40, 658-674). Модель поиска фрагментов Fab получена из опубликованной кристаллической структуры Fab (код PDB: 4NKI). Модель построена с помощью программы Coot (*Acta Cryst.* 2010, D66: 486-501) и уточнена с помощью программы Refmac5 (*Acta Cryst.* 2011, D67: 355-367). Фактор кристаллографической достоверности (R) данных интенсивности дифракции от $47,33-$ 30 $2,89 \text{ \AA}$ составляет 19,97%, значение свободного R составляет 25,62%. Статистика структурного уточнения представлена в табл. 7.

Пример 2-9. Получение внеклеточного домена hCTLA4

Внеклеточный домен hCTLA4 получают обычным методом рестрикционного расщепления абатацепта эндопротеиназой Lys-C (фирма Roche, номер в каталоге

11047825001) с последующей загрузкой в колонку с белком А (MabSelect SuRe, фирма GE Healthcare) и колонку для гель-фильтрации (Superdex200 10/300, фирма GE Healthcare) для удаления фрагментов Fc. Фракции, содержащие внеклеточный домен hCTLA4, объединяют и хранят при -80°C.

5 Пример 2-10. Получение комплекса фрагмента Fab АВАМ004, АМФ и внеклеточного домена hCTLA4

10 Внеклеточный домен hCTLA4, очищенный по способу из примера 2-9, смешивают с фрагментом Fab АВАМ004, очищенным по способу из примера 2-6, в молярном соотношении 1,5:1, и к нему добавляют АМФ, чтобы получить конечную концентрацию 2 мМ. Комплекс очищают гель-фильтрационной хроматографией (Superdex200 10/300, фирма GE Healthcare) с использованием колонки, уравновешенной 25 мМ HEPES, рН 7,5, 100 мМ NaCl, 2 мМ АМФ.

15 Пример 2-11. Получение кристаллов комплекса фрагмента Fab АВАМ004, АМФ и внеклеточного домена hCTLA4

Очищенный комплекс концентрируют примерно до 8 мг/мл и кристаллизуют при 20°C с помощью метода диффузии паров в сидячей капле в сочетании с методом затравки. Резервуарный раствор состоял из 0,1 М буфера Morpheus 1, рН 6,5, 37,5% мас./об. М1К3350, 10% галогенов (Morpheus, фирма Molecular Dimensions).

20 Пример 2-12. Сбор данных рентгеноструктурного анализа кристаллов комплекса фрагмента Fab АВАМ004, АМФ и hCTLA4 и определение структуры

25 Данные рентгеновской дифракции измеряют с помощью BL32XU SPring-8. Во время измерения кристаллы постоянно выдерживают в замороженном состоянии в потоке азота при температуре -178°C, и в общей сложности было получено 180 рентгеновских дифракционных изображений с помощью детектора CCD MX-225HS (фирма RAYONIX), подключенного к пучку, при повороте кристаллы на 1,0° за один раз. Определение параметров ячейки, индексирование дифракционных пятен и обработку данных по дифракционным изображениям проводят с помощью программы Xia2 (*J. Appl. Cryst.* 2010, 43:186-190), пакета XDS (*Acta. Cryst.* 2010, D66:125-132) и Scala (*Acta. Cryst.* 2006, D62:72-82), и в результате получены данные интенсивности дифракции до разрешения 1,70 Å. Статистика кристаллографических данных представлена в табл. 7.

30

Структуру определяют методом молекулярного замещения с использованием программы Phaser (*J. Appl. Cryst.* 2007, 40, 658-674). Модель поиска фрагментов Fab получена из опубликованной кристаллической структуры Fab (код PDB: 4NKI), а

модель поиска внеклеточного домена hCTLA4 получена из опубликованной кристаллической структуры CTLA4 человека (код PDB: 3OSK, *J. Biol. Chem.* 2011, 286: 6685-6696). Модель была построена с помощью программы Coot (*Acta Cryst.* 2010, D66: 486-501) и уточнена с помощью программы Refmac5 (*Acta Cryst.* 2011, D67: 355-367).

5 Фактор кристаллографической достоверности (R) данных интенсивности дифракции от 52,81-3,09 Å составил 23,49%, а значение свободного R составило 31,02%. Статистика структурного уточнения представлена в табл. 7.

Пример 2-13. Определение сайта взаимодействия между АВАМ004 и АМФ

10 Кристаллическая структура показала, что АМФ в основном распознается тяжелой цепью антитела.

Часть аденинового кольца АМФ распознается CDR1 и CDR3 тяжелой цепи, а часть рибозы и часть фосфатной группы распознаются CDR1 и CDR2.

В частности, как показано на фиг. 4, фрагмент аденинового кольца АМФ распознается боковыми цепями T33, принадлежащими CDR1 тяжелой цепи, и Y95, L100B и W100C, принадлежащими CDR3, и основными цепями G96 и M100A антитела. В частности установлено, что карбонильные атомы кислорода в основных цепях G96 и M100A образуют водородные связи с N в положении 6 АМФ, группа NH амида основной цепи W100C образует водородную связь с N в положении 1, а боковые цепи Y95, L100B и W100C взаимодействуют с использованием пи-электронов фрагмента аденинового кольца, так что антитело строго распознает фрагмент аденинового кольца. Фрагмент рибозы распознается каждой из боковых цепей T33, принадлежащих CDR1 тяжелой цепи, и Y56 и Y58, принадлежащих CDR2, посредством сил Ван-дер-Ваальса и посредством взаимодействия пи-электронов Y56. Кроме того, фрагмент фосфатной группы распознается каждой из боковых цепей T33, принадлежащих тяжелой цепи CDR1, и S52, S52A и R53, принадлежащих CDR2, и основной цепи S52A. В частности, считается, что водородные связи, образованные боковой цепью T33 и амидной группой NH основной цепи S52A с фрагментом фосфатной группы, и ван-дер-ваальсовы взаимодействия S52 и R53 играют важную роль в распознавании части фосфатной группы. Нумерация аминокислотных остатков Fab основана на схеме нумерации Kabat.

Пример 2-14. Идентификация эпитопов АВАМ004

30 На фиг. 5 и 6 эпитопы контактной области Fab АВАМ004 картированы в кристаллической структуре hCTLA4 и в аминокислотной последовательности, соответственно. Эпитопы содержат аминокислотные остатки hCTLA4, содержащие

один или более атомов, отличных от водорода, расположенных в пределах 4,2 Å от любой части Fab АВАМ004 или АМФ в кристаллической структуре.

Из кристаллической структуры становится ясно, что по крайней мере М3, Е33, R35, Т53, Е97, М99, Y100, Р101, Р102, Р103, Y104, Y105 и L106 антигена распознаются CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, CDR1 и CDR3 легких цепей антитела и АМР. В частности, петля, состоящая из фрагмента М99-Y104 антигена, отчетливо распознается антителом, так как она скрыта в петле CDR антитела, и считается, что эта петля играет основную роль в распознавании антигена антителом.

Пример 2-15. АМФ-зависимый механизм связывания антигена

Вариабельную область антитела экстрагируют из кристаллической структуры только АВАМ004 Fab, кристаллической структуры комплекса АВАМ004 Fab и АМФ и кристаллической структуры тройного комплекса, состоящего из АВАМ004 Fab, АМФ и СТЛА4; фиг. 7. представляет собой наложенный рисунок выделенных вариабельных областей, сосредоточенных вокруг тяжелой цепи. Для АМФ-зависимого связывания антигена важным считают не только прямое взаимодействие между АМФ и СТЛА4, показанным в примере 2-14, но и структурное изменение антитела, связанное со связыванием АМФ.

Как показано на фиг. 7, путем сравнения кристаллической структуры одного антитела с кристаллической структурой антитела, с которым связывается АМФ, установлено, что петлевые структуры CDR3 тяжелой цепи и CDR3 легкой цепи, а также угол кручения между тяжелой цепью и легкой цепью в вариабельной области антитела также изменялся. Кроме того, сравнивая кристаллическую структуру антитела, с которым связывается АМФ, и кристаллическую структуру тройного комплекса, состоящего из антитела, АМФ и СТЛА4, также признано, что структуры CDR3 тяжелой цепи и CDR1 легкой цепи дополнительно изменены путем антигенсвязывающих, проявляющих антигенную зависимость структурных изменений. С другой стороны, поскольку структура петли CDR3 легкой цепи и угол закручивания между тяжелой цепью и легкой цепью не изменились, полагают, что связывание АМФ может изменить структуру антитела до состояния, близкого к структуре во время связывания антигена. Таким образом, полагают, что структурные изменения, связанные со связыванием АМФ, необходимы для формирования подходящей структуры для связывания антигена и играют важную роль в зависимом от АМФ связывании антигена.

Пример 3. Получение CTLA4-измененных антител и оценка их активности

Пример 3-1. Получение CTLA4-связывающих с повышенной активностью вариантов антитела АВАМ004

Аминокислотная последовательность АВАМ004 (VH SEQ ID NO: 10, VL SEQ ID NO: 11), полученная из фаговой библиотеки рационального дизайна человека, описанной в примере 1, изменена для снижения CTLA4-связывающей активности указанной последовательности в отсутствие аналогов АТФ и для повышения активности связывания CTLA4 человека в присутствии аналогов АТФ и для усиления связывания с АТФ и аналогами АТФ. Чтобы достичь этого, были созданы варианты с точечными мутациями в остатках, которые, как ожидается, будут участвовать в связывании, на основе ко-кристаллической структуры АВАМ004 и АМФ и ко-кристаллической структуры АВАМ004, АМФ и CTLA4 человека, полученных описанным методом в примере 2. Кроме того, также созданы варианты, в которых каждая аминокислота, содержащаяся в CDR, заменена на Ala или Pro. Варианты точечных мутаций измеряют с помощью Biacore T200 или Biacore 4000 (фирма GE Healthcare) для активности связывания CTLA4 человека (абатацепт и hCTLA4-His-BAP) в отсутствие АТФ и в присутствии АТФ, АДФ или АМФ для скрининга мутаций, которые усиливают связывающую активность. Варианты получают путем объединения мутаций, которые усиливают связывающую активность, и значение KD рассчитывали с помощью программного обеспечения Biacore. В результате установлено, что введение замен H32A и S52aT в тяжелую цепь АВАМ004 и T24D, T26P и E50F в легкую цепь (согласно нумерации Kabat) усиливает способность связывания АВАМ004. Вариант обозначен как 04H0150/04L0072 (VH SEQ ID NO: 47, VL SEQ ID NO: 48).

Пример 3-2. Измерение методом поверхностного плазмонного резонанса влияния АТФ и его метаболитов на активность по связыванию CTLA4 человека с АВАМ004 и 04H0150/04L0072

Сначала был создан чип для измерения Biacore T200. Температура Biacore T200 установлена на 25°C, а скорость потока установлена на 10 мкл/мин. HBS-EP+ используют в качестве подвижного буфера. Смесь равных объемов NHS (N-гидроксисукцинимид) и EDC (N-этил-N'-(диметиламинопропил)карбодиимида) добавляют к сенсорному чипу CM5 (фирма GE Healthcare) со скоростью потока 10 мкл/мин в течение 10 минут для активирования проточных кювет. Затем добавляют 25 мкг/мл белка A/G (фирма Pierce), суспендированного в 10 mM ацетата натрия, pH 4,0, и оставляют для связывания при 10 мкл/мин в течение 30 мин. Затем избыточные

активные группы на проточных кюветах блокируют добавлением 1 М раствора этаноламина-НСl со скоростью 10 мкл/мин в течение 10 мин.

Затем измеряют влияние АТФ и его метаболитов на связывание целевого антитела с СТLА4 человека. Заданная температура составляет 25°C, а в качестве подвижного буфера используют ТBS. 10 мМ глицин-НСl (рН 1,5) используют в качестве раствора для регенерации. После того как антитело, суспендированное в ТBS, можно было захватить, в каждую проточную кювету вводят раствор ТBS, содержащий 500 нМ hСТLА4-His-ВАР, 10 концентраций АТФ, АДФ или АМФ, разбавленных в обычном соотношении 4 из 4000 мкМ и 2 мМ MgCl₂ при скорости потока 10 мкл/мин в течение 3 мин. Эти 3 мин используют в качестве фазы связывания hСТLА4-His-ВАР. После завершения фазы связывания инъекцию переключают на подвижный буфер на 2 минуты, которые используют в качестве фазы диссоциации. После завершения фазы диссоциации вводят регенерирующий раствор со скоростью потока 30 мкл/мин в течение 30 сек; описанное выше рассматривают как цикл измерения активности связывания. Количество связывания hСТLА4-His-ВАР, которое взаимодействовало с АВАМ004 или 04Н0150/04L0072 в фазе связывания, корректируют по количеству захваченного антитела. Результаты показаны на фиг. 8. Кроме того, при измерении связывания АВАМ004 и 04Н0150/04L0072 концентрацию малых молекул в фазе связывания поддерживают на уровне 62,5 мкМ или 1 мМ, а 8 концентраций hСТLА4-His-ВАР разбавляют в обычном соотношении 2 из 2000 нМ и используют в фазе связывания. Значения КD, полученные в результате анализа количества связывания hСТLА4-His-ВАР, показаны в табл. 8. Для анализа и построения графика данных используют программное обеспечение Biacore T200 версия: 2.0 и Microsoft Excel 2013 (фирма Microsoft). Для расчета значения КD используют устойчивую модель аффинности.

Таблица 8.

Лиганд	Образец	КD (М)	
		SM (62,5 мкМ)*	SM (1мМ)
04Н0150/04L0072	hСТLА4_АМФ	6,9E-07	2,3E-07
	hСТLА4_АДФ	4,2E-07	3,2E-07
	hСТLА4_АТФ	8,1E-07	3,2E-07
АВАМ004	hСТLА4_АМФ	4,3E-06	1,4E-06
	hСТLА4_АДФ	2,5E-06	1,5E-06
	hСТLА4_АТФ	5,5E-06	2,3E-06

*«SM» означает малые молекулы (АТФ, АДФ или АМФ), используемые в данном анализе.

Пример 3-3. Повышение связывающей способности за счет внесения различных изменений

5 Для создания улучшенных анти-CTLA4 антител аминокислотные изменения были специально введены в 04H0150/04L0072, которые представляют собой переменные области антитела против CTLA4 человека, полученного в примере 3-1. Варианты, в которых аминокислотная замена каждой из 18 аминокислот, кроме цистеина, проводилась во всех CDR 04H0150 и 04L0072, были созданы способами, известными 10 специалистам в данной области, такими как ПЦР. Измерения около 1200 вариантов, созданных для связывания с CTLA4 человека, были выполнены с использованием программного обеспечения Biacore 4000. Белок A/G (фирма Thermo Fisher Scientific) иммобилизован на сенсорном чипе Series S CM5 (фирма GE Healthcare), и антитела захватываются чипом путем взаимодействия с культуральным супернатантом, 15 содержащим вариант антитела. Затем раствор CTLA4 человека, к которому добавлена малая молекула (АТФ, АДФ или АМФ), или раствор CTLA4 человека, к которому не добавлялась малая молекула, приводят во взаимодействие с антителом для оценки связывающей способности антитела к CTLA4 человека в присутствии или в отсутствие 20 малой молекулы. Анализ проводят при 25°C с использованием трис-буферного солевого раствора, 0,02% PS20 в качестве подвижного буфера.

Изменения, усиливающие связывание с CTLA4 человека в присутствии малой молекулы, и изменения, снижающие связывание с CTLA4 человека в отсутствие малой молекулы, были выявлены с помощью описанного выше метода, и объединены для 25 получения антител против CTLA4 человека, показывающих лучшие профили. К гену тяжелой цепи антитела 04H0150-G1m (SEQ ID NO: 209), который имеет 04H0150 в качестве переменной области тяжелой цепи и G1m (SEQ ID NO: 82), в котором удалены С-концевые Gly и Lys IgG1 человека в качестве константной области тяжелой цепи, изменения, обнаруженные введением всесторонних изменений и изменений в 30 каркас, объединяют для получения генов тяжелой цепи антитела. Для легкой цепи антитела 04L0072-lam1 (SEQ ID NO: 208), имеющей 04L0072 в качестве переменной области легкой цепи и λ-цепи lam1 (SEQ ID NO: 87) в качестве константной области легкой цепи человека, обнаруженные изменения объединяют для получения генов легкой цепи антитела. Кроме того, также создают вариант, в котором каркас 35 переменной области и константной области легкой цепи заменены

последовательностью к-цепи человека. Для сравнения, получают ген тяжелой цепи антитела MDX10D1H-G1m (SEQ ID NO: 210), содержащий переменную область тяжелой цепи MDX10D1H (SEQ ID NO: 154), и ген легкой цепи антитела MDX10D1L-k0MT (SEQ ID NO: 211), имеющие переменную область легкой цепи MDX10D1L (SEQ ID NO: 155) существующего антитела против CTLA4 человека, описанного в WO 0114424. Антитела экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области, путем объединения этих генов для получения представляющих интерес антител против CTLA4. В табл. 9 перечислены SEQ ID NO переменных областей тяжелой цепи, переменных областей легкой цепи, константных областей тяжелой цепи, константных областей легкой цепи и гиперпеременных областей полученных антител.

В настоящем описании антитела названы в соответствии со следующим правилом: (переменная область тяжелой цепи) - (константная область тяжелой цепи)/(переменная область легкой цепи) - (константная область легкой цепи). Например, это означает, что если название антитела 04H0150-G1m/04L0072-lam1, переменная область тяжелой цепи этого антитела — 04H0150, константная область тяжелой цепи — G1m, переменная область легкой цепи — 04L0072, а константная область легкой цепи – lam1.

Таблица 9. Аминокислотные последовательности тяжелых цепей, легких цепей и их гиперпеременных областей (обозначены как SEQ ID NO:).

Антитело	Переменная область		Константная область		Гиперпеременная область (HVR)					
	Тяжелая цепь	Легкая цепь	Тяжелая цепь	Легкая цепь	H1	H2	H3	L1	L2	L3
04H0150-G1m/04L0072-lam1	98	99	82	87	103	104	102	116	117	115
04H1077-G1m/04L1041-lam1	83	88	82	87	105	106	102	118	117	115
04H1077-G1m/04L1063-lam1	83	89	82	87	105	106	102	116	117	133
04H1077-G1m/04L1027-lam1	83	90	82	87	105	106	102	119	117	115
04H1077-G1m/04L1034-lam1	83	91	82	87	105	106	102	120	117	115
04H1077-G1m/04L1066-lam1	83	92	82	87	105	106	102	121	117	115
04H1077-G1m/04L1067-lam1	83	93	82	87	105	106	102	122	117	115
04H1077-G1m/04L1068-lam1	83	94	82	87	105	106	102	118	117	133
04H1077-G1m/04L1086-lam1	83	97	82	87	105	106	102	122	117	133
04H1077-G1m/04L1305-k0MT	83	95	82	96	105	106	102	122	117	133
04H1206-G1m/04L1086-lam1	84	97	82	87	105	106	102	122	117	133
04H1207-G1m/04L1086-lam1	85	97	82	87	107	106	102	122	117	133
04H1208-G1m/04L1086-lam1	86	97	82	87	107	108	102	122	117	133
04H1208-G1m/04L1407-k0MT	86	134	82	96	107	108	102	121	123	153

Biacore T200 используют для измерения связывания полученных антител с CTLA4 человека. В качестве рабочего буфера используют 20 mM ACES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0,05% Tween 20 с добавлением АТФ до нужной концентрации, анализ проводят при 37°C. Во-первых, белок G (фирма CALBIOCHEM) иммобилизуют на сенсорном чипе серии S CM3 (фирма GE Healthcare), и антитела захватывают путем взаимодействия с чипом раствора антител, приготовленного в подвижном буфере, не содержащем АТФ. Далее, при взаимодействии с раствором CTLA4 человека, приготовленным в подвижном буфере, содержащем АТФ до желаемой концентрации, или с раствором CTLA4 человека, приготовленным в подвижном буфере, не содержащем АТФ, оценивают связывающую способность антитела к CTLA4 человека в присутствии или в отсутствие АТФ. Чипы регенерируют с помощью 25 mM NaOH и 10 mM глицин-HCl (pH 1,5) и проводят анализ путем повторного захвата антител. Константу диссоциации каждого антитела относительно CTLA4 рассчитывают с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software 2.0. В частности, константу скорости связывания k_a (л/моль/сек) и константу скорости диссоциации k_d (1/с) рассчитывают путем глобальной подгонки сенсорограмм, полученных в результате измерения, с использованием модели связывания Ленгмюра 1:1. По этим значениям рассчитывают константу диссоциации KD (моль/л). В качестве альтернативы константу диссоциации KD (моль/л) рассчитывают по модели стационарного состояния. Кроме того, количество связывания CTLA4 на единицу количества антитела рассчитывают путем корректировки количества связанного CTLA4, рассчитанного по сенсограмме, полученной в результате анализа, с количеством антител, захваченных на поверхности чипа. В табл. 10 показаны результаты этих анализов.

Таблица 10. Анализ связывания измененного антитела с CTLA4 человека.

Антитело	Связывание с CTLA4 человека					КД для CTLA4 человека (М)		
	Без АПФ		АПФ 1 мкМ	АПФ 10 мкМ	АПФ 100 мкМ	Без АПФ	АПФ 10 мкМ	АПФ 100 мкМ
	Без АПФ	АПФ 1 мкМ	АПФ 10 мкМ	АПФ 100 мкМ	Без АПФ	АПФ 10 мкМ	АПФ 100 мкМ	
MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT	0.189	0.189	0.181	0.170	4.8E-08	4.9E-08	4.5E-08	
04H0150-G1m/04L0072-lam1	0.001	0.001	0.010	0.056	N.A.	N.A.	1.9E-06	
04H1077-G1m/04L1041-lam1	0.006	0.023	0.094	0.172	N.A.	7.3E-07	1.4E-07	
04H1077-G1m/04L1063-lam1	0.001	0.003	0.029	0.105	N.A.	N.A.	5.8E-07	
04H1077-G1m/04L1027-lam1	0.000	0.001	0.024	0.099	N.A.	N.A.	6.7E-07	
04H1077-G1m/04L1034-lam1	0.004	0.007	0.041	0.114	N.A.	N.A.	3.2E-07	
04H1077-G1m/04L1066-lam1	0.020	0.057	0.142	0.185	*6.9E-06	2.8E-07	4.8E-08	
04H1077-G1m/04L1067-lam1	0.012	0.041	0.131	0.192	N.A.	4.0E-07	7.6E-08	
04H1077-G1m/04L1068-lam1	0.005	0.018	0.080	0.165	N.A.	8.8E-07	1.5E-07	
04H1077-G1m/04L1086-lam1	0.010	0.031	0.106	0.181	N.A.	6.9E-07	1.1E-07	
04H1077-G1m/04L1305-k0MT	0.018	0.046	0.128	0.185	*6.5E-06	3.6E-07	5.6E-08	
04H1206-G1m/04L1086-lam1	0.010	0.029	0.103	0.179	N.A.	6.8E-07	1.2E-07	
04H1207-G1m/04L1086-lam1	0.013	0.047	0.137	0.196	N.A.	3.3E-07	5.9E-08	
04H1208-G1m/04L1086-lam1	0.005	0.030	0.108	0.170	N.A.	4.5E-07	7.4E-08	
04H1208-G1m/04L1407-k0MT	0.138	0.175	0.200	0.214	*4.3E-07	2.3E-08	6.2E-09	

N.A. Результаты прерываемо низко и не позволяют определить величину КД.

* Константу диссоциации КД (моль/л) рассчитывают по модели стационарного состояния

Значение «связывание с CTLA4 человека» в таблице указывает количество связываемого антигена CTLA4 человека на единицу количества антитела, когда применяют 1000 нМ CTLA4 человека при каждой из перечисленных концентраций АТФ, и «KD для CTLA4 человека (M)» означает константу диссоциации для CTLA4 человека при каждой концентрации АТФ. Значения KD, отмеченные в табл. 12 знаком «*», рассчитаны с использованием стационарной модели. Установлено, что все варианты, полученные с использованием 04H0150-G1m/04L0072-lam1 в качестве исходного антитела, обладают повышенным связыванием в присутствии АТФ по сравнению с 04H0150-G1m/04L0072-lam1. Кроме того, как 04H0150-G1m/04L0072-lam1, так и эти варианты проявляют повышенное связывание при концентрации АТФ 10 мкМ по сравнению с концентрацией 1 мкМ; связываемое количество при 100 мкМ еще выше, таким образом, показана зависимость связывания с CTLA4 человека от концентрации АТФ. С другой стороны, сравнение с MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT не показало такого зависимого от концентрации АТФ связывания с CTLA4 человека. Хотя 04H1077-G1m/04L1305-k0MT, в котором каркас легкой цепи 04H1077-G1m/04L1086-lam1 и константная область заменены к-цепью человека, обладают повышенным связыванием с CTLA4 человека в отсутствие АТФ в отличие от 04H1077-G1m/04L1086-lam1, зависящее от концентрации АТФ связывание также усиливалось. Эти результаты показали, что свойство связываться с CTLA4 человека АТФ-зависимым образом сохраняется, даже когда последовательность заменена последовательностью к-цепи человека. Среди разработанных в настоящем изобретении антител 04H1077-G1m/04L1066-lam1, 04H1077-G1m/04L1305-k0MT и 04H1207-G1m/04L1086-lam1 показывают почти такую же связывающую активность, что и существующее анти-CTLA4 антитело человека MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT в условиях, когда АТФ присутствует в количестве 100 мкМ, и 04H1208-G1m/04L1407-k0MT проявляет более сильную связывающую активность, чем MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT в условиях, когда АТФ присутствует в количестве 10 мкМ или более.

Затем среди антител, представленных в табл. 10, оценивают связывание 04H1077-G1m/04L1086-lam1 и 04H1208-G1m/04L1407-k0MT с CTLA4 мыши. Для сравнения получают ген тяжелой цепи антитела hUH02-G1d (SEQ ID NO: 212), содержащий переменную область тяжелой цепи hUH02 (SEQ ID NO: 156) антитела против CTLA4 мыши, и ген легкой цепи антитела hUL01-k0 (SEQ ID NO: 213), содержащие переменную область hUL01 легкой цепи (SEQ ID NO: 157), антитело экспрессируют, очищают и используют. Анализ проводят с использованием Biacore T200 в тех же

условиях, что и измерение связывания с CTLA4 человека, за исключением использования CTLA4 мыши в качестве образца (табл. 11). CTLA4 мыши получают следующим образом.

5 Ген внеклеточной области CTLA4 мыши, связанный с His-меткой (mCTLA4-His) (SEQ ID NO: 49), синтезирован и инсертирован в экспрессирующую плазмиду животного. Подготовленную плазмиду вводят методом липофекции в линию FreeStyle 293-F, полученную из клеток эмбриональной почки человека (фирма Invitrogen), которую высевают в колбу после суспендирования в экспрессионной среде FreeStyle 293 (фирма Invitrogen) при плотности клеток $1,33 \times 10^6$ клеток/мл. Поглощение 10 очищенного раствора антигена при 280 нм измеряют с помощью спектрофотометра. Из полученных значений измерений рассчитывают концентрацию очищенного антигена с использованием коэффициента экстинкции, рассчитанного методом PACE (*Protein Science*, 1995, 4, 2411-2423).

Таблица 11. Анализ связывания измененных антител с CTLA4 мыши

Антитело	Связывание с CTLA4 мыши				K _D для CTLA4 мыши	
	Без АТФ	АТФ 1 мкМ	АТФ 10 мкМ	АТФ 100 мкМ	АТФ 10 мкМ	АТФ 100 мкМ
hUH02-G1d/hUL01-k0	0,155	0,160	0,159	0,157	1,1E-07	1,1E-07
04H1077-G1m/04L1086-lam1	N.D.	0,001	0,024	0,093	4,1E-06	5,9E-07
04H1208-G1m/04L1407-k0MT	0,023	0,099	0,153	0,175	8,4E-08	1,6E-08

15

N.D. – слишком слабые показатели для определения связывания

Значение «связывание с CTLA4 мыши» в таблице означает количество связывания CTLA4 мыши на единицу количества антитела, когда CTLA4 мыши взаимодействует при концентрации 1000 нМ с каждой из концентраций АТФ, и «K_D для CTLA4 мыши (M)» означает константу диссоциации для CTLA4 мыши при каждой концентрации АТФ. Установлено, что hUH02-G1d/hUL01-k0 связывается с CTLA4 мыши в равной степени независимо от концентрации АТФ, тогда как 04H1077-G1m-04L1086-lam1 и 04H1208-G1m/04L1407-k0MT связываются с CTLA4 мыши в зависимости от концентрации АТФ. По сравнению со связыванием с CTLA4 человека, 20 показанной в табл. 10, способность связывания 4H1077-G1m-04L1086-lam1 с CTLA4 мыши примерно в 5 раз слабее по сравнению со способностью связываться с CTLA4 человека, а способность 04H1208-G1m/ 04L1407-k0MT связываться с CTLA4 мыши 25

примерно в два раза слабее по сравнению со способностью связываться с CTLA4 человека в присутствии 100 мкМ АТФ.

Пример 3-4. Создание контрольного анти-mCTLA4 антитела и переключающих анти-mCTLA4 антител

5 Создают контрольное анти-mCTLA4 антитело (hUH02-mFa55/hUL01-mk1, аббревиатура: mNS-mFa55) и анти-CTLA4 переключатели (04H1077-mFa55/04L1086-ml0r, аббревиатура: SW1077-mFa55; и 04H1208-mFa55/04L1407s-mk1, аббревиатура: SW1208-mFa55). В антителе mNS-mFa55 используют переменную область тяжелой цепи hUH02 (SEQ ID NO: 16) и переменную область легкой цепи hUL01 (SEQ ID NO: 10 17), а в качестве константных областей используют константную область тяжелой цепи мыши mFa55 (SEQ ID NO: 18) и константную область mk1 легкой цепи мыши дикого типа (SEQ ID NO: 19). Также используют константную область тяжелой цепи мыши, к которой добавлены изменения для усиления связывания с рецептором Fcγ. Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

15 В антителе SW1077-mFa55 используют переменную область тяжелой цепи 04H1077 (SEQ ID NO: 20) и переменную область легкой цепи 04L1086 (SEQ ID NO: 21), а в качестве константных областей используют константную область тяжелой цепи мыши mFa55 (SEQ ID NO: 18) и константную область легкой цепи мыши дикого типа ml0r (SEQ ID NO: 22). Также используют константную область тяжелой цепи мыши, к 20 которой добавлены изменения для усиления связывания с рецептором Fcγ. Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

В антителе SW1208-mFa55 используют переменную область тяжелой цепи 04H1208 (SEQ ID NO: 23) и переменную область легкой цепи 04L1407s (SEQ ID NO: 21), а в качестве константных областей используют константную область тяжелой цепи 25 мыши mFa55 (SEQ ID NO: 18) и константную область легкой цепи мыши дикого типа mk1 (SEQ ID NO: 19). Также используют константную область тяжелой цепи мыши, к которой добавлены изменения для усиления связывания с рецептором Fcγ. Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

30 Пример 3-6. Оценка нейтрализующей активности переключающего антитела CTLA4

Нейтрализующую активность переключающего анти-CTLA4 антитела (SW1077-mFa55), полученного в примере 3-4, оценивают методом конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA). В mCTLA4-Fc (SEQ ID NO: 25), в котором константная область человека связана с mCTLA4, разбавляют до концентрации 5

мкг/мл (55 нМ) 0,1 М NaHCO₃, 0,05% NaN₃ для приготовления раствора mCTLA4-Fc. По 100 мкл каждого приготовленного раствора mCTLA4-Fc добавляют в 96-луночный планшет, и планшет оставляют при 4°C в течение ночи для иммобилизации mCTLA4-Fc на поверхности планшета. После 3-кратной промывки TBS, 0,1% Tween 20, в

5 каждую лунку добавляют по 250 мкл раствора БСА, разбавленного до 2% TBS, для блокирования поверхности планшета. Затем планшет промывают 3 раза. mCD86-Fc-His (Sino Biologicals Inc. 50068-M03H, номер доступа NP_062261.3), в котором константная область человека и His-метка слиты с мышиним CD86, разведенным TBS до конечной концентрации 55 нМ, раствор антитела SW1077-mFa55, разбавленный до конечной

10 концентрации 6,25, 1,56, 0,390, 0,0977, 0,0061 и 0 мкг/мл, и раствор АТФ, разведенный до конечной концентрации 0, 1, 10 и 100 мкМ, каждый смешивают таким образом, чтобы получить в сумме 100 мкл, смесь добавляют в каждую лунку и планшет оставляют при 37°C на 1 ч. Каждую лунку затем промывают 3 раза TBS, 0,1% Tween 20, приготовленным так, чтобы он содержал ту же концентрацию АТФ, что и раствор,

15 добавленный в каждую лунку. Затем в каждую лунку добавляют 100 мкл анти-His-tag mAb-HRP-Direct (фирма MBL Life Sciences), разбавленного в 10000 раз блокирующим буфером таким образом, чтобы концентрация АТФ была такой же, как и в растворе, добавленном в каждую лунку, и планшет оставляют при 37°C на 1 ч. Каждую лунку затем промывают 3 раза TBS, 0,1% Tween 20, приготовленным так, чтобы он содержал

20 ту же концентрацию АТФ, что и раствор, добавленный в каждую лунку. В каждую лунку добавляют по 100 мкл раствора ТМБ и оставляют планшет при 37°C на 1 ч. В каждую лунку добавляют 50 мкл 1 М H₂SO₄, чтобы остановить реакцию, и определяют оптическую плотность при 450 нм с помощью считывающего устройства для микропланшетов (фирма Wako Sunrise).

25 Величина поглощения в лунках без антител при равной концентрации АТФ принимают за степень связывания mCTLA4-mCD86, равную 100%, и оценивают, насколько скорость связывания снижается при добавлении антител. Результаты представлены на фиг. 9.

30 Из полученных результатов следует, что нейтрализующая активность антитела SW1077 в отношении взаимодействия mCTLA4-mCD86 становится сильнее по мере увеличения концентрации АТФ в анализе. Эти результаты подтвердили, что антитело SW1077 обладает АТФ-зависимой нейтрализующей активностью.

Пример 3-7. Эффективность переключающего анти-CTLA4 антитела в мышинной модели с трансплантированными сингенными опухолевыми клетками, увеличение/уменьшение регуляторных Т-клеток (Treg) в опухоли и изменение маркера системного ответа в селезенке

5 Пример 3-7-1. Получение клеточной линии и мышинной модели с трансплантированной сингенной опухолевой линией

10 Используемые клетки являются клетками линии рака молочной железы мыши FM3A, приобретенными в фирме RIKEN. Клетки FM3A поддерживают и пассируют в среде RPMI 1640 (фирма Sigma), содержащей 10% бычьей сыворотки (фирма Thermo Fisher Scientific). Используют мышей C3H/HeN (7-недельный возраст, самки), приобретенных в фирме Charles River Laboratories, Япония. Клетки FM3A трансплантируют в живот мышам под кожу, и подтверждают, что модель приживается, когда объем трансплантированной опухоли достигает размера примерно от 150 мм³ до примерно 300 мм³.

15 Объем трансплантированной опухоли рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли = больший диаметр × меньший диаметр × меньший диаметр /2

Пример 3-7-2. Получение лекарственных средств для введения

20 Лекарственными средствами, которые вводят модели с трансплантированными клетками FM3A, являются контрольное антитело против мышинового CTLA4 (mNS-mFa55) и переключающее анти-CTLA4 антитело (SW1208-mFa55), полученные в примере 3-4. С использованием His-буфера (20 мМ His-HCl, 150 мМ NaCl, pH 6,0) готовят растворы mNS-mFa55 в концентрациях 0,0005 мг/мл, 0,005 мг/мл, 0,0125 мг/мл, 25 0,05 мг/мл, 0,5 мг/мл, 1,5 мг/мл и 5 мг/мл, а раствор SW1208-mFa55 готовят в концентрациях 0,005 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,5 мг/мл, 5 мг/мл и 25 мг/мл, соответственно.

Пример 3-7-3. Введение лекарственных средств для измерения противоопухолевого эффекта

30 На 9-й день после трансплантации мышам вводят mNS-mFa55 в дозах 0,01 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,25 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг, 30 мг/кг и 100 мг/кг, а SW1208-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг, 100 мг/кг и 500 мг/кг, соответственно.

Приготовленные растворы для введения вводят в дозе 20 мл/кг через хвостовую вену.

В табл. 12 подробно изложено лечение лекарственным средством при измерении противоопухолевого эффекта.

Таблица 12. Измерение противоопухолевого эффекта в модели трансплантированных клеток FM3A

Группа	Животных	Лекарство	Доза	Введение	Дата введения
1	4	His-буфер	-	В хвостовую вену	9й день после трансплантации
2	4	mNS-mF55	0,01 мг/кг	В хвостовую вену	9й день после трансплантации
3	4	mNS-mF55	0,1 мг/кг	В хвостовую вену	9й день после трансплантации
4	4	mNS-mF55	0,25 мг/кг	В хвостовую вену	9й день после трансплантации
5	4	mNS-mF55	1 мг/кг	В хвостовую вену	9й день после трансплантации
6	4	mNS-mF55	10 мг/кг	В хвостовую вену	9й день после трансплантации
7	4	mNS-mF55	30 мг/кг	В хвостовую вену	9й день после трансплантации
8	4	mNS-mF55	100 мг/кг	В хвостовую вену	9й день после трансплантации
9	4	SW1208-mFa55	0,1 мг/кг	В хвостовую вену	9й день после трансплантации
10	4	SW1208-mFa55	1 мг/кг	В хвостовую вену	9й день после трансплантации
11	4	SW1208-mFa55	10 мг/кг	В хвостовую вену	9й день после трансплантации
12	4	SW1208-mFa55	100 мг/кг	В хвостовую вену	9й день после трансплантации
13	4	SW1208-mFa55	500 мг/кг	В хвостовую вену	9й день после трансплантации

Пример 3-7-4. Оценка противоопухолевого эффекта

5 Противоопухолевый эффект оценивают по объему опухоли, рассчитанному по формуле, описанной в примере 3-7-1.

Значение скорости ингибирования роста опухоли (TGI – Tumor Growth Inhibition) рассчитывают по следующей формуле:

$$10 \quad TGI (\%) = (1 - (\text{Средний объем опухоли в исследуемой группе на момент измерения} - \text{Средний объем опухоли в исследуемой группе на момент первоначального введения}) / (\text{Средний объем опухоли в контрольной группе на момент измерения} - \text{средний объем опухоли в контрольной группе на момент первоначального введения})) \times 100$$

В результате эффективность препарата TGI = 60% и более на 13-й день после введения, что было установлено для mNS-mFa55 в дозах 0,1 мг/кг и более и для SW1208-mFa55 в дозах 1 мг/кг и более (фиг. 10 и 11).

Пример 3-7-5. Введение лекарственного средства для оценки клеток Treg в опухоли и подтверждения системных эффектов в селезенке

5 На 7й день после трансплантации через хвостовую вену вводят контрольное антитело против мышиноного CTLA4 (mNS-mFa55) в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг и 100 мг/кг, а переключающее анти-CTLA4 антитело (SW1208-mFa55) вводят через хвостовую вену в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг, 100 мг/кг и 500 мг/кг. В табл. 13 показаны подробности медикаментозного лечения для оценки клеток Treg в опухоли и подтверждения системных эффектов в селезенке.

Таблица 13. Проверка внутриопухолевых и системных эффектов в модели трансплантированных клеток FM3A (mNS-mFa55 и SW1208-mFa55)

Группа	Животных	Лекарство	Доза	Введение	Дата введения
1	4	His-буфер	-	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
2	4	mNS-mF55	0,01 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
3	4	mNS-mF55	0,1 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
4	4	mNS-mF55	0,25 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
5	4	mNS-mF55	1 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
6	4	SW1208-mFa55	10 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
7	4	SW1208-mFa55	30 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
8	4	SW1208-mFa55	100 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
9	4	SW1208-mFa55	0,1 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
10	4	SW1208-mFa55	1 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации

15 Пример 3-7-6. Резекция опухоли и селезенки у модельных мышей с трансплантированными клетками FM3A

На 6-й день после введения антител мышей подвергают эвтаназии под наркозом и проводят резекцию опухоли и селезенки. Из резецированной селезенки готовят клеточную суспензию с использованием среды RPMI-1640 (SIGMA), содержащей 10%

FBS (фирма SIGMA), и затем подвергают гемолизу с использованием набора для лизирования эритроцитов мыши (фирма R&D) для получения клеток селезенки. Резецированные опухоли измельчают с помощью набора Tumor Dissociation Kt, mouse (фирма Miltenyi). Как клетки селезенки, так и раздробленные опухоли реагируют со следующими антителами, и фракции присутствующих иммунных клеток анализируют с помощью FACS-анализа: анти-CD45 антитело (фирма BD, клон: 30-F11), анти-CD3 антитело (фирма BD, клон: 145-2C11), анти-CD4 антитело (фирма BD, клон: RM4-5), анти-FoxP3 антитело (фирма eBioscience, клон: FJK-16s), анти-ICOS антитело (фирма eBioscience, клон: 7E17G9), анти-KLRG1 антитело (фирма Biolegend, клон: 2F1/KLRG1). Анализ FACS выполняют с помощью проточного цитофлуориметра BD LSR Fortessa X-20 (фирма BD).

Пример 3-7-7. Оценка опухоли Treg в модели трансплантированных клеток FM3A

Оценивают изменения эффекторных клеток Treg ($CD4^+ FoxP3^+ KLRG1^+$) в опухоли после введения контрольного антитела против мышинового CTLA4 (mNS-mFa55) или переключающего антитела против CTLA4 (SW1208-mFa55). В результате как mNS-mFa55, так и SW1208-mFa55 снижают долю эффекторных клеток Treg до менее чем 0,2% CD45-положительных клеток в дозах 1 мг/кг и более (фиг. 12).

Пример 3-7-8. Оценка системных воздействий на селезенку в модели трансплантированных клеток FM3A

Изменения активированных хелперных Т-клеток ($CD4^+ Foxp3^- ICOS^+$) в селезенке после введения mNS-mFa55 или SW1208-mFa55 оценивают с помощью анализа FACS. В результате соотношение активированных хелперных Т-клеток к CD45-положительным клеткам в селезенке значительно увеличивается при введении mNS-mFa55, но не было значительного увеличения соотношения активированных хелперных Т-клеток к CD45-положительным клеткам в селезенке даже при увеличении дозы введения SW1208-mFa55 (фиг. 13). Было подтверждено, что хотя антитело-переключатель показывает такую же эффективность, как и контрольное антитело, оно не вызывает ответа в тканях, отличных от опухоли, и концепция проявления активности только локально в опухоли доказана *in vivo* в опытах на мышах.

Пример 4. Получение измененных антител CTLA4 и оценка их активности

Проводят дальнейшее изменение и оценку анти-CTLA4 переключающих антител, полученных в примере 3.

Пример 4-1. Усиление способности связывания с CTLA4 путем изменения усиления связывания с АТФ

По результатам структурного анализа, выполненного в примере 2-1, показано, что CDR2 тяжелой цепи антитела взаимодействует с фосфатной группой АМФ. Полагают, что когда маленькой молекулой является АТФ, γ -фосфатная группа может вызывать стерические затруднения для CDR2 тяжелой цепи. Затем аминокислоты в этой области заменяют для изучения повышения способности связывания с АТФ. В частности, 04Н1389-G1m/04L1086-lam1 и 04Н1382-G1m/04L1086-lam1 были получены путем введения изменений R53Q и G55H в переменные области тяжелой цепи 04Н1207-G1m/04L1086-lam1 и 04Н1208-G1m/04L1086-lam1, полученные в примере 3. Кроме того, 04Н1389-G1m/04L1305-k0MT получен путем замены легкой цепи 04Н1389-G1m/04L1086-lam1 последовательностью к-цепи человека. В табл. 14 перечислены SEQ ID NO переменных областей тяжелой цепи, переменных областей легкой цепи, константных областей тяжелой цепи, константных областей легкой цепи и гипервариабельных областей этих антител.

Таблица 14. Аминокислотные последовательности тяжелых цепей, легких цепей и их гипервариабельных областей (обозначены SEQ ID NO:)

Антитело	Вариабельная область		Константная область		Гипервариабельная область (HVR) (M)					
	Тяжелая цепь	Легкая цепь	Тяжелая цепь	Легкая цепь	H1	H2	H3	L1	L2	L3
04Н1389-G1m/04L1086-lam1	136	97	82	87	107	110	102	122	117	133
04Н1382-G1m/04L1086-lam1	135	97	82	87	107	109	102	122	117	133
04Н1389-G1m/04L1305-k0MT	136	95	82	96	107	110	102	122	117	133

Вiascore T200 используют для оценки связывания полученных вариантов с АТФ и с CTLA4 человека. Анализ связывания с АТФ проводят при 37°C с использованием 20 мМ ACES (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, 0,05% Tween20 в качестве подвижного буфера. Во-первых, Sure Protein A (фирма GE Healthcare) иммобилизуют на сенсорном чипе CM3 серии S (фирма GE Healthcare), и антитела захватываются чипом путем взаимодействия с раствором антител, приготовленным в подвижном буфере. Далее способность связывания с антителом оценивают путем взаимодействия с раствором АТФ, приготовленным в подвижном буфере. Чипы регенерируют с помощью 25 мМ NaOH и 10 мМ глицин-HCl (pH 1,5) и проводят анализ путем повторного захвата антител. Для связывания количества каждого антитела с АТФ рассчитывают

связываемое количество АТФ на единицу количества антитела путем корректировки количества связывания, когда АТФ вводят в концентрации 100 нМ с количеством антитела, захваченного на поверхности чипа. Связывание с СТЛА4 человека измеряют с использованием Biacore T200 по методу, описанному в примере 3-3. В табл. 15

5 показаны результаты этих измерений.

Таблица 15. Анализ связывания с АТФ и СТЛА4 человека

Антитело	Связывание с АТФ	Связывание с СТЛА4 человека				K _D для СТЛА4 человека (M)		
		Без АТФ	АТФ 1 мкМ	АТФ 10 мкМ	АТФ 100 мкМ	Без АТФ	АТФ 10 мкМ	АТФ 100 мкМ
04H1207-G1m/04L1086-lam1	0.00013	0.010	0.037	0.111	0.166	N.A.	4.0E-07	7.6E-08
04H1208-G1m/04L1086-lam1	0.00018	0.003	0.022	0.084	0.139	N.A.	5.1E-07	9.1E-08
04H1389-G1m/04L1086-lam1	0.00243	0.022	0.138	0.189	0.193	*5.1E-06	4.3E-08	2.1E-08
04H1382-G1m/04L1086-lam1	0.00204	0.008	0.090	0.152	0.159	N.A.	4.6E-08	1.4E-08
04H1389-G1m/04L1305-k0MT	0.00190	0.030	0.120	0.154	0.151	*3.2E-06	1.9E-08	5.4E-09

N.A. – чрезвычайно малая величина для определения K_D

* – Величину K_D определяют по стационарной модели

Антитела 04Н1389-G1m/04L1086-lam1 и 04Н1382-G1m/04L1086-lam1 обладают повышенной связывающей способностью с АТФ по сравнению с родительскими антителами 04Н1207-G1m/04L1086-lam1 и 04Н1208-G1m/04L1086-lam1, для которых не интродуцировали R53Q/G55H. Связывающая способность 04Н1389-G1m/04L1086-lam1 и 04Н1382-G1m/04L1086-lam1 с CTLA4 человека повышается примерно в 10 раз в присутствии 10 мкМ АТФ по сравнению с исходными антителами 04Н1207-G1m/04L1086-lam1 и 04Н1208-G1m/04L1086-lam1, для которых R53Q/G55H не был интродуцирован. Сравнение связываемого количества показывает, что способность связываться с CTLA4 человека при более низких концентрациях АТФ повышалась. Также было показано, что 04Н1389-G1m/04L1305-k0MT, в котором легкая цепь 04Н1389-G1m/04L1086-lam1 заменена последовательностью к-цепи человека, обладает эквивалентной АТФ-связывающей способностью и АТФ-зависимой способностью связывать CTLA4 человека как и 04Н1389-G1m/04L1086-lam1.

Пример 4-2. Получение контрольного антитела против CTLA4 человека и анти-CTLA4 переключающего антитела, а также оценка их связывающей способности

Были созданы контрольное антитело против CTLA4 человека (MDX10D1H-mFa55/MDX10D1L-mk1, аббревиатура: hNS-mFa55) и антитело-переключатель против CTLA4 (04Н1389-mFa55/04L1305-mk1, аббревиатура: SW1389-mFa55). В антителе hNS-mFa55 используют переменную область тяжелой цепи MDX10D1H (SEQ ID NO: 26) и переменную область легкой цепи MDX10D1L (SEQ ID NO: 27), а в качестве константных областей используют константную область тяжелой цепи мыши mFa55 (SEQ ID NO: 18) и константную область mk1 легкой цепи мыши дикого типа (SEQ ID NO: 19). Также используют константную область тяжелой цепи мыши, к которой добавлены изменения для усиления связывания с рецептором Fcγ. Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

В антителе SW1389-mFa55 используют переменную область тяжелой цепи 04Н1389 (SEQ ID NO: 29) и переменную область легкой цепи 04L1305 (SEQ ID NO: 30), а в качестве константных областей используют константную область тяжелой цепи мыши mFa55 (SEQ ID NO: 18) и константную область mk1 легкой цепи мыши дикого типа (SEQ ID NO: 19). Также используют константную область тяжелой цепи мыши, к которой добавлены изменения для усиления связывания с рецептором Fcγ. Антитело экспрессировали и очищали способом, известным специалистам в данной области.

Оценивали связывание разработанных hNS-mFa55 и SW1389-mFa55 с CTLA4 человека. В качестве подвижного буфера используют 20 мМ ACES (pH 7,4), 150 мМ

NaCl, 2 mM MgCl₂, 0,05% Tween 20 с добавлением АТФ до требуемых концентраций, анализ проводят при 37°C. Сначала кроличьи анти-мышинные IgG (фирма Thermo Fisher Scientific) иммобилизуют на сенсорных чипах серии S CM5 (фирма GE Healthcare), и антитело захватывается чипом путем взаимодействия с раствором антител, 5
приготовленным в подвижном буфере, не содержащим АТФ. Затем связывающую способность антитела к CTLA4 человека в присутствии или в отсутствие АТФ оценивают путем взаимодействия с раствором CTLA4 человека, приготовленным в подвижном буфере с добавлением АТФ до нужной концентрации, или раствором CTLA4 человека, приготовленным в подвижном буфере, не содержащим АТФ. Чипы 10
регенерируют с помощью 25 mM NaOH и 10 mM глицин-HCl (pH 1,5) и проводят анализ путем повторного захвата антител. Константу диссоциации каждого антитела к CTLA4 рассчитывают с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software 2.0. В частности, константу скорости связывания k_a (л/моль/с) и константу скорости диссоциации k_d (1/с) рассчитывают путем глобальной подгонки 15
сенсорограмм, полученных при измерении с использованием модели связывания Ленгмюра 1:1, а константу диссоциации K_D (моль/л) рассчитывают по этим значениям. В табл. 16 показаны результаты этих анализов.

Таблица 16. Анализ связывания вариантов с константными областями мыши с CTLA4 человека

Антитело	K_D для CTLA4 человека (M)		
	АТФ 1 мкМ	АТФ 10 мкМ	АТФ 100 мкМ
MDX10D1H-mFa55/MDx10D1L-mk1	3,2E-08	3,8E-08	3,6E-08
04H1389-mFa55/04L1305-mk1	5,1E-08	1,8E-08	8,9E-09

20
Было подтверждено, что оба антитела, полученные с использованием константных областей мыши, связываются с CTLA4 человека. Также было показано, что SW1389-mFa55 связывается с CTLA4 человека АТФ-зависимым образом, аналогично 04H1389-G1m/04L1305-k0MT, полученному с использованием той же 25
вариабельной области и константной области человека, показанных в табл. 15.

Пример 4-3. Эффективность каждого анти-CTLA4 переключающего антитела и анти-CTLA4 непереклюющего антитела в сингенной модели с трансплантацией опухолевых клеток с использованием нокаута CTLA4 человека, трансгенной мыши CD3 человека, увеличения/уменьшения клеток Treg в опухоли и изменения в маркере системного ответа в селезенке

Пример 4-3-1. Клеточная линия

Используют клетки Нера1-6/hGPC3. Эту клеточную линию получают путем приобретения линии клеток рака печени мыши Нера1-6 в коллекции ATCC, которые конститутивно экспрессируют ген Glypican 3 человека (hGPC3, SEQ ID NO: 181) путем трансфекции и осуществления клонирования. Клетки Нера1-6/hGPC3 поддерживают и пассируют в среде D-MEM (с высоким содержанием глюкозы) (фирма SIGMA), содержащей 10% FBS (фирма SIGMA) и 600 мкг/мл GENETICIN (фирма Gibco).

Пример 4-3-2. Подготовка модели мыши с трансплантированной сингенной опухолевой линией

Применяют CTLA4 KI человека, CD3 человека EDG-замещенную мышь (hCTLA4 KI hCD3 EDG-замещенная мышь), которая является гибридом мыши с нокаутом CTLA4 человека (*Blood*, 2005, 106(9): 3127-3133), и мыши, полученной авторами настоящего изобретения, с заменой CD3 EDG человека (*Sci Rep*, 2017, 7: 45839). Клетки Нера1-6/hGPC3 трансплантируют подкожно мышам с заменой hCTLA4 KI hCD3 EDG, и было определено, что модель приживается, когда средний объем трансплантированных опухолей достигает приблизительно от 200 мм³ до приблизительно 400 мм³.

Объем трансплантированной опухоли рассчитывают по формуле:

Объем опухоли = больший диаметр × меньший диаметр × меньший диаметр / 2

Пример 4-3-3. Получение лекарственных средств для введения

В качестве лекарственных средств для введения модели с трансплантированными клетками Нера1-6/hGPC3 получают анти-CTLA4 переключающее антитело (SW1389-mFa55) и контрольное антитело против CTLA4 человека (hNS-mFa55), полученные в примере 4-2, в концентрациях 0,01, 0,1, 1, 5, 10 и 20 мг/мл и 0,01, 0,1, 1 и 3 мг/мл, соответственно, с использованием His-буфера (150 mM NaCl/20 mM His-HCl-буфера, pH 6.0).

Пример 4-3-4. Введение лекарственного средства для измерения противоопухолевого эффекта

На 7-й день после трансплантации мышам вводят SW1389-mFa55 в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг и 100 мг/кг, и hNS-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг через хвостовую вену. В табл. 17 показаны подробности лечения лекарственным средством при измерении противоопухолевого эффекта.

Таблица 17. Измерение противоопухолевого эффекта в модели трансплантированных клеток Нера1-6/hGPC3

Группа	Животных	Лекарство	Доза	Введение	Дата введения
1	4	His-буфер	-	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
2	4	hNS-mF55	0,1 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
3	4	hNS-mF55	1 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
4	4	hNS-mF55	10 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
5	4	hNS-mF55	30 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
6	4	SW1389-mFa55	0,1 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
7	4	SW1389-mFa55	1 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
8	4	SW1389-mFa55	10 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
9	4	SW1389-mFa55	100 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации

10 Пример 4-3-5. Оценка противоопухолевого эффекта

Противоопухолевый эффект оценивают по объему опухоли, рассчитанному по формуле, описанной в примере 4-3-2. JMP 11.2.1 (фирма SAS Institute Inc.) используют для статистического анализа.

15 Ингибирование роста опухоли (TGI – tumor growth inhibition) рассчитывают по формуле:

$$\text{TGI (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Средний объем опухоли в исследуемой группе на момент измерения} - \text{Средний объем опухоли в исследуемой группе перед введением антитела}}{\text{Средний объем опухоли в контрольной группе на момент измерения} - \text{Средний объем опухоли в контрольной группе перед введением антитела}} \right) \times 100$$

20

В результате как hNS-mFa55, так и SW1389-mFa55 показали эффективность препарата TGI = 60% и более на 18-й день после введения в дозах 1 мг/кг или более (фиг. 14 и 15).

5 Пример 4-3-6. Введение лекарственного средства для оценки клеток Treg в опухоли и подтверждения системных эффектов в селезенке

10 На 7-й день после трансплантации SW1389-mFa55 вводят мышам в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг, 100 мг/кг и 500 мг/кг через хвостовую вену, а hNS-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг через хвостовую вену. В табл. 18 показаны подробности применения лекарственных средств для оценки клеток Treg в опухоли и подтверждения системных эффектов в селезенке.

Таблица 18. Проверка внутриопухолевых и системных эффектов в модели трансплантированных клеток Нера1-6/hGPC3 (hNS-mFa55 и SW1389-mFa55)

Группа	Животных	Лекарство	Доза	Введение	Дата введения
1	3	His-буфер	-	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
2	3	hNS-mF55	0,1 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
3	3	hNS-mF55	1 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
4	3	hNS-mF55	10 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
5	3	hNS-mF55	30 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
6	3	SW1389-mFa55	0,1 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
7	3	SW1389-mFa55	1 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
8	3	SW1389-mFa55	10 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
9	3	SW1389-mFa55	100 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации
10	3	SW1389-mFa55	500 мг/кг	В хвостовую вену	7й день после трансплантации

15 Пример 4-3-7. Резекция опухоли и селезенки у модельных мышей с трансплантированными клетками Нера1-6/hGPC3

На 6-й день после введения антител мышей подвергают эвтаназии под наркозом, и проводят резекцию опухоли и селезенки. Из полученных селезенок готовят клеточную суспензию с использованием среды RPMI-1640 (фирма SIGMA),

содержащей 10% FBS (фирма SIGMA), и затем подвергают гемолизу с использованием набора для лизирования эритроцитов мыши (фирма R&D) для получения клеток селезенки. Полученные опухоли измельчают с помощью набора Tumor Dissociation Kit, mouse (фирма Miltenyi). Как клетки селезенки, так и раздробленные опухоли реагируют со следующими антителами, и фракции присутствующих иммунных клеток анализируют с помощью FACS-анализа: анти-CD45 антитело (фирма BD, клон: 30-F11), анти-CD3 антитело (фирма BD, клон: UCHT1), анти-CD4 антитело (фирма BD, клон: RM4-5), анти-FoxP3 антитело (фирма eBioscience, клон: FJK-16s), анти-ICOS антитело (фирма eBioscience, клон: 7E17G9), анти-CCR7 антитело (фирма Biolegend, клон: 4B12). Анализ FACS выполняют с помощью проточного цитофлуориметра BD LSR Fortessa X-20 (фирма BD).

Пример 4-3-8. Оценка опухоли Treg в модели трансплантированных клеток Hepa1-6/hGPC3

Оценивают изменения эффекторных клеток Treg ($CD4^+ FoxP3^+ CCR7^{low} KLRG1^+$) в опухоли после введения SW1389-mFa55 или hNS-mFa55. В результате как hNS-mFa55, так и SW1389-mFa55 снижают долю эффекторных клеток Treg до менее чем 0,2% CD45-позитивных клеток в дозах 1 мг/кг и более (фиг. 16).

Пример 4-3-9. Оценка системного эффекта в селезенке в модели трансплантированных клеток Hepa1-6/hGPC3

Изменения активированных хелперных Т-клеток ($CD4^+ Foxp3^- ICOS^+$) в селезенке после введения hNS-mFa55 или SW1389-mFa55 оценивают методом FACS. В результате соотношение активированных хелперных Т-клеток к CD45-положительным клеткам в селезенке значительно увеличивается при введении hNS-mFa55, но не наблюдалось значительного увеличения активированных хелперных Т-клеток в селезенке при введении SW1389-mFa55, даже при увеличении дозы введения (фиг. 17). Это подтверждает, что переключающее антитело проявляет такую же эффективность, как и контрольное антитело, но не вызывает ответа в тканях, отличных от опухолевых. Таким образом, концепция проявления активности только локально в опухоли доказана *in vivo* на мышах с CTLA4 KI человека.

Пример 4-4. Получение контрольного анти-CTLA4 антитела и переключающего анти-CTLA4 антитела для теста на токсичность у яванских макак

Получают контрольное анти-CTLA4 антитело (MDX10D1H-Kn125/MDX10D1L-k0MT//MDX10D1H-H1076/MDX10D1L-k0MT, аббревиатура: NS-ART1) и переключающее анти-CTLA4 антитело (04H1389-Kn125/04L1305-k0MT//04H1389-

Н1076)/04L1305-k0MT, аббревиатура: SW1389-ART1). В антителе NS-ART1 используют переменную область тяжелой цепи MDX10D1H (SEQ ID NO: 26) и переменную область легкой цепи MDX10D1L (SEQ ID NO: 27), а в качестве константных областей используют константную область тяжелой цепи человека Kп125 (SEQ ID NO: 31) и константную область тяжелой цепи человека Н1076 (SEQ ID NO: 32), описанную в предшествующей патентной литературе WO 2013/002362, и константную область легкой цепи человека k0MT (SEQ ID NO: 33). Также используют константную область тяжелой цепи человека, к которой добавлены изменения для усиления связывания с рецептором Fcγ. Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

В антителе SW1389-ART1 используют переменную область тяжелой цепи 04Н1389 (SEQ ID NO: 29) и переменную область легкой цепи 04L1305 (SEQ ID NO: 30), а в качестве константных областей используют константную область тяжелой цепи человека Kп125 (SEQ ID NO: 31), константную область тяжелой цепи человека Н1076 (SEQ ID NO: 32) и константную область легкой цепи человека k0MT (SEQ ID NO: 33). Также используют константную область тяжелой цепи человека, к которой добавлены изменения для усиления связывания с рецептором Fcγ. Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

Гетеродимеризованные антитела (антитела, содержащие два разных полипептида тяжелой цепи и/или два разных полипептида легкой цепи) в настоящем изобретении обозначают последующему правилу: (первая переменная область тяжелой цепи) - (первая константная область тяжелой цепи)/(первая переменная область легкой цепи) -(первая константная область легкой цепи)/(вторая переменная область тяжелой цепи)-(вторая константная область тяжелой цепи)/(вторая переменная область легкой цепи)-(вторая константная область легкой цепи). Например, если название антитела 04Н1389-Kп125/04L1305-k0MT//04Н1389-Н1076/04L1305-k0MT, это означает, что в этом антителе первая переменная область тяжелой цепи — 04Н1389, первая константная область тяжелой цепи — Kп125, первая переменная область легкой цепи представляет собой 04L1305, первая константная область легкой цепи представляет собой k0MT, вторая переменная область тяжелой цепи представляет собой 04Н1389, вторая константная область тяжелой цепи представляет собой Н1076, вторая переменная область легкой цепи представляет собой 04L1305, а вторая константная область легкой цепи представляет собой область k0MT.

Пример 4-5. Проведение теста на токсичность у яванского макака

Для оценки и сравнения токсичности, включая системный ответ, антитело NS-ART1 или антитело SW1389-ART1, приготовленные в примере 4-4, вводят самцам яванских макаков (по 3 особи) в дозе 60 мг/кг один раз в неделю в общей сложности 5 раз. Введение осуществляют медленно внутривенно с помощью шприцевого насоса, и проводят наблюдение за общим состоянием, измеряют массу тела, проводят биохимический анализ крови/крови, исследуют костный мозг, проводят патологическое исследование и измеряют концентрации лекарственного средства в плазме.

Появление антител к лекарственному средству наблюдают в течение периода введения обоих антител, но экспозицию сохраняют до конца периода введения.

Введение антитела NS-ART1 приводит к изменениям, подобным системным аутоиммунным заболеваниям, таким как появление аутоантител, воспалительные изменения (васкулит, воспалительная клеточная инфильтрация), анемические изменения и активация Т-клеток, в то время как вышеуказанные изменения не наблюдались при введении антитела SW1389-ART1. Эти результаты показывают, что антитело SW1389-ART1 обладает пониженной токсичностью *in vivo*.

Пример 5. Получение измененных антител CTLA4 и оценка их активности

Осуществляют дальнейшее изменение и оценку переключающих антител против CTLA4, полученных в примере 4.

20 Пример 5-1. Оптимизация антител путем внесения комплексных изменений и замены каркасов

Изменения аминокислот целенаправленно вводят в CDR 04H1389-G1m/04L1086-lam1 и исследуют изменения с улучшенными профилями. Целенаправленное введение и оценку аминокислотных изменений проводят с использованием метода, описанного в примере 3-3. Созданы варианты, в которые введена комбинация обнаруженных в настоящем изобретении изменений и заменены каркасы. В табл. 19 перечислены SEQ ID NO переменных областей тяжелой цепи, переменных областей легкой цепи, константных областей тяжелой цепи, константных областей легкой цепи и гипервариабельных областей этих антител. Легкие цепи 04L1594-lam1, 04L1581-lam1, 04L1610-lam1, 04L1612-lam1 и 04L1610-lam1 в табл. 19 интродуцированы с изменениями в CDR и каркасах по сравнению с легкой цепью родительского антитела 04L1086-lam1, и имеют каркасы и константную область последовательностей зародышевой линии λ -цепи человека. Кроме того, 04L1615-k0MT, 04L1616-k0MT и 04L1617-k0MT имеют изменения, интродуцированные в CDR 04L1086-lam1, и имеют

каркас и константную область последовательностей зародышевой линии к-цепи человека. Вариабельная область тяжелой цепи 04H1389v373 интродуцирована с изменениями в CDR вариабельной области тяжелой цепи 04H1389 исходного антитела. Вариабельные области тяжелой цепи 04H1637, 04H1643, 04H1654, 04H1656, 04H1642 и 04H1735 имеют изменения, интродуцированные в CDR 04H1389, а также замены каркасных последовательностей на последовательности другой зародышевой линии.

Таблица 19. Аминокислотные последовательности тяжелых цепей, легких цепей и их гипервариабельных областей (обозначены SEQ ID NO:)

Антитело	Вариабельная область		Константная область		Гипервариабельная область (HVR) (M)					
	Тяжелая цепь	Легкая цепь	Тяжелая цепь	Легкая цепь	H1	H2	H3	L1	L2	L3
04H1389v373-G1m/04L1086-lam1	137	97	82	87	107	111	102	122	117	133
04H1637-G1m/04L1086-lam1	138	97	82	87	107	111	102	122	117	133
04H1637-G1m/04L1594-lam1	138	144	82	87	107	111	102	124	125	133
04H1637-G1m/04L1581-lam1	138	145	82	87	107	111	102	126	127	133
04H1637-G1m/04L1610-lam1	138	146	82	87	107	111	102	128	117	133
04H1643-G1m/04L1610-lam1	139	146	82	87	107	111	102	128	117	133
04H1654-G1m/04L1610-lam1	140	146	82	87	107	112	102	128	117	133
04H1656-G1m/04L1610-lam1	141	146	82	87	107	111	152	128	117	133
04H1654-G1m/04L1612-lam1	140	147	82	87	107	112	102	129	117	133
04H1656-G1m/04L1612-lam1	141	147	82	87	107	111	152	129	117	133
04H1654-G1m/04L1606-lam1	140	148	82	87	107	112	102	124	117	133
04H1656-G1m/04L1606-lam1	141	148	82	87	107	111	152	124	117	133
04H1389-G1m/04L1615-kOMT	136	149	82	96	107	110	102	130	117	133

10

Активность связывания созданных вариантов с CTLA4 человека оценивают методом, описанным в примере 3-3 (табл. 20).

Таблица 20. Анализ связывания с CTLA4 человека

Антитело	K _D для CTLA4 человека (M)		
	Без АТФ	АТФ 1 мкМ	АТФ 10 мкМ
MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT	4.8E-08	5.0E-08	4.9E-08
04H1389-G1m/04L1086-lam1	* 5.7E-06	1.8E-07	3.7E-08
04H1389v373-G1m/04L1086-lam1	* 5.3E-06	1.4E-07	2.8E-08
04H1637-G1m/04L1086-lam1	* 5.3E-06	1.6E-07	3.0E-08
04H1637-G1m/04L1594-lam1	* 4.3E-06	1.4E-07	2.8E-08
04H1637-G1m/04L1581-lam1	* 3.2E-06	8.9E-08	1.7E-08
04H1637-G1m/04L1610-lam1	* 3.3E-06	1.0E-07	1.8E-08
04H1643-G1m/04L1610-lam1	* 2.8E-06	8.9E-08	1.4E-08
04H1654-G1m/04L1610-lam1	* 5.3E-06	1.2E-07	1.9E-08
04H1656-G1m/04L1610-lam1	* 2.2E-06	9.8E-08	1.9E-08
04H1654-G1m/04L1612-lam1	* 4.8E-06	2.0E-07	3.3E-08
04H1656-G1m/04L1612-lam1	* 7.6E-06	1.6E-07	3.2E-08
04H1654-G1m/04L1606-lam1	* 6.8E-06	1.4E-07	2.5E-08
04H1656-G1m/04L1606-lam1	* 2.3E-06	9.5E-08	1.9E-08
04H1389-G1m/04L1305-k0MT	* 2.4E-06	8.2E-08	1.5E-08
04H1389-G1m/04L1615-k0MT	* 2.0E-06	7.2E-08	1.5E-08

* Величину K_D определяют по стационарной модели

Значения K_D в таблице, отмеченные «*», рассчитаны с использованием стационарной модели. Показано, что все варианты, полученные с использованием 04H1389-G1m/04L1086-lam1 в качестве исходного антитела, связываются с CTLA4 человека АТФ-зависимым образом и обладают более сильной связывающей способностью, чем исходное антитело с K_D $3,7 \times 10^{-8}$ М в условиях, когда АТФ присутствует в количестве 10 мкМ. Показано, что все эти антитела обладают более сильной связывающей способностью, чем существующее антитело против CTLA4 человека MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT в условиях, когда АТФ присутствует в количестве 10 мкМ.

Способность связывать полученных вариантов с CTLA4 человека в присутствии АДФ или АМФ оценивают с помощью Biacore T200 и сравнивают со способностью связываться в присутствии АТФ. Способность к связыванию с CTLA4 человека в присутствии АДФ или АМФ измеряют с использованием метода, описанного в примере

3-3, как и при оценке связывающей способности в присутствии АТФ, но с использованием АДФ или АМФ вместо АТФ (табл. 21).

Таблица 21. Оценка зависимости от АТФ, АДФ и АМФ

Антителo	Кинетические параметры для СГЛА4 человека .											
	АТФ 10 мкМ				АДФ 10 мкМ				АМФ 10 мкМ			
	$K_a(M^{-1} \cdot \text{сек}^{-1})$	$k_D(\text{сек}^{-1})$	$K_D(M)$		$K_a(M^{-1} \cdot \text{сек}^{-1})$	$k_D(\text{сек}^{-1})$	$K_D(M)$		$K_a(M^{-1} \cdot \text{сек}^{-1})$	$k_D(\text{сек}^{-1})$	$K_D(M)$	
MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-kOMT	2.9E+05	1.3E-02	4.6E-08		3.6E+05	1.3E-02	3.6E-08		3.4E+05	1.3E-02	3.9E-08	
04H1389-G1m/04L1086-lam1	1.0E+05	3.2E-03	3.2E-08		1.4E+05	6.1E-03	4.4E-08		1.4E+05	1.8E-02	1.3E-07	
04H1637-G1m/04L1610-lam1	1.2E+05	1.9E-03	1.5E-08		1.6E+05	3.5E-03	2.2E-08		1.5E+05	1.0E-02	7.0E-08	
04H1654-G1m/04L1610-lam1	7.1E+04	1.4E-03	1.9E-08		8.8E+04	2.8E-03	3.2E-08		8.9E+04	8.9E-03	1.0E-07	
04H1656-G1m/04L1610-lam1	1.3E+05	1.9E-03	1.5E-08		1.7E+05	4.3E-03	2.5E-08		1.7E+05	1.4E-02	8.2E-08	
04H1654-G1m/04L1612-lam1	7.4E+04	2.7E-03	3.6E-08		8.9E+04	5.0E-03	5.6E-08		9.4E+04	1.6E-02	1.7E-07	
04H1656-G1m/04L1612-lam1	1.1E+05	2.9E-03	2.6E-08		1.5E+05	6.4E-03	4.2E-08		1.5E+05	2.0E-02	1.3E-07	
04H1654-G1m/04L1606-lam1	6.5E+04	1.3E-03	2.1E-08		8.0E+04	2.8E-03	3.5E-08		8.1E+04	9.0E-03	1.1E-07	
04H1656-G1m/04L1606-lam1	1.2E+05	2.2E-03	1.9E-08		1.6E+05	4.8E-03	3.0E-08		1.6E+05	1.6E-02	1.0E-07	
04H1389-G1m/04L1305-kOMT	1.1E+05	1.9E-03	1.7E-08		1.6E+05	3.8E-03	2.5E-08		1.5E+05	1.2E-02	7.9E-08	
04H1389-G1m/04L1615-kOMT	1.3E+05	1.5E-03	1.1E-08		1.8E+05	3.0E-03	1.7E-08		1.7E+05	9.7E-03	5.5E-08	

Существующее антитело к CTLA4 человека MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT показывает сходные кинетические параметры независимо от типа и присутствия малых молекул, тогда как все АТФ-зависимые антитела к CTLA4 связываются с CTLA4 человека не только в присутствии АТФ, но и в присутствии АДФ или АМФ, и связывающая способность в присутствии этих малых молекул была выше, чем связывающая способность в отсутствие малых молекул, показанная в табл. 20. Таким образом, было показано, что эти антитела представляют собой антитела, которые связываются с CTLA4 АТФ-, АДФ- и АМФ-зависимым образом. Эти антитела имеют самую высокую связывающую способность в присутствии АТФ, за которой следует самая высокая связывающая способность в присутствии АДФ и самая низкая связывающая способность в присутствии АМФ. Во всех случаях связывающая способность в присутствии АДФ была примерно в 3 раза сильнее, чем связывающая способность в присутствии АМФ, а связывающая способность в присутствии АТФ была примерно в 5 раз сильнее, чем связывающая способность в присутствии АМФ. Величина k_a одинакова в присутствии любой из малых молекул, но есть разница в величине k_d . Поскольку диссоциация в присутствии АДФ происходит быстрее, чем в присутствии АТФ, а дальнейшая диссоциация в присутствии АМФ происходит быстрее, чем в присутствии АДФ, показано, что разница в величине KD в зависимости от типа малой молекулы связана с разницей в скорости диссоциации.

Затем оценивают связывающую способность некоторых вариантов с CTLA4 мыши и CTLA4 яванского макака. Активность связывания с CTLA4 человека, CTLA4 мыши и CTLA4 яванского макака оценивают с использованием Biacore T200 по методу, описанному в примере 3-3 (табл. 22). CTLA4 яванского макака получали следующим способом.

Ген CyCTLA4-His-VAP (SEQ ID NO: 50), представляющий собой слияние His-метки и VAP-метки на С-конце внеклеточной области CTLA4 яванского макака, был синтезирован и инсертирован в плазмиду экспрессии животных. Полученную плазмиду вводят методом липофекции в линию клеток FreeStyle 293-F, полученную из клеток эмбриональной почки человека (фирма Invitrogen), эти клетки высевают в колбу после суспендирования в среду для экспрессии FreeStyle 293 (фирма Invitrogen) при плотности клеток $1,33 \times 10^6$ клеток/мл. Через три часа после трансфекции плазмиды добавляют биотин до конечной концентрации 100 мкМ, клетки культивируют в CO₂-инкубаторе (37°C, 8% CO₂, 125 об/мин) в течение 4 сут и антиген очищают методом, известным специалистам в данной области, из культурального супернатанта каждого

образца. Поглощение растворов очищенного антигена при 280 нм измеряют с помощью спектрофотометра. Из полученных измеренных значений рассчитывают концентрацию очищенного антигена с использованием коэффициента экстинкции, рассчитанного методом PACE (*Protein Science*, 1995, 4, 2411-2423).

Таблица 22. Анализ связывания с СТЛА4 человека, мыши, макаки крабода

	К _D для СТЛА4 человека (М)			К _D для СТЛА4 мыши (М)			К _D для СТЛА4 обезьяны (М)		
	АТФ 1 мкМ	АТФ 10 мкМ	АТФ 100 мкМ	АТФ 1 мкМ	АТФ 10 мкМ	АТФ 100 мкМ	АТФ 1 мкМ	АТФ 10 мкМ	АТФ 100 мкМ
Антитело									
MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-kOMT	4.7E-08	5.3E-08	5.4E-08	N.T.	N.T.	N.T.	1.6E-07	1.2E-07	1.2E-07
04H1389-G1m/04L1305-kOMT	7.2E-08	1.4E-08	4.6E-09	2.1E-07	3.2E-08	1.2E-08	1.4E-07	2.6E-08	1.2E-08
04H1654-G1m/04L1610-lam1	1.1E-07	1.5E-08	4.4E-09	1.8E-07	2.7E-08	1.0E-08	1.8E-07	2.8E-08	8.1E-09
04H1656-G1m/04L1610-lam1	7.9E-08	1.6E-08	6.2E-09	2.3E-07	3.7E-08	1.4E-08	1.2E-07	2.6E-08	1.0E-08
04H1654-G1m/04L1612-lam1	1.7E-07	3.0E-08	1.1E-08	3.9E-07	4.8E-08	1.8E-08	3.1E-07	5.4E-08	2.1E-08
04H1656-G1m/04L1612-lam1	9.5E-08	2.5E-08	7.8E-09	3.2E-07	5.4E-08	2.1E-08	1.6E-07	4.1E-08	1.6E-08
04H1389-G1m/04L1615-kOMT	5.8E-08	1.2E-08	5.0E-09	1.6E-07	2.6E-08	1.0E-08	1.1E-07	2.1E-08	9.3E-09

N.T. – Не исследовали

Установлено, что все шесть изученных зависимых от малых молекул антител CTLA4 связываются не только с CTLA4 человека, но также с CTLA4 мыши и с CTLA4 яванского макака АТФ-зависимым образом.

Пример 5-2. Получение измененных анти-CTLA4 переключающих антител и антитела отрицательного контроля

Получают измененные анти-CTLA4 переключающие антитела (04H1654-mFa55m2P1/04L1610-ml0r//04H1656-mFa55m2N1/04L1610-ml0r, аббревиатура: SW1610-mFa55; 04H1654-mFa55m2P1/04L1612-ml0r//04H1656-mFa55m2N1/04L1612-ml0r, аббревиатура: SW1612-mFa55; and 04H1389-mFa55/04L1615-mk1, аббревиатура: SW1615-mFa55) и антитело отрицательного контроля (IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1, аббревиатура: KLH-mFa55).

В антителе SW1615-mFa55 используют вариабельную область тяжелой цепи 04H1389 (SEQ ID NO: 29) и вариабельную область легкой цепи 04L1615 (SEQ ID NO: 34), а в качестве константных областей используют константную область тяжелой цепи mFa55 мыши (SEQ ID NO: 18) и константную область mk1 легкой цепи мыши дикого типа (SEQ ID NO: 19). Также используют константную область тяжелой цепи мыши, к которой были добавлены изменения для усиления связывания с рецептором Fc γ . Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

В антителе SW1610-mFa55 в качестве константных областей одна вариабельную область тяжелой цепи 04H1654 (SEQ ID NO: 35) связана с константной областью тяжелой цепи мыши mFa55m2P1 (SEQ ID NO: 36), другая вариабельную область тяжелой цепи 04H1656 (SEQ ID NO: 37) связана с константной областью тяжелой цепи мыши mFa55m2N1 (SEQ ID NO: 38), а для вариабельной области легкой цепи 04L1610 (SEQ ID NO: 39) – с константной областью легкой цепи мыши дикого типа mFa55m2N1 (SEQ ID NO: 39). (SEQ ID NO: 22). Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

В антителе SW1612-mFa55 в качестве константных областей одна вариабельная область тяжелой цепи 04H1654 (SEQ ID NO: 35) связана с константной областью тяжелой цепи мыши mFa55m2P1 (SEQ ID NO: 36), другая вариабельная область тяжелой цепи 04H1656 (SEQ ID NO: 37) связана с константной областью тяжелой цепи мыши mFa55m2N1 (SEQ ID NO: 38), а для вариабельной области легкой цепи 04L1612 (SEQ ID NO: 40) – с константной областью легкой цепи мыши дикого типа mFa55m2N1

(SEQ ID NO: 22). Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

В антителе отрицательного контроля в качестве константных областей переменная область тяжелой цепи IC17Hdk (SEQ ID NO: 51) связана с константной областью мыши тяжелой цепи mFa55 (SEQ ID NO: 18), а для переменной области легкой цепи IC17L (SEQ ID NO: 52) используют константную область mk1 легкой цепи мыши дикого типа (SEQ ID NO: 19). Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

10 Пример 5-3. Оценка связывающей способности антител, имеющих константную область мыши, с CTLA4 человека

Способность анти-CTLA4-антител, имеющих константную область мыши, связываться с антигеном оценивают методом, описанным в примере 4-2 (табл. 23). Установлено, что все эти антитела, имеющие константную область мыши, обладают такой же АТФ-зависимой способностью связываться с CTLA4 человека, что и антитела, показанные в табл. 22, имеющие такую же переменную область, но с константной областью человека.

Таблица 23. Анализ связывания вариантов с константными областями мыши с CTLA4 человека

Антитело	K _D для CTLA4 человека (M)		
	АТФ 1 мкМ	АТФ 10 мкМ	АТФ 100 мкМ
MDX10D1H-mFa55/MDX10D1L-mk1	3.2E-08	3.8E-08	3.6E-08
04H1654-mFa55m2P1/04L1610-mI0r	5.8E-08	1.7E-08	8.5E-09
04H1656-mFa55m2N1/04L1610-mI0r	4.7E-08	1.3E-08	7.4E-09
04H1654-mFa55m2P1/04L1612-mI0r	9.4E-08	2.9E-08	1.2E-08
04H1656-mFa55m2N1/04L1612-mI0r	6.7E-08	2.0E-08	1.0E-08
04H1389-mFa55/04L1615-mk1	4.5E-08	1.5E-08	8.7E-09

Пример 5-4. Эффективность переключающих анти-CTLA4 антител в модели трансплантированных сингенных опухолевых клеток с использованием нокина CTLA4 человека, трансгенной мыши с CD3 человека, с увеличением/уменьшением клеток Treg в опухоли и изменением маркера системного ответа в селезенке

5 Пример 5-4-1. Клеточная линия

Используют клетки Нера1-6/hGPC3. Эта клеток линии рака печени мыши Нера1-6 приобретена в коллекции ATCC, она обладает конститутивной экспрессией гена Glypican 3 человека (hGPC3) в результате трансфекции и клонирования. Клетки Нера1-6/hGPC3 поддерживают и пассируют в среде D-MEM (с высоким содержанием глюкозы) (фирма SIGMA), содержащей 10% FBS (фирма Sigma) и 0,6 мг/мл G418 (фирма Nacalai Tesque).

Пример 5-4-2. Получение модели мыши с трансплантированной сингенной опухолью

Используют мышей с заменой CTLA4 KI человека, CD3 EDG человека (мышь с заменой hCTLA4 KI hCD3 EDG), которые представляют собой гибрид мыши с нокаутом CTLA4 человека (*Blood*, 2005, 106 (9):3127-3133) и мыши, полученной авторами настоящего изобретения, с заменой на CD3 EDG человека (*Sci Rep*, 2017, 7: 45839). Клетки Нера1-6/hGPC3 трансплантируют подкожно мышам с заменой hCTLA4 KI hCD3 EDG, и определяют, что модель приживается, когда средний объем трансплантированных опухолей достигает приблизительно от 200 мм³ до приблизительно 400 мм³.

Объем трансплантированной опухоли рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли = больший диаметр × меньший диаметр × меньший диаметр/2

Пример 5-4-3. Получение лекарственного средства для введения

25 Лекарственные средства, которые вводят модели с трансплантированными клетками Нера1-6/hGPC3, представляют переключающие анти-CTLA4 антитела (SW1610-mFa55, SW1612-mFa55, SW1615-mFa55), полученные в примере 5-2. Лекарственные средства для введения готовят с использованием His-буфера (20 мМ His-HCl, 150 мМ NaCl, pH 6,0) таким образом, чтобы они были в концентрации 0,03 мг/мл, 0,1 мг/мл и 0,3 мг/мл.

Пример 5-4-4. Введение лекарственного средства для измерения противоопухолевого эффекта

На 8-й день после трансплантации мышам через хвостовую вену вводят три образца переключающих анти-CTLA4 антител в дозах 0,3 мг/кг, 1 мг/кг и 3 мг/кг,

соответственно. В табл. 24 показаны подробности лечения лекарственным средством при измерении противоопухолевого эффекта.

Таблица 24. Измерение противоопухолевого эффекта в модели с трансплантированными клетками Нера1-6/hGPC3 (анти-CTLA4 переключающие антитела)

Группа	Животных	Лекарство	Доза	Введение	Дата введения
1	5	His-буфер	-	В хвостовую вену	8й день после трансплантации
2	5	SW1615-mFa55	0,3 мг/кг	В хвостовую вену	8й день после трансплантации
3	5	SW1615-mFa55	1 мг/кг	В хвостовую вену	8й день после трансплантации
4	5	SW1615-mFa55	3 мг/кг	В хвостовую вену	8й день после трансплантации
5	5	SW1615-mFa55	0,3 мг/кг	В хвостовую вену	8й день после трансплантации
6	5	SW1615-mFa55	1 мг/кг	В хвостовую вену	8й день после трансплантации
7	5	SW1615-mFa55	3 мг/кг	В хвостовую вену	8й день после трансплантации
8	5	SW1615-mFa55	0,3 мг/кг	В хвостовую вену	8й день после трансплантации
9	5	SW1615-mFa55	1 мг/кг	В хвостовую вену	8й день после трансплантации
10	5	SW1615-mFa55	3 мг/кг	В хвостовую вену	8й день после трансплантации

Пример 5-4-5. Оценка противоопухолевого эффекта

Противоопухолевый эффект оценивают по объему опухоли, рассчитанному по формуле, описанной в примере 5-4-2.

10 Скорость ингибирования роста опухоли (TGI – Tumor Growth Inhibition) рассчитывают по следующей формуле:

$$\begin{aligned}
 \text{TGI (\%)} = & (1 - (\text{Средний объем опухоли в исследуемой группе на момент} \\
 & \text{измерения} - \text{Средний объем опухоли в исследуемой группе на момент первоначального} \\
 & \text{введения}) / (\text{Средний объем опухоли в контрольной группе на момент измерения} - \\
 & \text{средний объем опухоли в контрольной группе на момент первоначального введения})) \\
 & \times 100
 \end{aligned}$$

В результате эффективность лекарственного средства SW1610-mFa55 и SW1612-mFa55 по критерию TGI составляет 60% и более на 16-й день после введения в дозах 1 мг/кг или более, а SW1615-mFa55 в дозах 3 мг/кг или более (фиг. 18-20).

Пример 5-4-6. Введение лекарственного средства для оценки клеток Treg в опухоли и подтверждения системного эффекта в селезенке

5 На 10-й день после трансплантации мышам вводят через хвостовую вену SW1610-mFa55 в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг, SW1612-mFa55 вводят в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг, и SW1615-mFa55 вводят в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг и 400 мг/кг. Кроме того, в контрольной группе через хвостовую вену вводят антитело отрицательного контроля IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1 (сокращенное обозначение: KLN-mFa55) в дозе 400 мг/кг. В табл. 25 показаны подробности медикаментозного лечения для оценки клеток Treg в опухоли и подтверждения системных эффектов в селезенке.

15 Таблица 25. Оценка внутриопухолевых и системных эффектов у модельных мышей с трансплантированными клетками Нера1-6/hGPC3 (переключающие анти-CTLA4 антитела)

Группа	Животных	Лекарство	Доза	Введение	Дата введения
1	3	KLH-mFa55	400 мг/кг	В хвостовую вену	10й день после трансплантации
2	3	SW1610-mFa55	50 мг/кг	В хвостовую вену	10й день после трансплантации
3	3	SW1610-mFa55	100 мг/кг	В хвостовую вену	10й день после трансплантации
4	3	SW1610-mFa55	200 мг/кг	В хвостовую вену	10й день после трансплантации
5	3	SW1612-mFa55	50 мг/кг	В хвостовую вену	10й день после трансплантации
6	3	SW1612-mFa55	100 мг/кг	В хвостовую вену	10й день после трансплантации
7	3	SW1612-mFa55	200 мг/кг	В хвостовую вену	10й день после трансплантации
8	3	SW1615-mFa55	50 мг/кг	В хвостовую вену	10й день после трансплантации
9	3	SW1615-mFa55	100 мг/кг	В хвостовую вену	10й день после трансплантации
10	3	SW1615-mFa55	200 мг/кг	В хвостовую вену	10й день после трансплантации
11	3	SW1615-mFa55	400 мг/кг	В хвостовую вену	10й день после трансплантации

Пример 5-4-7. Резекция опухолей и селезенки у модельных мышей с трансплантированными клетками Hepa1-6/hGPC3

На 6-й день после введения антител мышей подвергают эвтаназии под наркозом и отделяли опухоли и селезенки. Из полученных селезенок готовят клеточную суспензию с использованием среды RPMI-1640 (SIGMA), содержащей 10% FBS (фирма SIGMA), и затем подвергают гемолизу с использованием набора для лизирования эритроцитов мыши (фирма R&D) для получения клеток селезенки. Полученные опухоли измельчают с использованием набора для диссоциации опухолей мышей (фирма Miltenyi). Как клетки селезенки, так и раздробленные опухоли реагируют с приведенными ниже антителами и фракции присутствующих иммунных клеток анализируют с помощью метода FACS: антитело к CD45 (фирма BD, клон: 30-F11), антитело к CD3 (фирма BD, клон: UCHT1), анти-CD4 антитело (фирма BD, клон: RM4-5), анти-FoxP3 антитело (фирма eBioscience, клон: FJK-16s), антитело к ICOS (фирма eBioscience, клон: 7E17G9), антитело к CCR7 (фирма Biolegend, клон : 4B12), антитело против KLRG1 (фирма Biolegend, клон: 2F1/KLRG1). Анализ FACS выполняют с помощью BD LSR Fortessa X-20 (BD).

Пример 5-4-8. Оценка Treg в опухоли в модели с трансплантированными клетками Hepa1-6/hGPC3

Оценивают изменения эффекторных клеток Treg ($CD4^+ FoxP3^+ CCR7^{low} KLRG1^+$) в опухолях после введения анти-CTLA4 переключающих антител. В результате SW1610-mFa55, SW1612-mFa55 и SW1615-mFa55 снижают долю эффекторных клеток Treg до уровня менее 0,2% CD45-положительных клеток во всех вводимых дозах (фиг. 21).

Пример 5-4-9. Оценка системного эффекта в селезенке в модели с трансплантированными клетками Hepa1-6/hGPC3

Изменения активированных хелперных Т-клеток ($CD4^+ Foxp3^- ICOS^+$) в селезенке после введения анти-CTLA4-переключающих антител оценивают с помощью метода FACS. В результате соотношение активированных хелперных Т-клеток к CD45-положительным клеткам в селезенке существенно не увеличивается при концентрации оцениваемых доз 50 мг/кг для SW1610-mFa55 и SW1612-mFa55 и при 200 мг/кг или менее оцениваемых доз для SW1615-mFa55. Тест Даннета осуществляют в группе, получавшей KLH-mFa55, с использованием JMP 11.2.1 (фирма SAS Institute Inc.) для определения теста значимости (фиг. 22). Подтверждено, что хотя все переключающие антитела проявляют эффективность, они не вызывают ответа в тканях, отличных от

опухоли, и что они обладают способностью проявлять активность только локально в опухоли.

Пример 6. Создание варианта Fc-области, способного усиливать активность ADCC/ADCP

5 Для получения антител с усиленной активностью ADCC и ADCP, которые являются цитотоксическими эффекторными функциями, исследуют получение вариантов Fc-области с повышенной способностью связываться с активирующими FcγR-рецепторами FcγRIIIa и FcγRIIa.

Пример 6-1. Получение и оценка вариантов с повышенным связыванием с FcγR

10 Получают гетеродимеризованное антитело 04H1637-Kn125/04L1610-lam1//04H1637-H1076/04L1610-lam1, имеющее константные области тяжелой цепи Kn125 и H1076 с повышенной способностью связывания с FcγR, описанное в WO 2013/002362, и имеющее 04H1637 в качестве переменной области тяжелой цепи и 04L1610-lam1 в качестве легкой цепи. В частности, создан ген тяжелой цепи антитела 15 04H1637-Kn125 (SEQ ID NO: 162), который содержит 04H1637 (SEQ ID NO: 138) в качестве одной переменной области тяжелой цепи и имеет L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A, интродуцированный в G1d (SEQ ID NO: 158) с удаленными Gly и Lys на C-конце константной области тяжелой цепи IgG1 человека, а также имеет изменения Y349C/T366W в области CH3, которые 20 способствуют гетеродимеризации. Аналогичным образом создан ген тяжелой цепи антитела 04H1637-H1076 (SEQ ID NO: 163), который содержит 04H1637 (SEQ ID NO: 138) в качестве другой переменной области тяжелой цепи и имеет D270E/K326D/A330M/K334E, интродуцированный в константную область G1d тяжелой цепи IgG1 человека (SEQ ID NO: 158), а также имеет изменения 25 D356C/T366S/L368A/Y407V в области CH3, которые способствуют гетеродимеризации. Используя 04L1610-lam1 (SEQ ID NO: 161) в качестве легкой цепи антитела, получают гетеродимер 04H1637-Kn125/04L1610-lam1//04H1637-H1076/04L1610-lam1 способом, известным специалистам в данной области. Гены тяжелых цепей антител 04H1637-Kn462 (SEQ ID NO: 164), 04H1637-H1441 (SEQ ID NO: 165), 04H1637-H1445 (SEQ ID NO: 166), 04H1637-Kn461 (SEQ ID NO: 167) и 04H1637-H1443 (SEQ ID NO: 168), 30 которые, в дополнение к L235Q, G236W, S239M, H268D, D270E, S298A, K326D и K334E, имеют изменения, внесенные в область CH2 L234F и A330K, описанные в WO 2013/002362 как изменения, которые меняют связывание с FcγR; G236A, I332E и I332D, о которых сообщается в *Mol. Cancer Ther.*, 2008, 7, 2517-2527 и WO

2004/029207; а также T250V и T307P, указанные в WO 2013/118858, как изменения для улучшения стабильности, в комбинации. Кроме того, получен ген тяжелой цепи антитела 04H1654-КТ462 (SEQ ID NO: 182), в котором удалены Gly и Lys на С-конце IgG1 человека (IGHG1*03), и он имеет те же изменения, что и Кп462 в области СН2, изменение E356K, которое способствует гетеродимеризации, как описано в

5 WO 2006/106905 в области СН3, а также содержит 04H1654 (SEQ ID NO: 140) в качестве вариабельной области тяжелой цепи. Сходным образом создан ген тяжелой цепи антитела 04H1656-НТ441 (SEQ ID NO: 170), в котором удалены Gly и Lys на С-конце IgG1 человека (IGHG1*03), и он имеет те же изменения, что и Н1441 в области

10 СН2, изменение K439E, которое способствует гетеродимеризации, как описано в WO 2006/106905 в области СН3, а также содержит 04H1656 (SEQ ID NO:141) в качестве вариабельной области тяжелой цепи. Аналогичным образом созданы гены 04H1656-НТ445 (SEQ ID NO: 171), 04H1654-КТ461 (SEQ ID NO: 183) и 04H1656-НТ443 (SEQ ID NO: 173). Кроме того, исследовали комбинацию изменений для

15 улучшения в крови кинетики антител, описанных в *Mabs*, 2017, 9, 844-853. В частности, создан ген 04H1654-КТ473 (SEQ ID NO: 184), в котором N434A/Y436T/Q438R/S440E введен в область СН3 04H1654-КТ462 (SEQ ID NO: 182), что представляет собой комбинацию изменений, которые усиливают связывание с FcRn человека в кислых условиях, и изменения, снижающие связывание с ревматоидным фактором.

20 Аналогичным образом создан ген для 04H1656-НТ482 (SEQ ID NO: 185), который имеет N434A/Y436T/Q438R/S440E, интродуцированный в 04H1656-НТ445 (SEQ ID NO: 171). Аналогично, тяжелая цепь антитела 04H1654-КТ481 (SEQ ID NO: 186) и тяжелая цепь антитела 04H1656-НТ498 (SEQ ID NO: 187) получены путем введения таких же изменений в 04H1654-КТ461 и 04H1656-НТ443, соответственно. Путем

25 объединения этих тяжелых цепей и использования 04L1610-lam1 или 04L1612-lam1 (SEQ ID NO: 188) в качестве легкой цепи получены желаемые гетеродимеризованные антитела.

Внеклеточные домены FcγR получают следующим способом. Во-первых, гены внеклеточных доменов FcγR синтезированы способом, известным специалистам в

30 данной области. Также последовательности каждого FcγR получают на основе информации, зарегистрированной в NCBI. В частности, FcγRI получен на основе последовательности NCBI с номером доступа NM_000566.3, FcγRIIa получен на основе последовательности NCBI с номером доступа NM_001136219.1, FcγRIIb получен на основе последовательности NCBI с номером доступа NM_004001.3, FcγRIIIa получен

на основе последовательности NCBI с номером доступа NM_004001.3. получен на основе последовательности с номером доступа NCBI NM_001127593.1, и к С-концу добавлена His-метка. Полиморфный сайт FcγRIIa получен со ссылкой на *J. Exp. Med.*, 1990, 172, 19-25, а полиморфный сайт FcγRIIa подготовлен со ссылкой на *J. Clin. Invest.*, 1997, 100, 1059-1070. Векторы экспрессии получают путем инсерции полученных фрагментов генов в векторы экспрессии в клетках животных. Полученные векторы экспрессии временно вводят в клетки FreeStyle293, производные от клеток эмбрионального рака почки человека (фирма Invitrogen), для экспрессии белков, представляющих интерес. После получения культуральных супернатантов их пропускают через фильтр с порами 0,22 мкм и очищают, в принципе, на протяжении следующих четырех этапов. Первым этапом является катионообменная колоночная хроматография (SP Sepharose FF), вторым этапом является аффинная колоночная хроматография для His-tag (HisTrap HP), третьим этапом является колоночная хроматография с гель-фильтрацией (Superdex200), а четвертым этапом является асептическая фильтрация. Однако для FcγRI на первой стадии выполняли колоночную хроматографию на анионообменной колонке с использованием Q-сефарозы FF. Концентрацию очищенного белка рассчитывают путем измерения поглощения при 280 нм с использованием спектрофотометра и с использованием коэффициента экстинкции, рассчитанного из полученного значения с помощью такого метода, как PACE (*Protein Science*, 1995, 4, 2411-2423). FcRn человека получают способом, описанным в WO 2010/107110.

Взаимодействие между полученными антителами и FcγR человека анализируют методом с использованием Biacore T200. В качестве подвижного буфера используют 50 mM Na-фосфата, 150 mM NaCl, 0,05% Tween20 (pH 7,4), анализ проводят при 25°C. В качестве сенсорных чипов используют чипы Series S SA (фирма GE Healthcare), на которых иммобилизован биотиновый конъюгат CaptureSelect Human Fab-lambda Kinetics (фирма Thermo Fisher Scientific). Исследуемые антитела захватываются этими чипами, и каждому FcγR, разведенному в рабочем буфере, созданы условия для взаимодействия с ними. Чипы регенерируют с помощью 10 mM глицин-HCl (pH 1,5) и 25 mM NaOH, и анализ проводят путем повторного захвата антител. Константы диссоциации KD (моль/л) для FcγR и каждого антитела рассчитывают с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software 2.0, используя модель связывания Ленгмюра 1:1 для FcγRIa и FcγRIIa и модель аффинности стационарного состояния для FcγRIIa. Для FcγRIIb количество связывания

Fc γ RIIb на единицу количества антитела рассчитывают путем корректировки количества связывания Fc γ RIIb, полученного из сенсограммы, построенной путем измерения с количеством антитела, захваченного поверхностью чипа.

5 Взаимодействие между полученными антителами и FcRn человека анализируют методом с использованием Biacore T200. В качестве подвижного буфера используют 50 mM Na-фосфата, 150 mM NaCl, 0,05% Tween20 (pH 7,4), анализ проводят при 25°C. В качестве сенсорных чипов используют чипы Series S SA (фирма GE Healthcare), на которых иммобилизован биотиновый конъюгат CaptureSelect Human Fab-lambda Kinetics (фирма Thermo Fisher Scientific). Исследуемые антитела захватываются этими
10 чипами, и FcRn, разведенному в подвижном буфере, созданы условия для взаимодействия с ними. Чипы регенерируют с помощью 10 mM глицин-HCl (pH 1,5) и 25 mM NaOH, и анализ проводят путем повторного захвата антител. Константу диссоциации для FcRn и каждого антитела рассчитывают с использованием модели стационарного состояния с использованием программного обеспечения для оценки
15 Biacore T200 2.0. Табл. 26 показывает результаты измерений.

Таблица 26. Анализ связывания вариантов Fc-области с рецепторами FcγRs и FcRn человека

Антигено	Замещения в локусе СН2 в константной области тяжелой цепи К α или К λ	Замещения в локусе СН2 в константной области тяжелой цепи К λ или К α	Замещения в локусе СН2 в константной области тяжелой цепи Н1 или Н2	K D для hFcRn (M)	Отношения между K D для hFcRn и K D для hFcγR	K D для hFcγR (M)						Относительная величина KD между G1ш и hFcγR	Относительное связывание				
						hFcγR Ia R		hFcγR IIa H		hFcγR IIIa F				hFcγR IIb V			
						hFcγR Ia R	hFcγR IIa H	hFcγR IIIa F	hFcγR IIIa V	hFcγR Ia R	hFcγR IIa H			hFcγR IIIa F	hFcγR IIb V		
04H1637-G1m/04L1610-lam1	L234Y/L235Q/G236W/S239M/H269D/D270E/S298A	D270E/K326D/A330M/K334E		1.3E-06	1.0	4.9E-11	2.0E-06	1.5E-06	1.4E-06	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
04H1637-Kn125/04L1610-lam1//04H1637-H1076/04L1610-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K266D	G236A/T260V/D270E/S298A/T307P/K326D/K334E		N.T	N.T	4.0E-11	1.2E-06	4.1E-07	3.4E-09	1.9E-09	3.6	406.3	125.6	0.9			
04H1637-Kn462/04L1610-lam1//04H1637-H441/04L1610-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K266D	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/A330K/I332D/K334E		N.T	N.T	1.5E-10	2.2E-07	7.0E-08	1.7E-08	5.2E-09	20.9	79.5	45.8	1.6			
04H1637-Kn461/04L1610-lam1//04H1637-H443/04L1610-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K266D/I332E	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/I332E/K334E		N.T	N.T	4.2E-11	1.9E-07	1.3E-07	2.2E-09	1.1E-09	11.1	816.5	225.7	3.1			
04H1654-KT462/04L1610-lam1//04H1656-HT445/04L1610-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K266D/I332E	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/A330K/I332D/K334E		1.5E-06	0.9	3.0E-11	1.6E-07	1.1E-07	3.3E-09	2.2E-09	13.9	414.7	109.6	3.1			
04H1654-KT473/04L1610-lam1//04H1656-HT482/04L1610-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K266D	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/A330K/I332D/K334E		5.8E-07	2.3	4.6E-11	1.5E-07	8.1E-08	3.8E-09	2.1E-09	18.0	363.4	114.6	3.2			
04H1654-KT481/04L1610-lam1//04H1656-HT498/04L1610-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K266D/I332E	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/I332E/K334E		5.7E-07	2.3	3.3E-11	2.6E-07	2.3E-07	2.8E-09	1.6E-09	7.7	495.2	152.0	2.7			
04H1654-KT462/04L1612-lam1//04H1656-HT445/04L1612-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K266D/I332E	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/A330K/I332D/K334E		1.6E-06	0.8	4.1E-11	1.4E-07	9.1E-08	3.4E-09	2.3E-09	16.1	408.0	105.7	3.4			
04H1654-KT461/04L1612-lam1//04H1656-HT443/04L1612-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K266D/I332E	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/I332E/K334E		1.6E-06	0.8	3.8E-11	2.5E-07	2.1E-07	2.6E-09	1.5E-09	13.3	536.8	158.8	3.1			
04H1654-KT473/04L1612-lam1//04H1656-HT482/04L1612-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K266D	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/A330K/I332D/K334E		6.2E-07	2.1	4.8E-11	1.5E-07	9.1E-08	3.9E-09	2.2E-09	16.2	354.6	110.0	3.2			
04H1654-KT481/04L1612-lam1//04H1656-HT498/04L1612-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K266D/I332E	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/I332E/K334E		6.0E-07	2.2	4.3E-11	2.7E-07	2.3E-07	2.9E-09	1.7E-09	7.6	479.2	145.2	2.8			

N.T.: Не исследовали

Значения «KD для hFcRn (M)» и «KD для рецепторов hFcγR (M)» в таблице указывают на константы диссоциации для hFcRn и каждого FcγR, соответственно, а «количество связывания» показывает количество связываемого FcγRIIb на единицу количества антитела, когда для FcγRIIb создавали возможность для взаимодействия при 1000 нМ. Понятия «относительное значение для KD между G1m и hFcRn» и «относительное значение для KD между G1m и рецепторами hFcγR» представляют собой значения, полученные путем деления значения KD для 04H1637-G1m/04L1610-lam1 для hFcRn и для каждого FcγR на значение KD для каждого варианта, соответственно. Понятие «относительное количество связывания» означает величину, полученную путем деления количества связывания каждого варианта с FcγRIIb на количество связывания 04H1637-G1m/04L1610-lam1. Аминокислотные последовательности тяжелой цепи антитела 04H1637-G1m и легкой цепи антитела 04L1610-lam1 показаны в SEQ ID NO: 160 и 161, соответственно. Показано, что все полученные гетеродимеризованные антитела обладают повышенным связыванием с FcγRIIa и FcγRIIIa по сравнению с 04H1637-G1m/04L1610-lam1, имеющим константную область нативного IgG1 человека. Кроме того, было показано, что 04H1637-Kn462/04L1610-lam1//04H1637-HI441/04L1610-lam1, 04H1637-Kn462/04L1610-lam1//04H1637-HI445/04L1610-lam1 и 04H1637-Kn461/04L1610-lam1//04H1637-HI443/04L1610-lam1 обладают повышенным связыванием с FcγRIIa по сравнению с 04H1637-Kn125/04L1610-lam1//04H1637-HI076/04L1610-lam1, которое имеет вариант Fc-области, описанный в WO 2013/002362. Показано, что связывающая способность 04H1637-Kn462/04L1610-lam1//04H1637-HI445/04L1610-lam1 с FcγRIIIa равна таковой у 04H1637-Kn125/04L1610-lam1//04H1637-HI076/04L1610-lam1, а связывающая способность 04H1637-Kn461/04L1610-lam1//04H1637-HI443/04L1610-lam1 с FcγRIIIa выше по сравнению с 04H1637-Kn125/04L1610-lam1//04H1637-HI076/04L1610-lam1. Показано, что аналогичным образом 04H1654-КТ462/04L1610-lam1//04H1656-НТ445/04L1610-lam1 и 04H1654-КТ462/04L1612-lam1//04H1656-НТ445/04L1610-lam1, имеющие разные изменения для гетеродимеризации константной области и области СН3 в IGHG1*03, имеют сопоставимые профили связывания FcγR с 04H1637-Kn462/04L1610-lam1//04H1637-HI445/04L1610-lam1, а также показано, что 04H1654-КТ461/04L1610-lam1//04H1656-НТ443/04L1610-lam1 и 04H1654-КТ461/04L1612-lam1//04H1656-НТ443/04L1610-lam1 имеют сопоставимые профили связывания FcγR с FcγR с 04H1637-Kn461/04L1610-lam1//04H1637-HI443/04L1610-lam1. Кроме того, 04H1654-КТ473/04L1610-lam1//04H1656-НТ482/04L1610-lam1,

04Н1654-КТ481/04L1610-lam1//04Н1656-НТ498/04L1610-lam1, 04Н1654-КТ473/04L1612-lam1//04Н1656-НТ482/04L1612-lam1 и 04Н1654-КТ481/04L1612-lam1//04Н1656-НТ498/04L1612-lam1 с внесенными изменениями для улучшения кинетики крови обладают улучшенной способностью связывания с FcRn человека и сравнимой способностью связывания с FcγR по сравнению с антителами до внесения изменений для улучшения кинетики крови.

Также создан ген 04Н1656-НТ451 (SEQ ID NO: 272), в котором N434A/Y436T/Q438R/S440E введен в последовательность 04Н1656-НТ441, которая представляет собой комбинацию изменений, которые усиливают связывание с FcRn человека в кислых условиях, и изменений, снижающих связывание с ревматоидным фактором. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела НТ451 показана в SEQ ID NO: 276. Гетеродимеризованное антитело получено путем объединения 04Н1654-КТ473 и 04Н1656-НТ451 и использования 04L1610-lam1 в качестве легкой цепи антитела. В табл. 27 показаны результаты анализа взаимодействия полученных антител с FcRn человека и с FcγR человека.

Установлено, что полученные гетеродимеризованные антитела 04Н1654-КТ462/04L1610-lam1//04Н1656-НТ441/04L1610-lam1 и 04Н1654-КТ473/04L1610-lam1//04Н1656-НТ451/04L1610-lam1 обладают усиленным связыванием с активизирующими FcγR, а именно FcγRIIIa и FcγRIIIa, по сравнению с 04Н1656-G1m/04L1610-lam1, которое имеет константную область нативного IgG1 человека. Кроме того, связывание с FcγRIIb, который является ингибирующим FcγR, поддерживалось на том же уровне, что и 04Н1656-G1m/04L1610-lam1 в обоих этих антителах. Показано, что 04Н1654-КТ473/04L1610-lam1//04Н1656-НТ451/04L1610-lam1, в котором фрагмент N434A/Y436T/Q438R/S440E интродуцирован в 04Н1654-КТ462/04L1610-lam1//04Н1656-НТ441/04L1610-lam1, проявляет повышенную способность связываться с FcRn человека по сравнению с таковой до внесения изменений.

Затем были получены варианты с усиленным связыванием FcγR с использованием различных изменений для гетеродимеризации, описанных в *Nat. Biotechnol.*, 1998, 16, 677-681, оценена их активность связывания с FcRn и FcγR человека. Получают гены тяжелых цепей антител 04Н1389-Ks462 (SEQ ID NO: 191) и 04Н1389-Km462 (SEQ ID NO: 199), которые содержат 04Н1389 (SEQ ID NO: 136) в качестве вариательной области тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, которая имеет те же изменения, что и КТ462, введенные в область CH2 константной области с удаленными Gly и Lys на С-конце IgG1 человека (IGHG1*03), и, кроме того, содержит в области CH3 T366W, введенный, как изменение с целью гетеродимеризации для 04Н1389-Ks462, и Y349C/T366W, введенный как изменение с целью гетеродимеризации для 04Н1389-Km462. Кроме того, получены гены тяжелых цепей антител 04Н1389-Hs445 (SEQ ID NO: 192) и 04Н1389-Hm445 (SEQ ID NO: 200), которые имеют те же изменения, что и НТ445, введенные в область CH2, и, кроме того, имеют в области CH3 T366S/L368A/Y407V, введенные в качестве изменений для гетеродимеризации 04Н1389-Hs445. Аналогично, получают 04Н1389-Ks461 (SEQ ID NO: 193), 04Н1389-Km461 (SEQ ID NO: 201), 04Н1389-Hs443 (SEQ ID NO: 194) и 04Н1389-Hm443 (SEQ ID NO: 202), которые имеют те же изменения, что и у КТ461 и НТ443 в области CH2. Кроме того, получают гены тяжелых цепей антител 04Н1389-Ks473 (SEQ ID NO: 195), 04Н1389-Hs482 (SEQ ID NO: 196), 04Н1389-Ks481 (SEQ ID NO: 197), 04Н1389-Hs498 (SEQ ID NO: 198), 04Н1389-Km473 (SEQ ID NO: 203), 04Н1389-Hm482 (SEQ ID NO: 204), 04Н1389-Km481 (SEQ ID NO: 205) и 04Н1389-Hm498 (SEQ ID NO: 206), которые имеют изменения N434A/Y436T/Q438R/S440E, которые улучшают кинетику крови,

введенные в вышеуказанные константные области тяжелой цепи Ks462, Hs445, Ks461, Hs443, Km462, Hm445, Km461 и Hm443, и содержат 04H389 в качестве варибельной области. 04L1615-k0MT (SEQ ID NO: 190) используют в качестве легкой цепи и получают представляющие интерес гетеродимеры. Для сравнения получен гомодимер 04H1389-G1m/04L1615k0MT, содержащий 04H1389-G1m (SEQ ID NO: 189).

Взаимодействие между разработанными антителами и рецепторами FcγR человека анализируют с использованием Biacore T200. В качестве подвижного буфера используют 50 mM Na-фосфата, 150 mM NaCl, 0,05% Tween20 (pH 7,4), анализ проводят при 25°C. Для сенсорного чипа используют чипы Series S SA (фирма GE Healthcare), на которые был иммобилизован биотиновый конъюгат CaptureSelect Human Fab-kappa Kinetics (фирма Thermo Fisher Scientific). Исследуемые антитела захвачены этими чипами, и каждому FcγR, разведенному в подвижном буфере, дают возможность взаимодействовать с ними. Чипы регенерируют с помощью 10 mM глицин-HCl (pH 1,5) и 25 mM NaOH и проводят анализ путем повторного захвата антител. Константы диссоциации KD (моль/л) для FcγR каждого антитела рассчитывают с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software 2.0 и модели связывания Ленгмюра 1:1 для FcγRIa и FcγRIIIa, а также модели стационарной аффинности для FcγRIIa. Для FcγRIIb количество связывания FcγRIIb на единицу количества антитела рассчитывают путем корректировки количества связывания FcγRIIb, полученного из сенсограммы, построенной на основании измерения, с количеством антител, захваченных на поверхности чипа. Для измерения связывания с FcRn в качестве подвижного буфера используют 50 mM Na-фосфата, 150 mM NaCl, 0,05% Tween20 (pH 6,0), а константу диссоциации KD (моль/л) рассчитывают по модели стационарного состояния (табл. 28). Что касается констант диссоциации для FcγRIIIa в табл. 28, значения, отмеченные знаком «*», представляют собой значения, рассчитанные с помощью стационарной модели аффинности.

Таблица 28. Анализ связывания вариантов Fc-области с рецепторами FcγR и FcRn человека

Антителo	K _d для hFcRn (M)	Относительная величина K _d между hFcRn и hFcγR	K _d для hFcγR (M)					Связывающее количество	Относительная величина K _d между G1m и hFcγR				Относительное связывающее количество
			hFcγR R1a	hFcγR IIa R	hFcγR IIa H	hFcγR IIIa F	hFcγR IIIa V		hFcγR Ia	hFcγR IIa R	hFcγR IIa H	hFcγR IIIa V	
04H1389-G1m/04L1615-k0MT	1.3E-06	1.0	4.5E-11	1.5E-06	1.1E-06	N.T.	9.1E-07	0.011	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
04H1389-Ks462/04L1615-k0MT // 04H1389-Hs445/04L1615-k0MT	1.6E-06	0.8	4.7E-11	1.6E-07	6.7E-08	2.1E-09	1.1E-09	0.030	1.0	9.1	15.8	829.9	2.6
04H1389-Ks461/04L1615-k0MT // 04H1389-Hs443/04L1615-k0MT	1.7E-06	0.8	3.0E-11	2.5E-07	1.6E-07	1.2E-09	5.6E-10	0.024	1.5	5.9	6.7	1627.2	2.1
04H1389-Ks473/04L1615-k0MT // 04H1389-Hs482/04L1615-k0MT	4.5E-07	2.9	5.1E-11	1.6E-07	7.5E-08	2.3E-09	1.2E-09	0.026	0.9	9.0	14.1	760.2	2.3
04H1389-Ks481/04L1615-k0MT // 04H1389-Hs498/04L1615-k0MT	4.6E-07	2.8	2.8E-11	2.6E-07	1.9E-07	1.3E-09	6.0E-10	0.023	1.6	5.6	5.6	1500.7	2.0
04H1389-Km462/04L1615-k0MT // 04H1389-Hm445/04L1615-k0MT	1.7E-06	0.8	4.8E-11	1.6E-07	7.4E-08	2.2E-09	1.1E-09	0.029	0.9	9.5	14.4	810.6	2.6
04H1389-Km461/04L1615-k0MT // 04H1389-Hm443/04L1615-k0MT	1.7E-06	0.7	2.5E-11	2.6E-07	1.9E-07	1.2E-09	5.6E-10	0.024	1.8	5.8	5.7	1620.3	2.1
04H1389-Km473/04L1615-k0MT // 04H1389-Hm482/04L1615-k0MT	4.6E-07	2.8	6.2E-11	1.8E-07	8.7E-08	2.6E-09	1.3E-09	0.024	0.7	8.2	12.3	705.1	2.1
04H1389-Km481/04L1615-k0MT // 04H1389-Hm498/04L1615-k0MT	4.7E-07	2.8	4.2E-11	2.9E-07	2.1E-07	1.4E-09	6.2E-10	0.021	1.1	5.1	5.0	1469.1	1.9

* – Величину K_d определяют по стационарной модели

N.T. – Не исследовали

Все полученные в настоящем изобретении гетеродимеризованные антитела обладают повышенной активностью связывания с FcγRIIa и FcγRIIIa по сравнению с 04H1389-G1m/04L1615-k0MT, Hm482/04L1615-k0MT и 04H1389-Km481/04L1615-k0MT//04H1389-Hm498/04L1615-k0MT, в которые были внесены изменения для улучшения кинетики антител в крови, обладают повышенной активностью связывания с FcRn человека по сравнению с исходным антителом до внесения изменений и в отношении активности связывания FcγR они имели такой же профиль связывания, как и исходное антитело.

10 Кроме того, ген 04H1389-Hm441 (SEQ ID NO: 273), который содержит 04H1389 (SEQ ID NO: 136) в качестве вариабельной области тяжелой цепи, имеет те же изменения, что и HТ441, введенный в область CH2 тяжелой цепи, и содержит Y349C./366W, использованный для изменений с целью гетеродимеризации в области CH3. Напротив, получен 04H1389-Hm451 (SEQ ID NO: 274) с введенным
15 N434A/Y436T/Q438R/S440E, который представляет собой комбинацию изменений, усиливающих связывание с FcRn человека в кислых условиях, и изменений, снижающих связывание с ревматоидным фактором. Аминокислотные последовательности тяжелых цепей Hm441 и Hm451 антитела показаны в SEQ ID NO: 277 и 278 соответственно. Гетеродимеризованные антитела получены с использованием
20 04H1389-Km473, 04H1389-Hm451 или 04H1389-Hm482 в качестве тяжелой цепи антитела и 04L1305-k0MT в качестве легкой цепи антитела. В табл. 29 показаны результаты анализа взаимодействия полученных антител с FcRn человека и с рецепторами FcγR человека.

Таблица 29. Анализ связывания вариантов Fc-области с FcRn человека и с рецепторами FcγR человека.

Антигено	K _d для hFcRn (M)	Относительная величина K _D между G1m и hFcRn	K _d для hFcγR (M)					Связывающее количество	Относительная величина K _D между G1m и hFcγR					Относительное связывающее количество	
			hFcγR Ia	hFcγR IIa R	hFcγR IIa H	hFcγR IIIa F	hFcγR IIIa V		hFcγR Ia	hFcγR IIa R	hFcγR IIa H	hFcγR IIIa F	hFcγR IIIa V		
04H1389-G1m/04L1305-КОМТ	1.0E-06	1.0	6.9E-11	1.6E-06	1.1E-06	6.9E-07	*8.8E-07	0.011	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
04H1389-Km473/04L1305-КОМТ// 04H1389-Hm451/04L1305-КОМТ	3.3E-07	3.0	1.5E-10	1.6E-07	5.3E-08	1.7E-08	3.9E-09	0.015	0.5	9.7	20.0	41.3	224.7	1.3	1.3
04H1389-Km473/04L1305-КОМТ// 04H1389-Hm482/04L1305-КОМТ	3.7E-07	2.7	6.1E-11	8.6E-08	3.5E-08	2.7E-09	9.5E-10	0.034	1.1	18.5	30.8	258.1	930.5	3.0	3.0

* – Величину K_d определяют по стационарной модели

Показано, что полученные гетеродимеризованные антитела 04H1389-Km473/04L1305-k0MT//04H1389-Hm451/04L1305-k0MT и 04H1389-Km473/04L1305-k0MT//04H1389-Hm482/04L1305-k0MT обладают повышенным связыванием с активирующими рецепторами FcγR, а именно FcγRIIa and FcγRIIIa, по сравнению с 04H1389-G1m/04L1305-k0MT, имеющими константную область нативного IgG1 человека. Было также показано, что оба этих антитела обладают повышенной способностью связываться с FcRn человека по сравнению с 04H1389-G1m/04L1305-k0MT.

Затем варианты константной области с усиленным связыванием с FcγR, обнаруженные в настоящем изобретении, сравнивают с существующими вариантами с усиленным связыванием FcγR. Создают гены тяжелых цепей антител MDX10D1H-Kn125 (SEQ ID NO: 217), MDX10D1H-H1076 (SEQ ID NO: 218), MDX10D1H-Kn462 (SEQ ID NO: 219), MDX10D1H-H1445 (SEQ ID NO: 220), MDX10D1H-Kn461 (SEQ ID NO: 221) и MDX10D1H-H1443 (SEQ ID NO: 222), которые содержат MDX10D1H (SEQ ID NO: 154) в качестве вариабельной области тяжелой цепи, и константные области тяжелой цепи, перечисленные в табл. 26. и ген MDX10D1H-G1m (SEQ ID NO: 210), содержащий область CH2 нативного IgG1 человека. Создан ген тяжелой цепи антитела MDX10D1H-GASDIE (SEQ ID NO: 215), который имеет изменения G236A/S239D/I332E в области CH2, как описано в *Mol. Cancer Ther.*, 2008, 7, 2517-2527, как вариант с усиленным связыванием с FcγRIIIa. Кроме того, был создан ген тяжелой цепи антитела MDX10D1H-GASDALIE (SEQ ID NO: 216), который имеет G236A/S239D/A330L/I332E в области CH2, как описано в *J. Struct. Biol.*, 2016, 194, 78-89 в качестве варианта с усиленным связыванием с FcγRIIIa. Для получения представляющих интерес антител используют в качестве легкой цепи антитела MDX10D1L-k0MT (SEQ ID NO: 211). Активность связывания этих антител с FcγR человека измеряют описанным выше способом с использованием биотинового конъюгата CaptureSelect Human Fab-kappa Kinetics (табл. 30).

Таблица 30. Анализ связывания вариантов Fc-области с рецепторами FcγR человека

Антитело	K _D для hFcγR (M)						Связывающее количество		Относительная величина K _D между G1m и hFcγR				Относительное связывающее количество	
	hFcγR IIa R		hFcγR IIa H		hFcγR IIIa F		hFcγR IIIa V		hFcγR IIa R	hFcγR IIa H	hFcγR IIIa V	hFcγR IIIa V	hFcγR IIb	hFcγR IIb
	1.5E-06	1.0E-06	5.5E-08	9.7E-07	2.7E-07	2.8E-08	1.0E-06	9.5E-07	1.0	1.0	1.0	1.0	0.012	1.0
MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT	6.1E-08	5.5E-08	2.3E-08	1.2E-08	1.9E-09	2.7E-07	1.4E-08	24.2	18.9	68.2	68.2	5.8	0.072	24.2
MDX10D1H-GASDIE/MDX10D1L-k0MT	7.9E-07	9.7E-07	1.2E-08	6.9E-09	1.1E-09	2.7E-07	6.9E-09	1.9	1.1	138.1	138.1	3.6	0.044	1.9
MDX10D1H-Kn125/MDX10D1H-H1076/MDX10D1L-k0MT	9.6E-07	2.7E-07	1.9E-09	1.1E-09	1.1E-09	2.7E-07	1.1E-09	1.5	3.8	898.8	898.8	0.7	0.009	1.5
MDX10D1H-Kn462/MDX10D1H-H1445/MDX10D1L-k0MT	1.0E-07	2.8E-08	2.7E-09	1.2E-09	1.2E-09	2.8E-08	1.2E-09	14.9	37.3	807.1	807.1	3.0	0.037	14.9
MDX10D1H-Kn461/MDX10D1H-H1443/MDX10D1L-k0MT	1.7E-07	8.8E-08	1.4E-09	5.7E-10	5.7E-10	8.8E-08	5.7E-10	9.0	11.8	1676.4	1676.4	2.5	0.031	9.0

* – Величину K_D определяют по стационарной модели

N.T. – Не исследовали

Значение «KD для hFcγR (M)» в таблице означает константу диссоциации для каждого из перечисленных FcγR, а «количество связывания» означает количество связывания FcγRIIb на единицу количества антитела, когда у FcγRIIb есть возможность взаимодействовать при 1000 нМ. «Относительное значение KD между G1m и рецепторами hFcγR» означает величину, полученную путем деления значения KD MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT для каждого FcγR на значение KD каждого варианта, а «относительное количество связывания» означает величину, полученную путем деления количества связывания каждого варианта с FcγRIIb на количество связывания MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT.

Полученные гетеродимеры MDX10D1H-Kn125/MDX10D1H-HI076/MDX10D1L-k0MT, MDX10D1H-Kn462/MDX10D1H-HI445/MDX10D1L-k0MT и MDX10D1H-Kn461/MDX10D1H-HI443/MDX10D1L-k0MT все обладают повышенным связыванием с FcγRIIIa по сравнению с существующими антителами MDX10D1H-GASDIE/MDX10D1L-k0MT и MDX10D1H-GASDALIE/MDX10D1L-k0MT с усиленным связыванием FcγR. Также было показано, что связывание MDX10D1H-Kn462/MDX10D1H-HI445/MDX10D1L-k0MT с FcγRIIIaH примерно в 2 раза выше по сравнению с существующим антителом MDX10D1H-GASDIE/MDX10D1L-k0MT, усиленным FcγRIIIa.

Пример 6-2. Оценка *in vitro* активности ADCC различных антител с измененными константными областями

Для анализа активности ADCC *in vitro* используют набор hFcγRIIIaV ADCC Reporter Bioassay, Core Kit (фирма Promega). В каждую лунку 96-луночного планшета в качестве клеток-мишеней вносят 25 мкл суспензии клеток hCTLA4-CHO в качестве клеток-мишеней в концентрации до 2×10^6 /мл с использованием среды, в качестве которой используют буфер для анализа (90% RPMI1640, 10% FBS). Затем добавляют по 25 мкл каждого раствора антител, разбавленного буфером для анализа, таким образом, чтобы конечная концентрация составляла 0, 0,001, 0,01, 0,1 и 1 мкг/мл. Затем в качестве суспензии эффекторных клеток добавляют 25 мкл клеток Jurkat, экспрессирующих hFcγRIIIaV (входят в набор), приготовленных до концентрации 6×10^6 /мл со средой, таким образом, чтобы растворы были смешаны до общего объема 75 мкл. Планшет оставляют стоять при 37°C в течение ночи в инкубаторе с 5% CO₂. Затем планшет оставляют при комнатной температуре на 15 мин и в каждую лунку добавляют по 75 мкл реагента Bio-Glo. В качестве реагента Bio-Glo используют систему анализа люциферазы Bio-glo (буфер и субстрат). Люминесценцию каждой лунки затем

измеряют с помощью планшет-ридера. Значение, полученное путем деления значения люминесценции каждой лунки на значение люминесценции лунок без антител, определяют как индукцию кратности, которую используют в качестве показателя для оценки ADCC каждого антитела. Полученные результаты представлены на фиг. 23. На фигуре индукция кратности представлена в относительных единицах люминесценции (RLU).

Эти результаты показывают, что активность ADCC антител, содержащих измененный Fc, против клеток hCTLA4-CHO выше, чем активность константной области IgG1 человека дикого типа.

10 Пример 6-3. Оценка активности ADCP *in vitro* различных антител с измененными константными областями

Основной набор hFcγRIIaH ADCP Reporter Bioassay (Promega) используют для анализа активности ADCC *in vitro*. В каждую лунку 96-луночного планшета в качестве клеток-мишеней добавляют по 25 мкл клеток hCTLA4-CHO в качестве клеток-мишеней в концентрации 1×10^6 /мл, приготовленной с использованием среды на основе буфера для анализа (с 4% среды RPMI1640, в которой содержится небольшое количество сыворотки IgG). Затем добавляют по 25 мкл каждого раствора антитела, разбавленного буфером для анализа, таким образом, чтобы конечная концентрация составляла 0, 0,001, 0,01, 0,1 и 1 мкг/мл. В итоге, 25 мкл клеток Jurkat, экспрессирующих hFcγRIIaH, включенных в набор, добавляют в качестве суспензии эффекторных клеток, таким образом чтобы растворы смешивались до общего объема 75 мкл. Планшет оставляют при 37°C в течение ночи в инкубаторе с 5% CO₂. Плотность клеточного раствора клеток Jurkat, экспрессирующих hFcγRIIaH, составляет $8,25 \times 10^5$ /мл. Затем планшет оставляют при комнатной температуре на 15 мин и в каждую лунку добавляют по 75 мкл реагента Bio-Glo. В качестве реагента Bio-Glo используют реактив с люциферазой Bio-Glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate). Люминесценцию в каждой лунке затем измеряют с помощью планшет-ридера. Значение, полученное путем деления значения люминесценции каждой лунки на значение люминесценции лунок без антител, определяют как индукцию кратности, которую используют в качестве индекса для оценки ADCP каждого антитела. Полученные результаты представлены на фиг. 24. На фигуре индукция кратности представлена в относительных единицах люминесценции (RLU).

Результаты показывают, что активность ADCP антител, содержащих измененный фрагмент Fc, против клеток hCTLA4-CHO выше, чем такой же показатель в случае константной области IgG1 дикого типа человека.

Пример 6-4. Оценка активности ADCC *in vitro* анти-CTLA4 переключающего антитела с измененным фрагментом Fc

Получают анти-CTLA4 переключающие антитела с измененным Fc (04H1654-Kn462/04L1610-lam1//04H1656-H1445/04L1610-lam1, аббревиатура: SW1610-ART6; 04H1654-Kn462/04L1612-lam1//04H1656-H1445/04L1612-lam1, аббревиатура: SW1612-ART6; and 04H1389-Kn462/04L1305-k0MT//04H1389-H1445/04L1305-k0MT, аббревиатура: SW1389-ART6).

В антителе SW1610-ART6 одна переменная область тяжелой цепи 04H1654 (SEQ ID NO: 35) связана с константной областью тяжелой цепи человека Kn462 (SEQ ID NO: 43), другая переменная область тяжелой цепи 04H1656 (SEQ ID NO: 37) связана с константной областью тяжелой цепи человека H1445 (SEQ ID NO: 44) в качестве константной области, а для переменной области легкой цепи 04L1610 (SEQ ID NO: 39) – с константной областью легкой цепи человека дикого типа lam1 (SEQ ID NO: 39). ID NO: 53). Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

В антителе SW1612-ART6 одна переменная область тяжелой цепи 04H1654 (SEQ ID NO: 35) связана с константной областью тяжелой цепи человека Kn462 (SEQ ID NO: 43), другая переменная область тяжелой цепи 04H1656 (SEQ ID NO: 37) связана с константной областью тяжелой цепи человека H1445 (SEQ ID NO: 44) в качестве константной области, а для переменной области легкой цепи 04L1612 (SEQ ID NO: 40) – с константной областью легкой цепи человека дикого типа lam1 (SEQ ID NO: 53). Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

В антителе SW1389-ART6 две переменные области тяжелой цепи 04H1389 (SEQ ID NO: 29) связаны, соответственно, с константной областью тяжелой цепи человека Kn462 (SEQ ID NO: 43) и константной областью тяжелой цепи человека H1445 (SEQ ID NO: 44) в качестве константной области, а также для переменной области легкой цепи 04L1305 (SEQ ID NO: 30) используют константную область легкой цепи человека k0MT дикого типа (SEQ ID NO: 33). Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

Основной набор hFcγRIIIaV ADCP Reporter Bioassay (Promega) используют для анализа активности ADCC *in vitro*. В каждую лунку 96-луночного планшета в качестве клеток-мишеней добавляют по 12,5 мкл клеток hCTLA4-CHO в качестве клеток-мишеней в концентрации 2×10^6 /мл, приготовленной с использованием среды на основе буфера для анализа (с 4% среды RPMI1640, в которой содержится небольшое количество сыворотки IgG). Затем последовательно добавляют растворы АТФ, разведенные буфером для анализа, таким образом, чтобы конечная концентрация составляла 0 и 100 мкМ, и растворы антител SW1389-ART6, SW1610-ART6 и SW1612-ART6, разведенные буфером для анализа до конечной концентрации 0, 0,001, 0,01, 0,1 и 1 мкг/мл. В итоге, 25 мкл клеток Jurkat, экспрессирующих hFcγRIIIaV (включенных в набор), разводят средой до концентрации 3×10^6 /мл и добавляют в качестве суспензии эффекторных клеток таким образом, что в смеси общий объем составляет 75 мкл. Планшет оставляют при 37°C на 6 ч в инкубаторе с 5% CO₂. Затем планшет оставляют при комнатной температуре на 15 мин и в каждую лунку добавляют по 75 мкл реагента Bio-Glo. В качестве реагента Bio-Glo используют реактив с люциферазой Bio-Glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate). Люминесценцию в каждой лунке затем измеряют с помощью планшет-ридера. Значение, полученное путем деления значения люминесценции каждой лунки на значение люминесценции лунок без антител, определяют как индукцию кратности, которую используют в качестве индекса для оценки ADCC каждого антитела. Полученные результаты представлены на фиг. 25 (SW1389-ART6), фиг. 26 (SW1610-ART6) и фиг. 27 (SW1612-ART6). На фигурах индукция кратности представлена в относительных единицах люминесценции (RLU).

Из полученных результатов было подтверждено, что ADCC активность переключающих анти-CTLA4 антител, обладающих измененным фрагментом против клеток hCTLA4-CHO, различается в присутствии и в отсутствие АТФ, и что присутствует АТФ-зависимая цитотоксичность против клеток hCTLA4-CHO.

Пример 6-5. Оценка *in vitro* нейтрализующей активности анти-CTLA4 переключающих антител

Получают измененные анти-CTLA4 переключающие антитела, антитела человека с переменными областями SW1389, SW1610, SW1612 и SW1615.

Для антитела SW1389 применяют 04H1389 (SEQ ID NO: 29) в качестве переменной области тяжелой цепи и 04L1305 (SEQ ID NO: 30) в качестве переменной области легкой цепи. После связывания переменных областей с

константными областями человека антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

Для антитела SW1610 применяют 04H1654 (SEQ ID NO: 35) и 04H1656 (SEQ ID NO: 37) в качестве вариабельной области тяжелой цепи и 04L1610 (SEQ ID NO: 39) в качестве вариабельной области легкой цепи. После связывания вариабельных областей с константными областями человека антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

Для антитела SW1612 применяют 04H1654 (SEQ ID NO: 35) и 04H1656 (SEQ ID NO: 37) в качестве вариабельной области тяжелой цепи и 04L1612 (SEQ ID NO: 40) в качестве вариабельной области легкой цепи. После связывания вариабельных областей с константными областями человека антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

Для антитела SW1615 применяют 04H1389 (SEQ ID NO: 29) в качестве вариабельной области тяжелой цепи и 04L1615 (SEQ ID NO: 34) в качестве вариабельной области легкой цепи. После связывания вариабельных областей с константными областями человека антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

Для измерения *in vitro* нейтрализующей активности применяют CTLA-4 Blockade Bioassay (фирма Promega). В каждую лунку 96-луночного планшета в качестве клеточ-мишеней добавляют по 25 мкл клеток aAPC-Raji, прикрепленных к набору, приготовленных в концентрации 1×10^6 /мл в среде, причем в качестве среды используют буфер для анализа (10% FBS в RPMI1640). Затем растворы АТФ разбавляют буфером для анализа до конечной концентрации 0 и 100 мкМ, после чего растворы антител, имеющие вариабельные области SW1389, SW1610, SW1612 и SW1615, последовательно разбавляют буфером для анализа до конечной концентрации 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 и 10 мкг/мл. В итоге по 25 мкл клеток IL2-luc2-CTLA4-Jurkat (включенных в набор), приготовленных до концентрации 2×10^6 /мл добавлением среды, вносят в качестве суспензии эффекторных клеток таким образом, что раствор смешивают до общего объема 75 мкл. Планшет оставляют при 37°C в течение 6 ч в инкубаторе с 5% CO₂. Затем планшет оставляют при комнатной температуре на 15 мин и в каждую лунку добавляют по 75 мкл реагента Bio-Glo. В качестве реагента Bio-Glo используют систему анализа люциферазы Bio-Glo (буфер и субстрат). Люминесценцию каждой лунки затем измеряют с помощью планшет-ридера. Значение, полученное путем деления значения люминесценции каждой лунки на значение люминесценции

лунок без антител, определяют как индукцию кратности, которую используют в качестве показателя для оценки нейтрализующей активности каждого антитела. Полученные результаты показаны на фиг. 28 (SW1389), фиг. 29 (SW1610), фиг. 30 (SW1612) и фиг. 31 (SW1615). На фигурах индукция кратности представлена в относительных единицах люминесценции (RLU).

Из полученных результатов было подтверждено, что нейтрализующая активность переключающих анти-CTLA4 антител против клеток, экспрессирующих hCTLA4, различается в присутствии и в отсутствие АТФ, и что нейтрализующая активность АТФ-зависима.

Пример 6-б. Оценка *in vitro* цитотоксической активности анти-CTLA4 переключающего антитела против CTLA4-положительных регуляторных Т-клеток

Получают анти-CTLA4 переключающие антитела с измененным фрагментом Fc (04Н1654-КТ473/04L1610-lam1//04Н1656-НТ451/04L1610-lam1, аббревиатура: SW1610-ART5+ACT1; 04Н1654-КТ473/04L1610-lam1//04Н1656-НТ482/04L1610-lam1, аббревиатура: SW1610-ART6+ACT1; 04Н1389-Км473/04L1305-k0MT//04Н1389-Нм451/04L1305-k0MT, аббревиатура: SW1389-ART5+ACT1; 04Н1389-Км473/04L1305-k0MT//04Н1389-Нм482/04L1305-k0MT, аббревиатура: SW1389-ART6+ACT1).

Для антитела SW1610-ART5+ACT1 применяют 04Н1654-КТ473 (SEQ ID NO: 184) в качестве одной тяжелой цепи, 04Н1656-НТ451 (SEQ ID NO: 272) применяют в качестве другой тяжелой цепи и 04L1610-lam1 (SEQ ID NO: 161) применяют в качестве легкой цепи. Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

Для антитела SW1610-ART6+ACT1 применяют 04Н1654-КТ473 (SEQ ID NO: 184) в качестве одной тяжелой цепи, 04Н1656-НТ482 (SEQ ID NO: 185) применяют в качестве другой тяжелой цепи и 04L1610-lam1 (SEQ ID NO: 161) применяют в качестве легкой цепи. Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

Для антитела SW1389-ART5+ACT1 применяют 04Н1389-Км473 (SEQ ID NO: 203) в качестве одной тяжелой цепи, 04Н1389-Нм451 (SEQ ID NO: 274) применяют в качестве другой тяжелой цепи и 04L1305-k0MT (SEQ ID NO: 275) применяют в качестве легкой цепи. Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

Для антитела SW1389-ART6+ACT1 применяют 04Н1389-Км473 (SEQ ID NO: 203) в качестве одной тяжелой цепи, 04Н1389-Нм482 (SEQ ID NO: 204) применяют в

качестве другой тяжелой цепи и 04L1305-k0MT (SEQ ID NO: 275) применяют в качестве легкой цепи. Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

Оценивают *in vitro* цитотоксическую активность полученных анти-CTLA4 антител с измененным фрагментом Fc в отношении CTLA4-положительных регуляторных Т-клеток (CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ CD45RA⁻ CTLA4⁺). Сначала МКПК человека (CTL Cryopreserved Human МКПК, CTL) подвергают замораживанию-оттаиванию и суспендируют в 50 ЕД/мл интерлейкина 2 (ИЛ-2)/RPMI/10% FBS, таким образом, что плотность клеток составляет 2×10^6 клеток/мл, и культивируют при 37°C в течение 4 дней в инкубаторе с 5% CO₂. Через 4 дня клетки собирают и дважды промывают смесью RPMI/10% FBS, а затем высевают по 100 мкл в каждую лунку 96-луночного планшета с U-образным дном (8×10^5 клеток/лунку или 5×10^5 клеток/лунку) и в каждую лунку добавляют по 25 мкл раствора KLH-G1m, доведенного с помощью RPMI/10% FBS до концентрации 8 мг/мл. Затем добавляют по 25 мкл каждого раствора антител, приготовленного для каждой концентрации (0, 2,4, 8, 24 и 80 мкг/мл или 0, 0,8, 8, 80 и 800 мкг/мл) в RPMI/10% FBS в каждую лунку 96-луночного планшета с U-образным дном. Кроме того, добавляют 50 мкл раствора АТФ, доведенного до 0 или 400 мкМ в RPMI/10% FBS, смесь тщательно суспендируют, а затем оставляют при 37°C в течение 6 ч в CO₂-инкубаторе (5 мкл раствора АТФ, доведенного до 0 или 4000 мкМ, добавляют каждые 2 ч (в общей сложности дважды)). Через 6 ч МКПК собирают, дважды промывают раствором для промывки auto MACS Rinsing Solution (фирма Miltenyi), проводят реакцию со следующими антителами и анализируют присутствующие фракции иммунных клеток методом FACS: реагент для определения жизнеспособности (фирма Biolegend, Zombie Aqua), антитело к CD3 (фирма BD, клон: UCHL1), антитело к CD4 (фирма BD, клон: RPA-T4), антитело к CD8 (фирма BD, клон: SK1), антитело к CD45RA (фирма Biolegend, клон: HI100), антитело к CD25 (фирма BD, клон: 2A3), антитело к CD16 (фирма Biolegend, клон: 3G8), антитело к CD56 (фирма Biolegend, клон: HCD56), антитело к CTLA4 (фирма Биолегенда, клон: BNI3). Анализ FACS проводили на проточном цитофлуориметре BD LSR Fortessa X-20 (фирма BD). Долю CTLA4-положительных регуляторных Т-клеток среди жизнеспособных клеток рассчитывают при каждой концентрации антитела, а относительную величину, при которой значение при концентрации антитела 0 принимают за 100%, определяют как выживаемость (%) CTLA4- положительных регуляторных Т-клеток, что используют в качестве показателя при оценке

цитотоксической активности каждого антитела. Полученные результаты представлены на фиг. 32 (SW1389-ART5+ACT1), фиг. 33 (SW1389-ART6+ACT1), фиг. 34 (SW1610-ART5+ACT1) и фиг. 35 (SW1610-ART6+ACT1).

5 Эти результаты подтверждают, что цитотоксическая активность переключающих анти-CTLA4 антител с измененным Fc против CTLA4-положительных регуляторных Т-клеток различается в присутствии и в отсутствие АТФ, кроме того, существует АТФ-зависимая цитотоксическая активность против CTLA4- положительных регуляторных Т-клеток.

10 Хотя вышеупомянутые изобретения подробно описаны со ссылками на иллюстрации и примеры с целью содействия ясному пониманию, приведенное описание настоящего изобретения и примеры не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения. Описание всех патентных и научных публикаций, цитируемых в настоящем описании, прямо включены в настоящий документ посредством ссылки.

15 Промышленная применимость

Анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению и способы их применения могут быть использованы при разработке, производстве, обеспечении, применении и т.п. фармацевтических препаратов с небольшими побочными эффектами, поскольку антитела по настоящему изобретению обладают активностью, активирующей
20 иммунные клетки, цитотоксической активностью и/или противоопухолевой активностью, оказывают слабое влияние на неопухолевые ткани, такие как нормальные ткани. Кроме того, полипептиды, содержащие вариант Fc-области по настоящему изобретению, и способы их получения и применения могут быть использованы при
25 разработке, производстве, обеспечении, применении и т.п. таких фармацевтических препаратов.

ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Анти-CTLA-4 антитело, обладающее активностью связывания CTLA-4, которая зависит от концентрации аденозинсодержащего соединения, причем указанное
 5 антитело обладает по меньшей мере одним признаком, выбранным из приведенных ниже подпунктов (а)-(и):

(а) связывающая активность в присутствии 100 мкМ аденозинсодержащего соединения больше в два раза или более чем в отсутствие аденозинсодержащего соединения;

10 (б) значение КD в присутствии 100 мкМ аденозинсодержащего соединения составляет 5×10^{-7} М или меньше;

(в) значение КD в отсутствие аденозинсодержащего соединения составляет 1×10^{-6} М или более;

15 (г) образование тройного комплекса с аденозинсодержащим соединением и CTLA-4;

(д) связывание с областью от аминокислоты в положении 97 до аминокислоты в положении 106 CTLA-4 человека (внеклеточный домен, SEQ ID NO: 28);

(е) конкурирование с АВАМ004 (VH, SEQ ID NO: 10; и VL, SEQ ID NO: 11) за связывание с CTLA-4;

20 (ж) связывание с тем же эпитопом, что и АВАМ004 (VH, SEQ ID NO: 10; и VL, SEQ ID NO: 11);

(з) проявление цитотоксической активности в отношении CTLA-4-экспрессирующих клеток; и

(и) связывание с CTLA-4 человека или мыши.

25 2. Антитело по п. 1, которое включает: (а) HVR-H1 (SEQ ID NO: 223), содержащую аминокислотную последовательность SX_1TMN , где X_1 означает H, A, R или K; (б) HVR-H2 (SEQ ID NO: 224), содержащую аминокислотную последовательность $SISX_1X_2SX_3YIYYAX_4SVX_5G$, где X_1 означает S или T, X_2 означает R или Q, X_3 означает G или H, X_4 означает D, E или R и X_5 означает K или R; и (в) HVR-H3 (SEQ ID NO: 225), содержащую аминокислотную последовательность $YGX_1REDMLWVFDY$, где X_1 означает K или A.

30

3. Антитело по п. 2, которое дополнительно включает: (а) HVR-L1 (SEQ ID NO: 226), содержащую аминокислотную последовательность $X_1GX_2STX_3VGDYX_4X_5VX_6$, где X_1 означает T, D, Q или E, X_2 означает T или P, X_3 означает D или G, X_4 означает N или T, X_5 означает Y или W, и X_6 означает S или H; (б) HVR-L2 (SEQ ID NO: 227),
 5 содержащую аминокислотную последовательность $X_1TX_2X_3KPX_4$, где X_1 означает E, F или Y, X_2 означает S или I, X_3 означает K или S, и X_4 означает S, E или K; и (в) HVR-L3 (SEQ ID NO: 228), содержащую аминокислотную последовательность $X_1TYAAPLGPX_2$, где X_1 означает S или Q и X_2 означает M или T.

10 4. Антитело по п. 1, которое содержит: (а) последовательность VH, которая по меньшей мере на 95% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 83-86, 98 и 135-141; (б) последовательность VL, которая по меньшей мере на 95% идентична любой из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 88-95, 97, 99, 134 и 144-149; или (в) последовательность VH, имеющую любую
 15 аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 83-86, 98 и 135-141, и последовательность VL, имеющую любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 88-95, 97, 99, 134 и 144 до 149.

20 5. Фармацевтический состав, включающий любое антитело по п.п. 1-4 и фармацевтически приемлемый носитель.

6. Фармацевтический состав по п. 5, причем фармацевтический состав предназначен для применения в лечении рака.

25 7. Фармацевтический состав по п. 6, причем иммунитет в опухолевой ткани активируется меньшей дозой, чем в неопухолевой ткани.

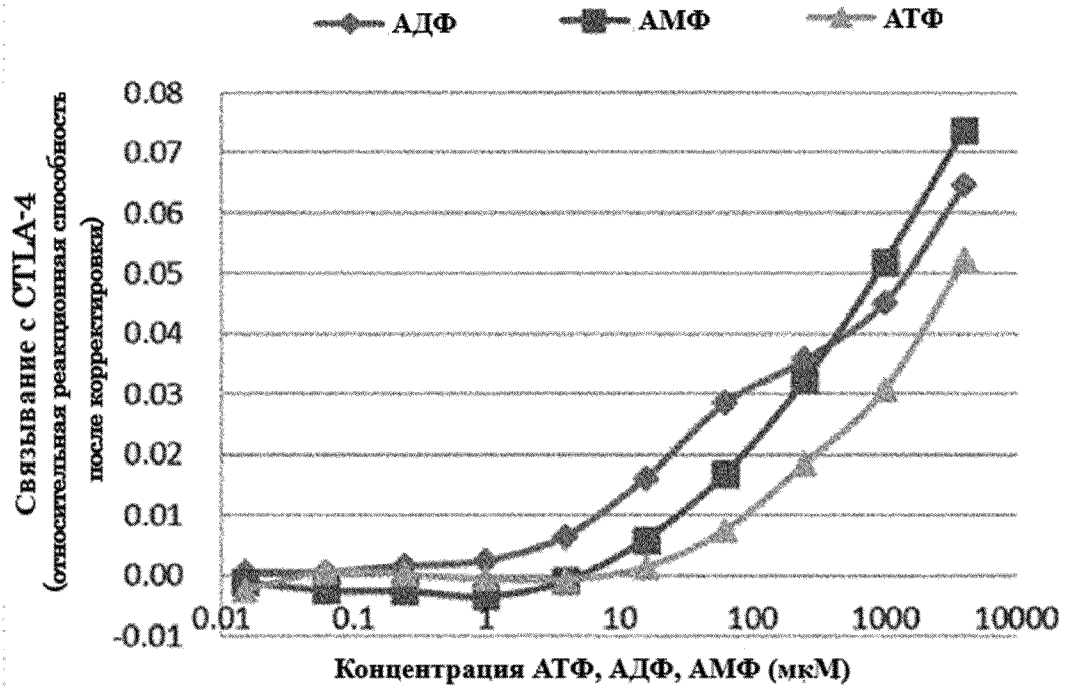
8. Полипептид, который содержит вариант Fc-области, содержащий изменения аминокислот в исходной Fc-области, причем исходная Fc-область состоит из двух
 30 полипептидных цепей, и этот вариант Fc-области содержит аминокислотные изменения в следующих положениях:

(i) в положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307 и 326 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области; а также

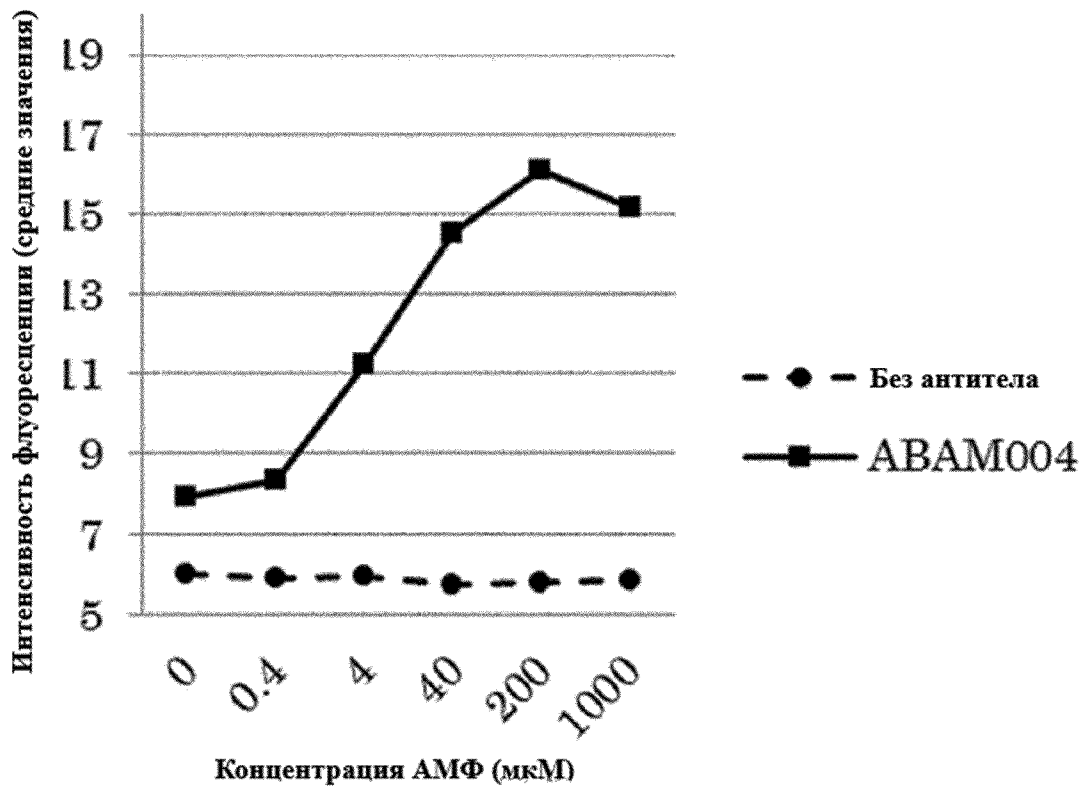
(ii) в положениях 236, 250, 270, 298, 307, 326 и 334 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

5 9. Полипептид по п. 8, причем его связывающая активность по меньшей мере с одним рецептором Fc γ , выбранным из группы, состоящей из Fc γ RIa, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb и Fc γ RIIIa, повышена у варианта Fc-области по сравнению с таковой в исходной Fc-области.

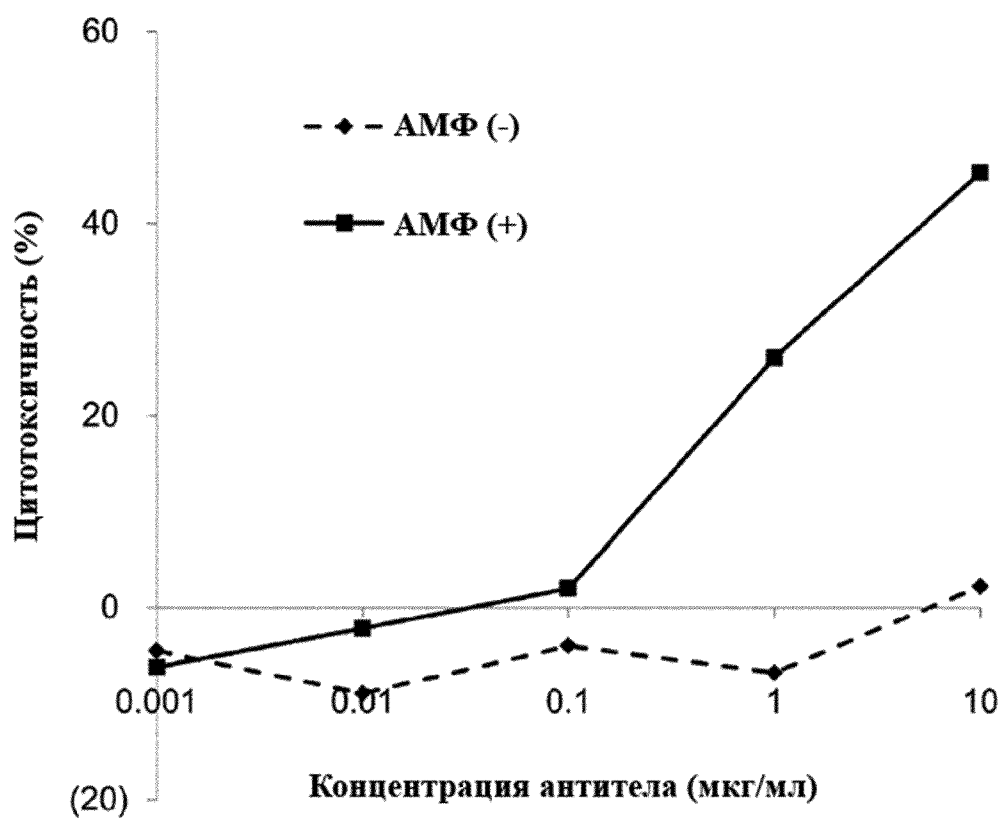
10 10. Полипептид по п. 8 или п. 9, селективность которого между активирующим рецептором Fc γ и ингибирующим рецептором Fc γ улучшена в варианте Fc-области по сравнению с исходной Fc-областью.



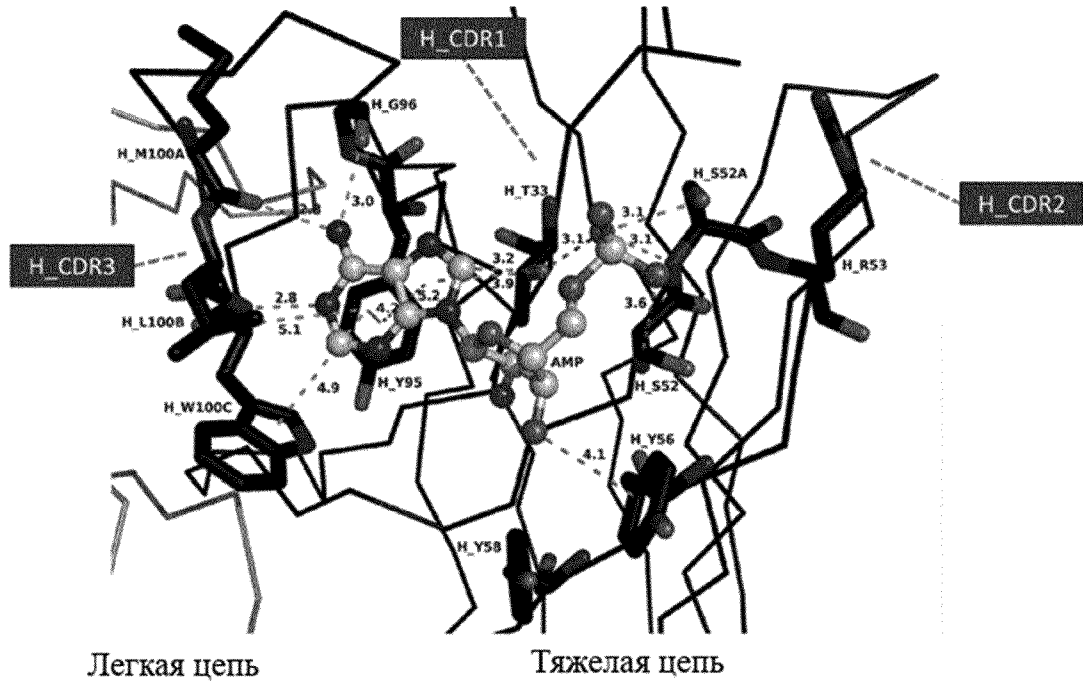
Фигура 1.



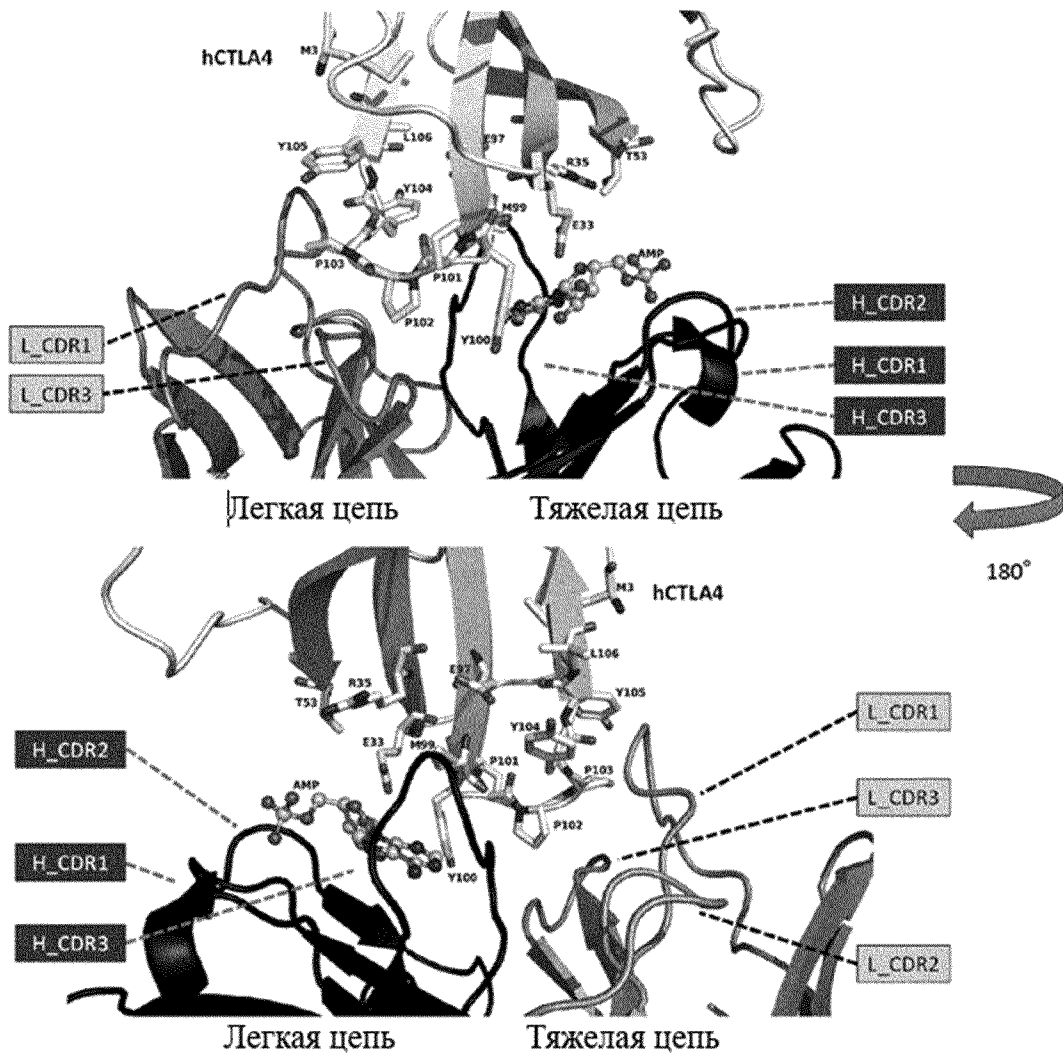
Фигура 2.



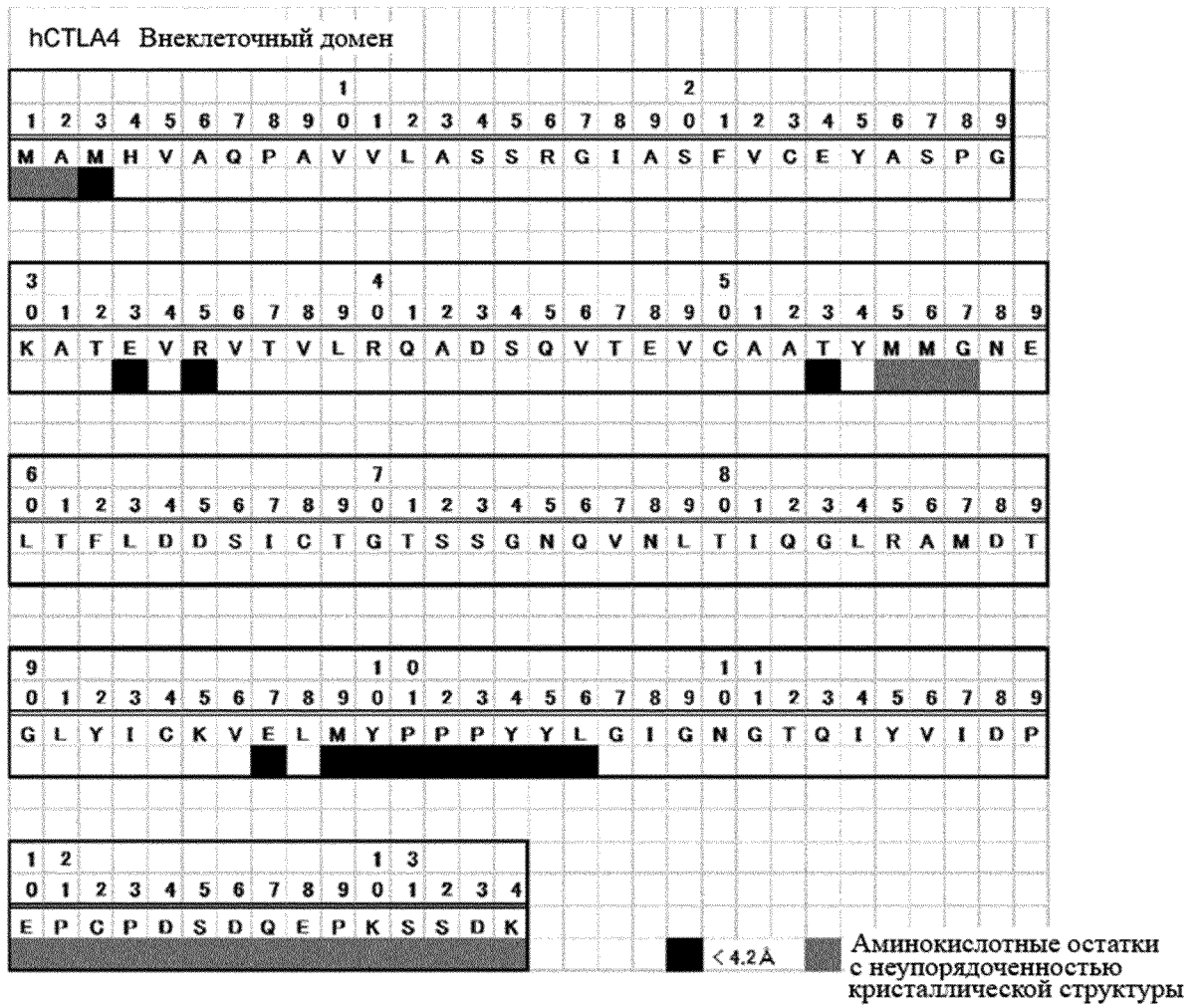
Фигура 3.



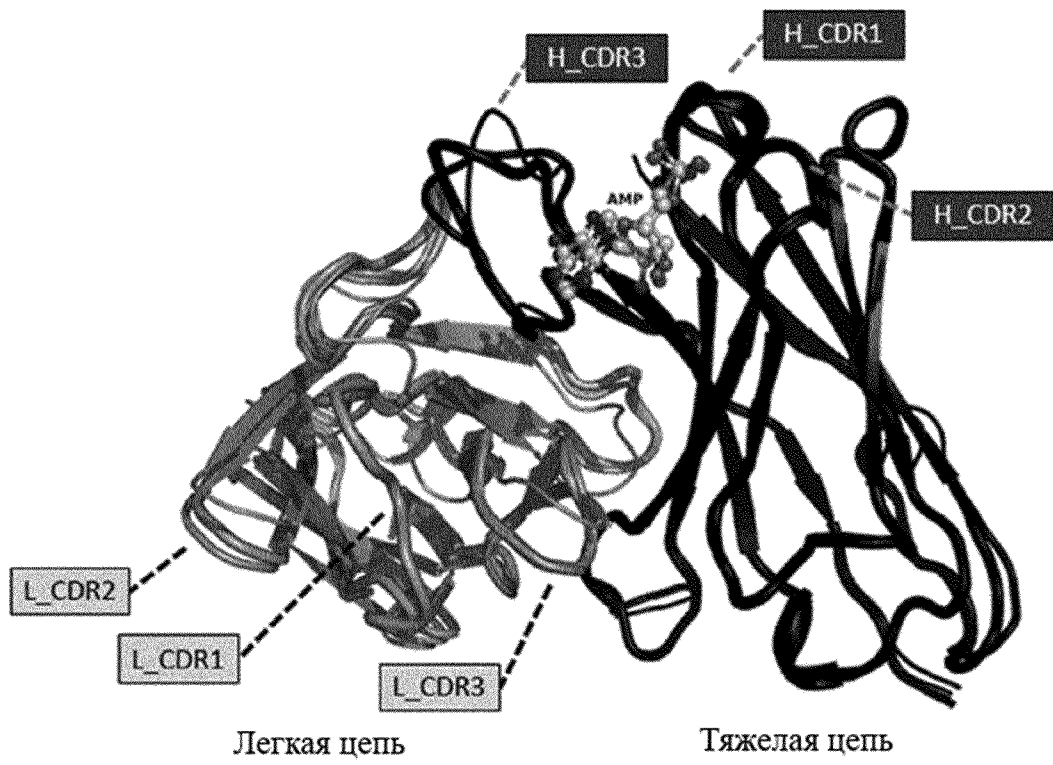
Фигура 4.



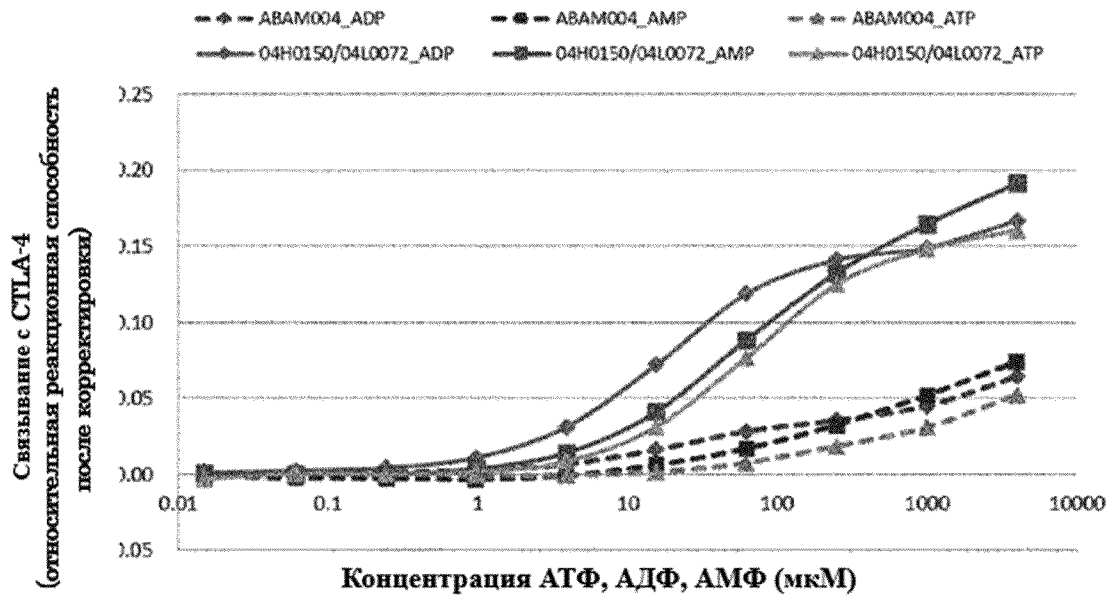
Фигура 5.



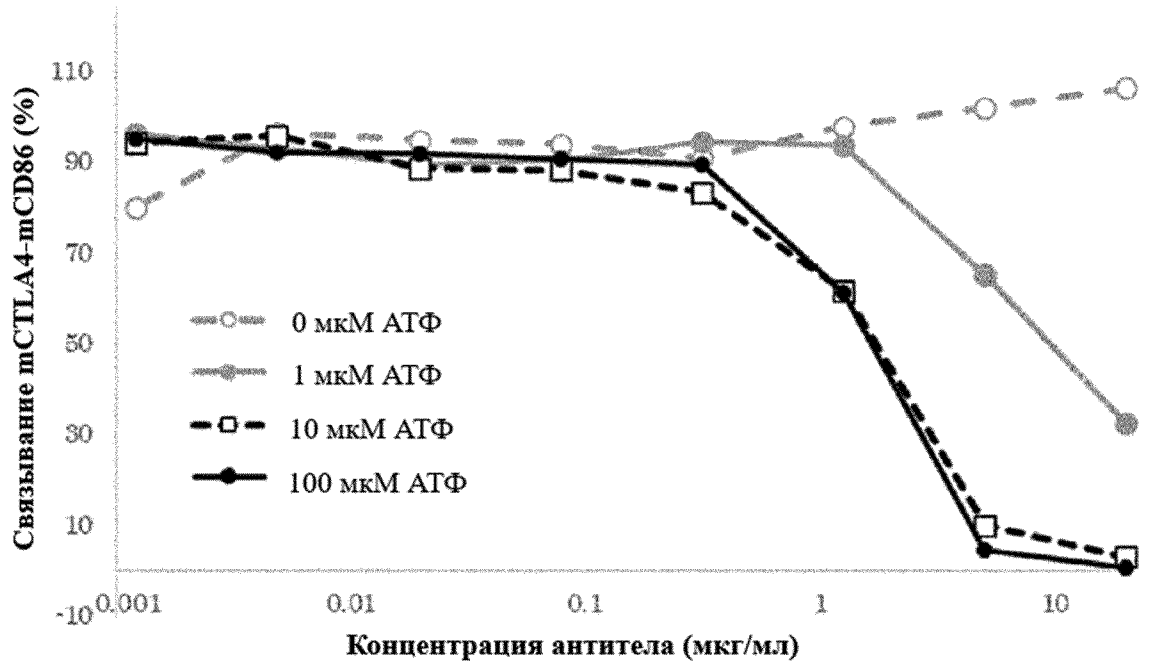
Фигура 6.



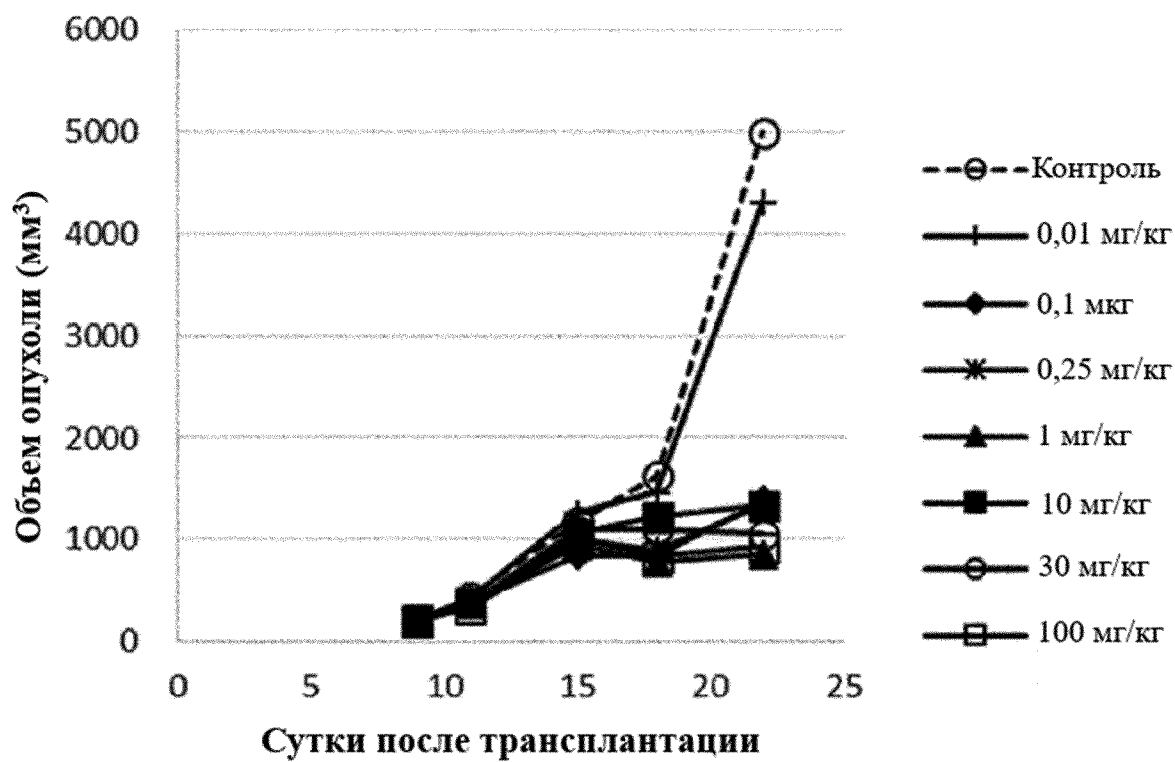
Фигура 7.



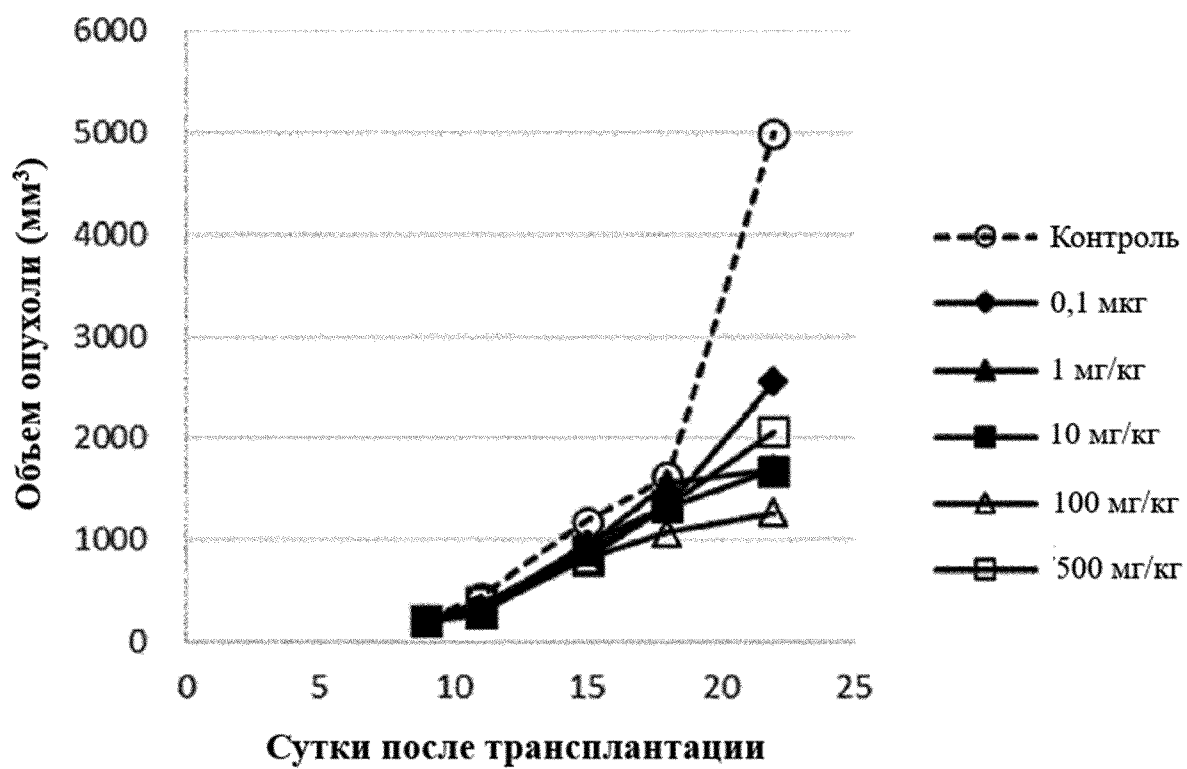
Фигура 8.



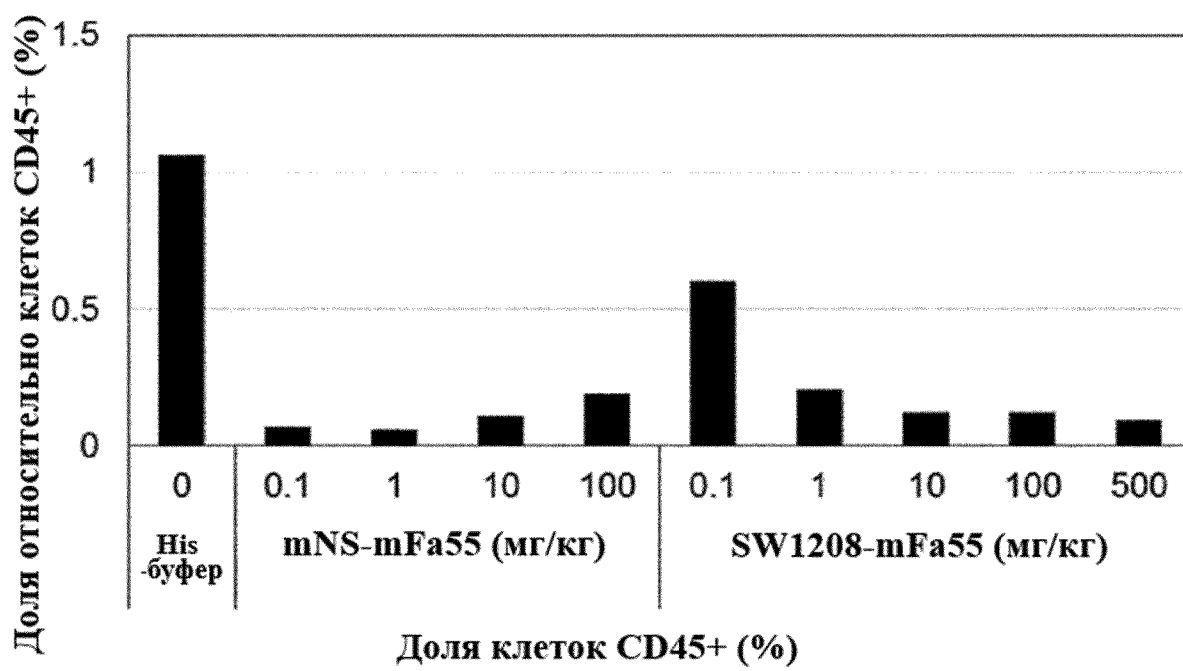
Фигура 9.



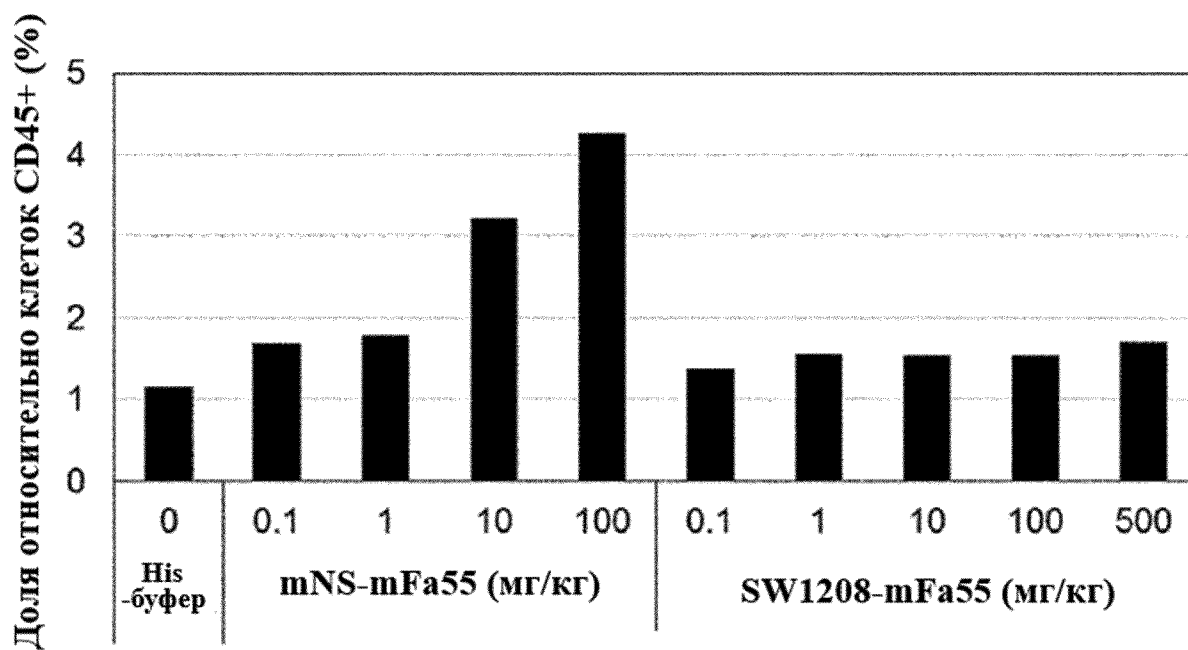
Фигура 10.



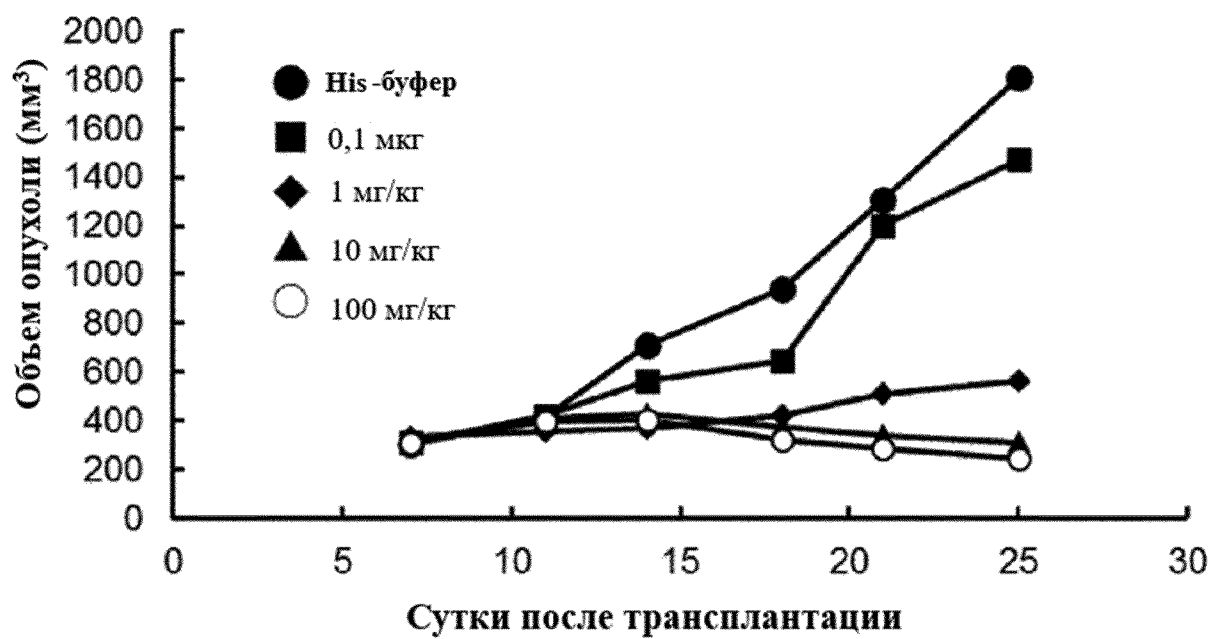
Фигура 11.



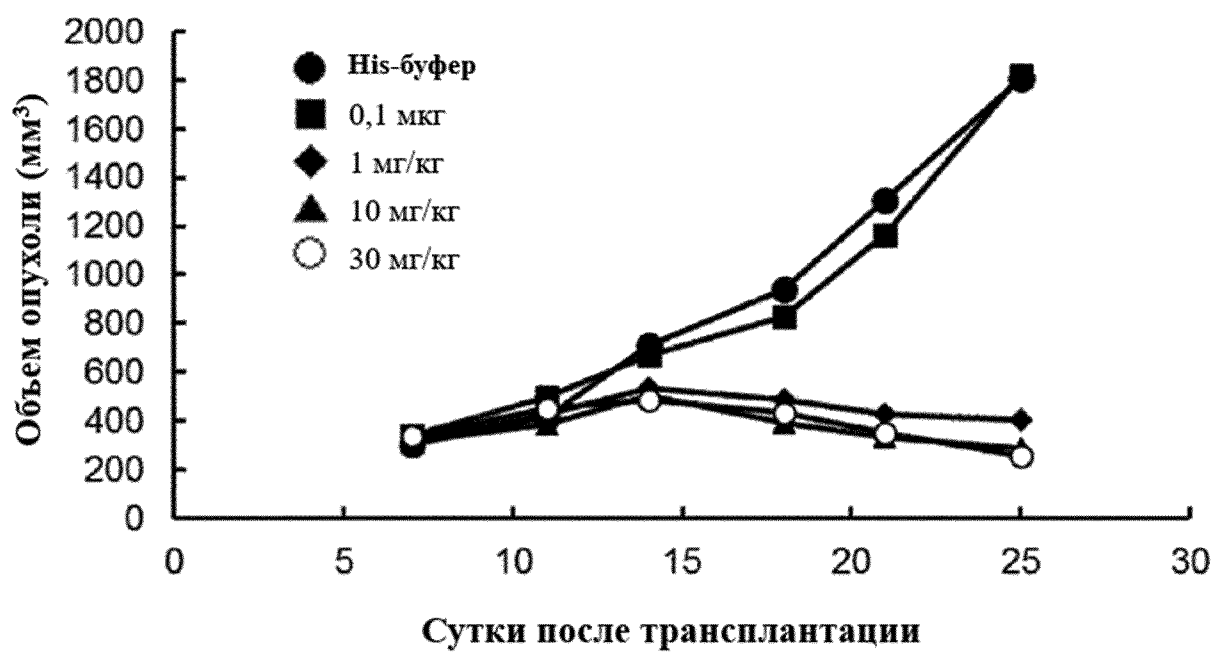
Фигура 12.



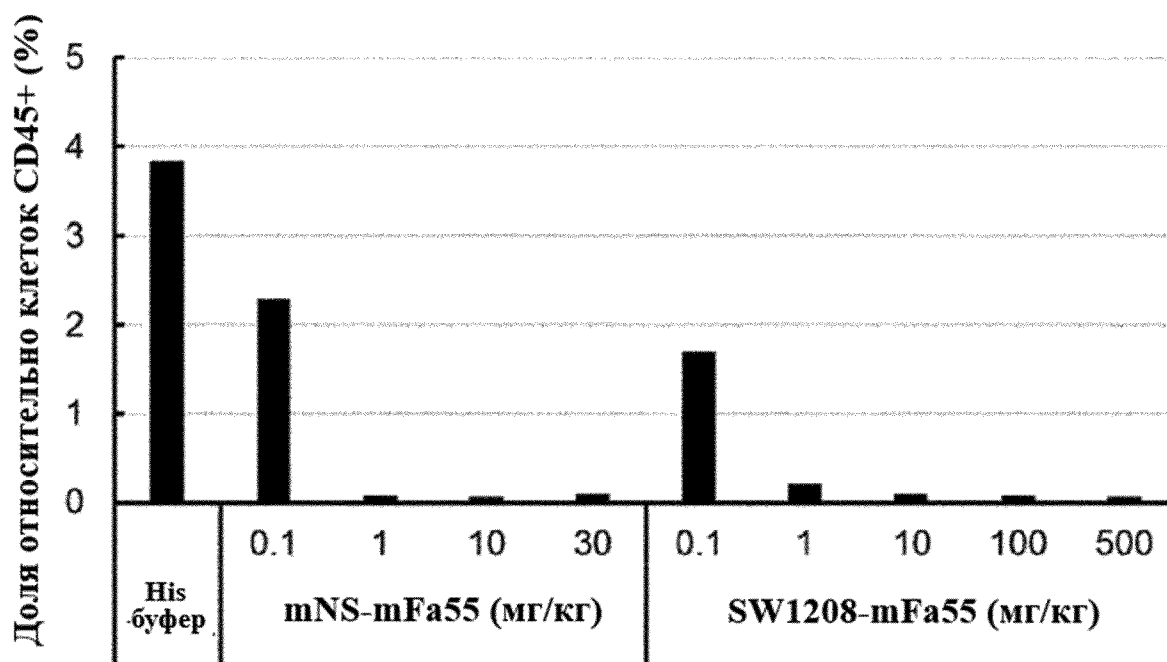
Фигура 13.



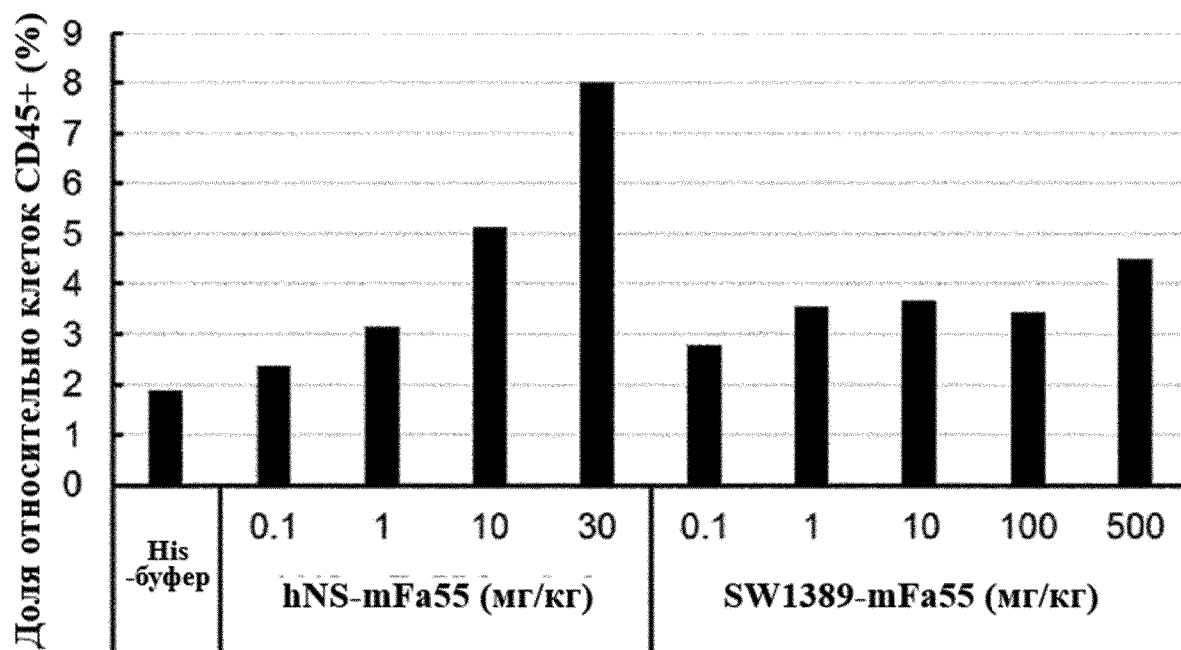
Фигура 14.



Фигура 15.



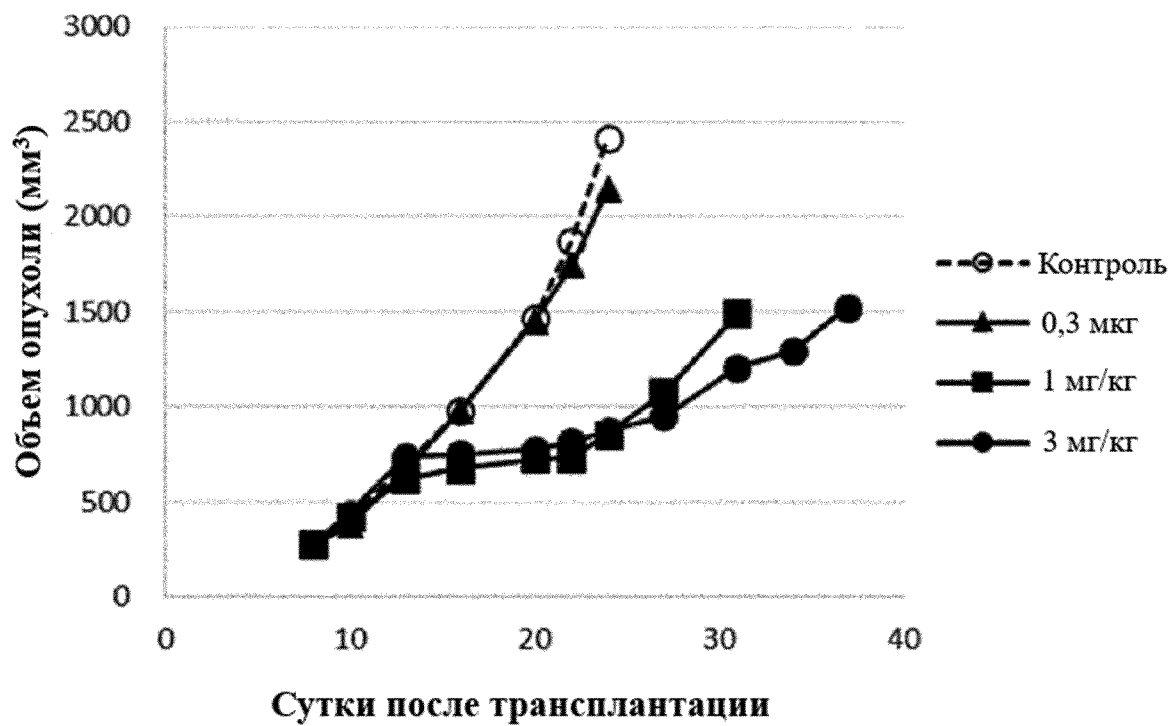
Фигура 16.



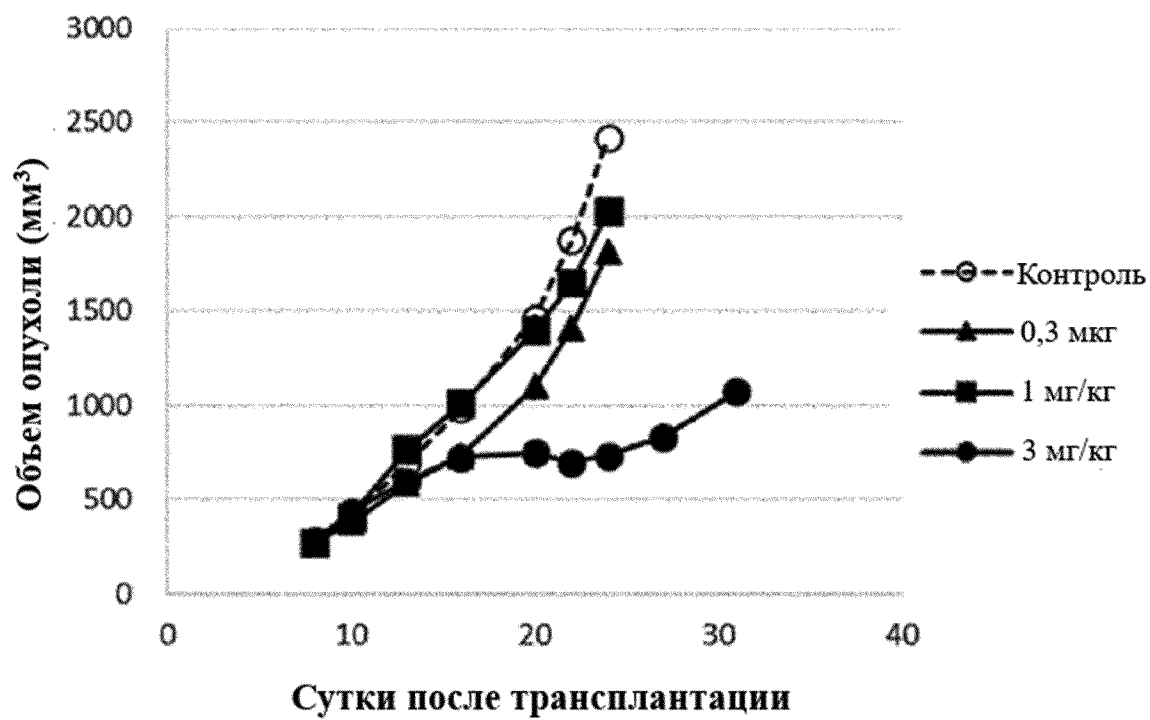
Фигура 17.



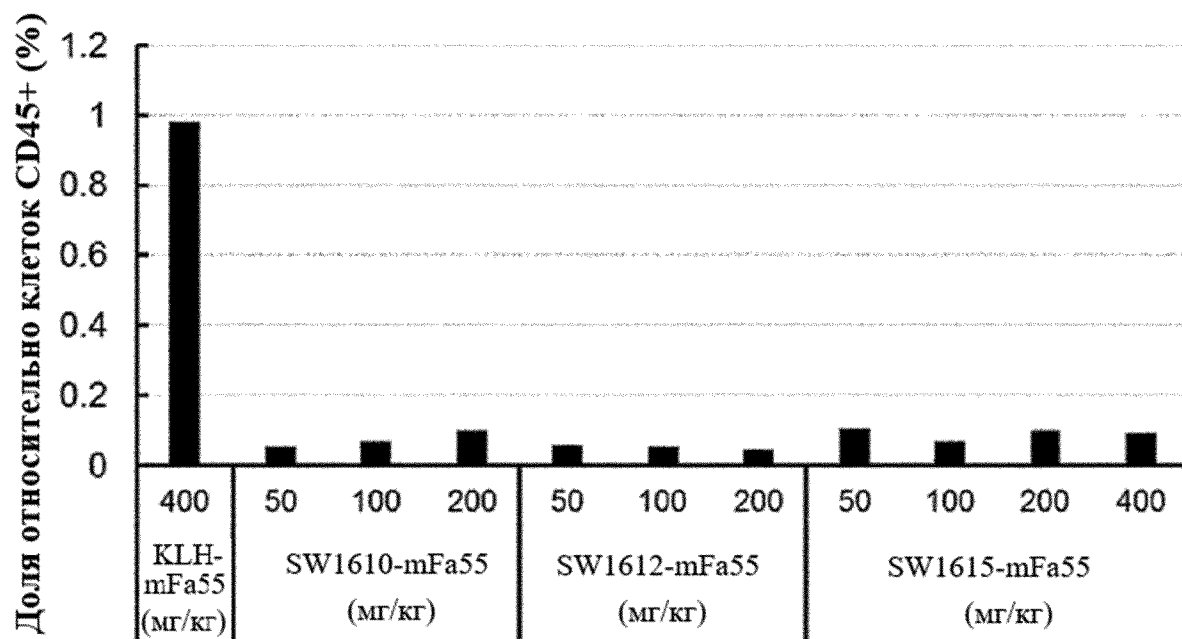
Фигура 18.



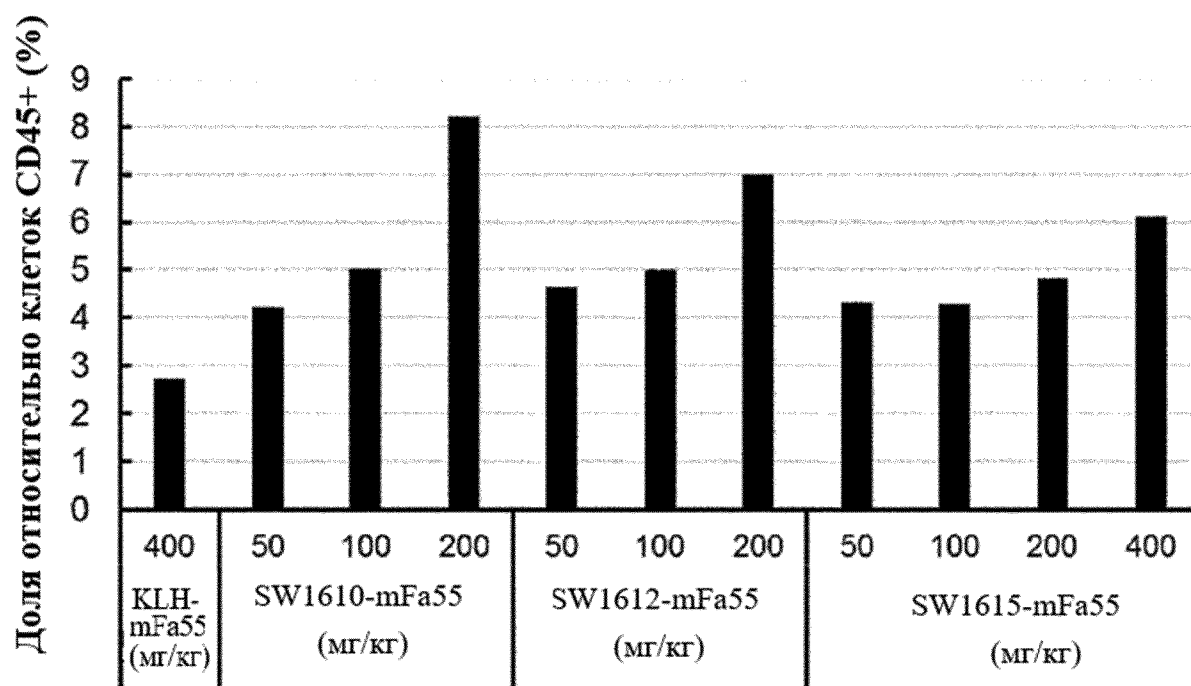
Фигура 19.



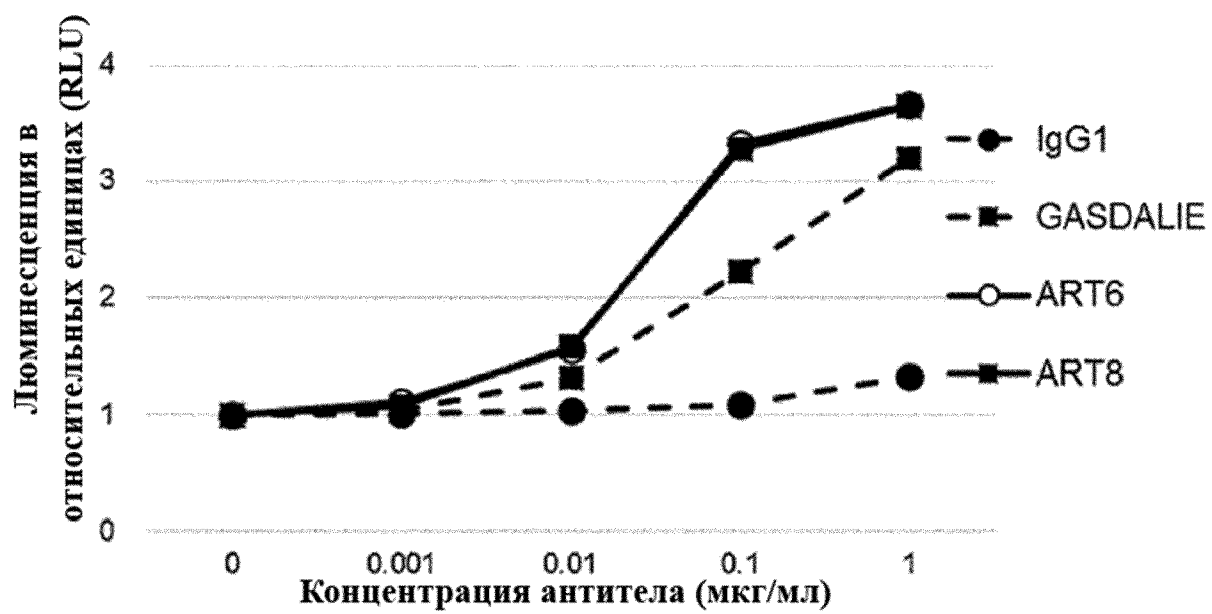
Фигура 20.



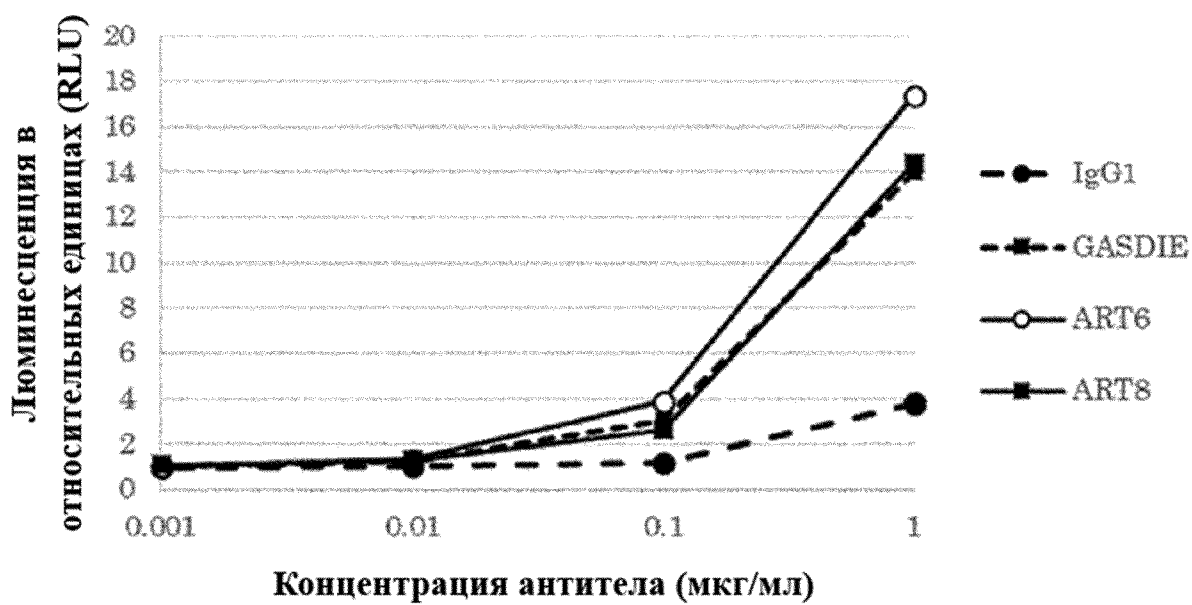
Фигура 21.



Фигура 22.



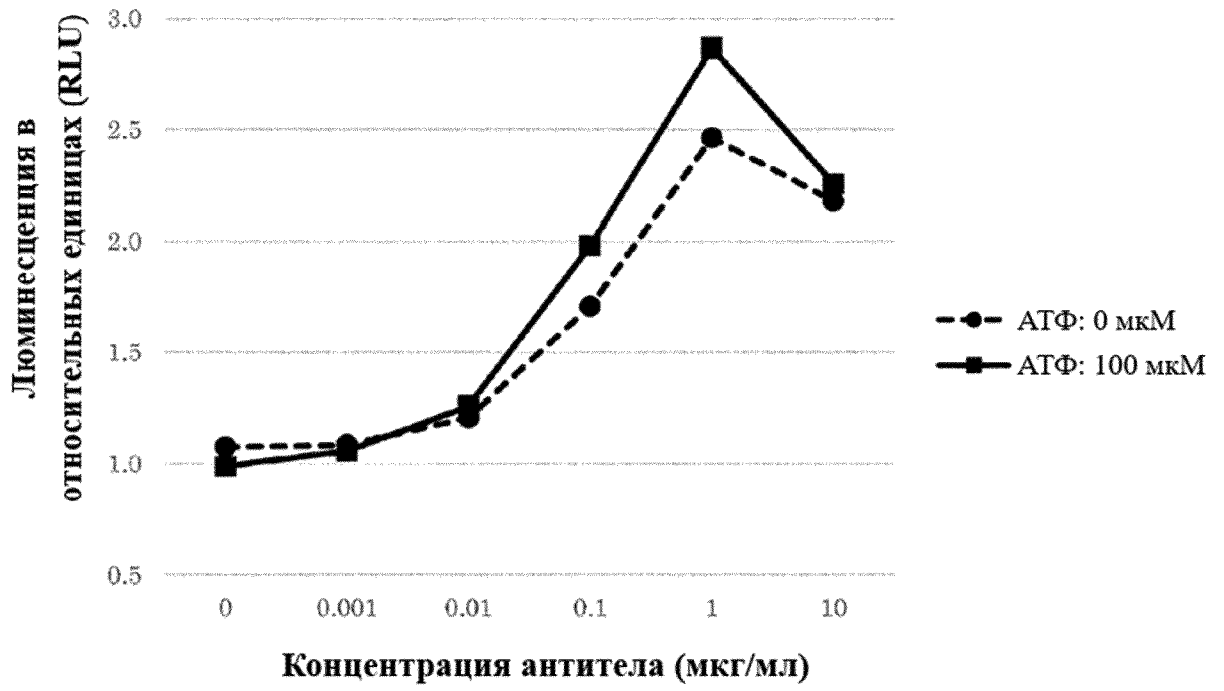
Фигура 23.



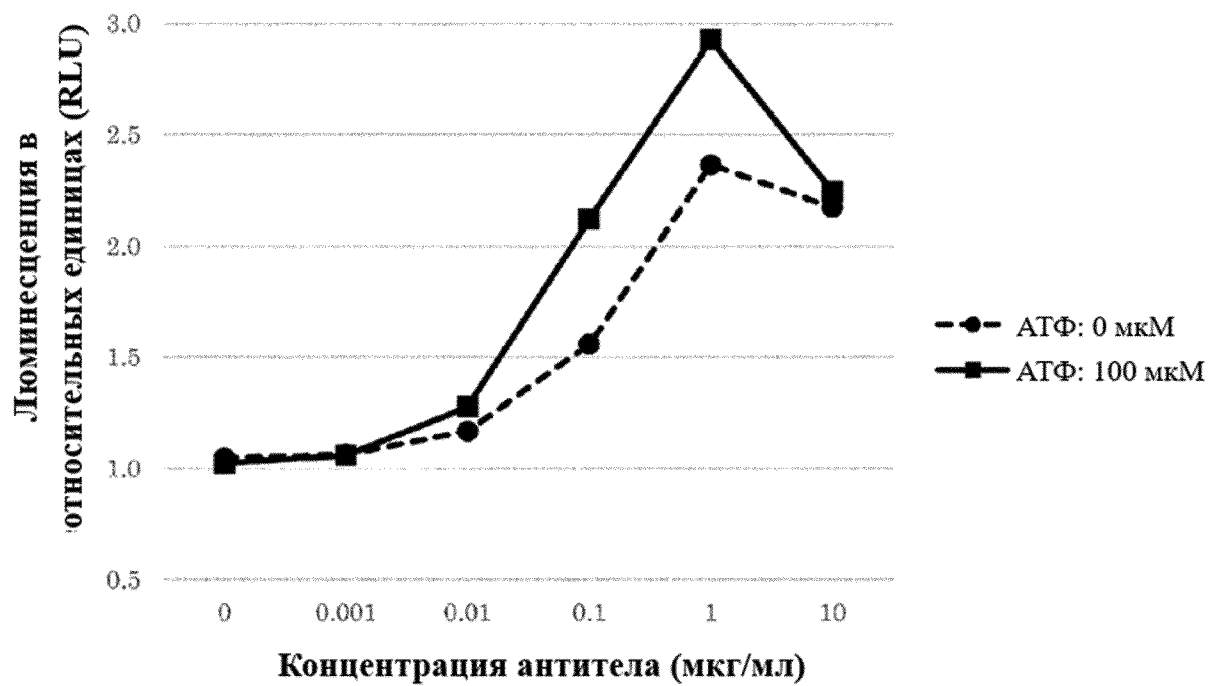
Фигура 24.



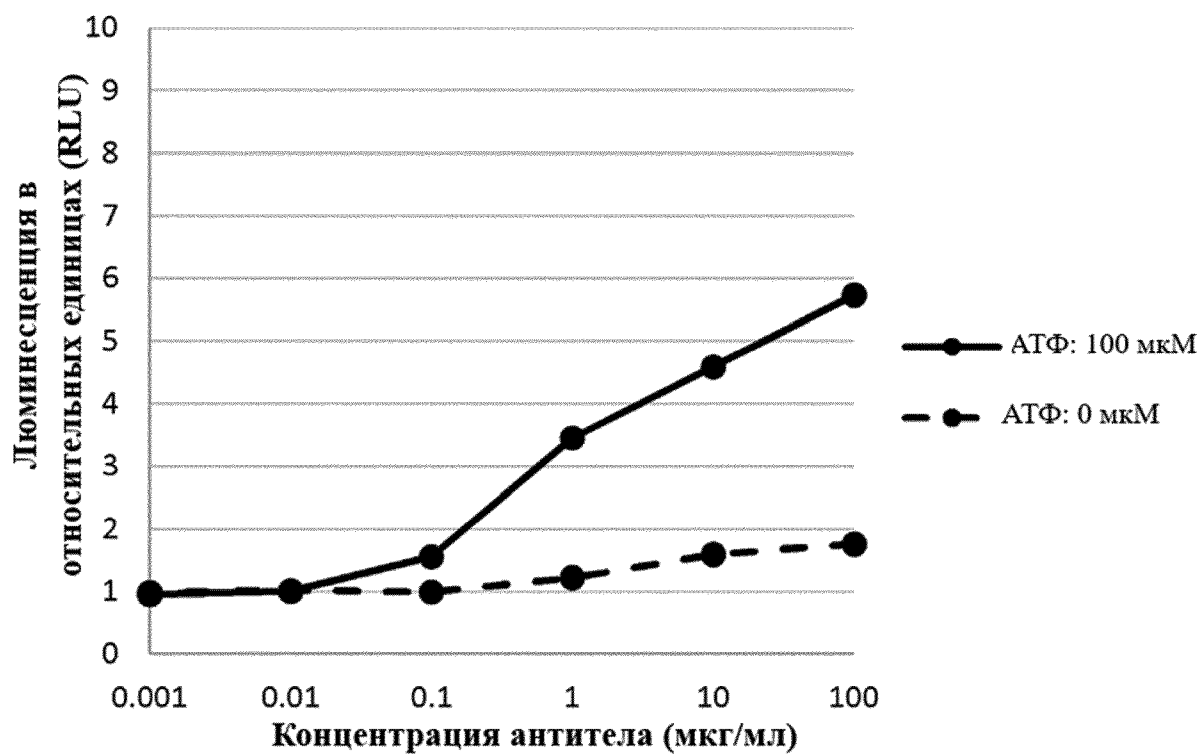
Фигура 25.



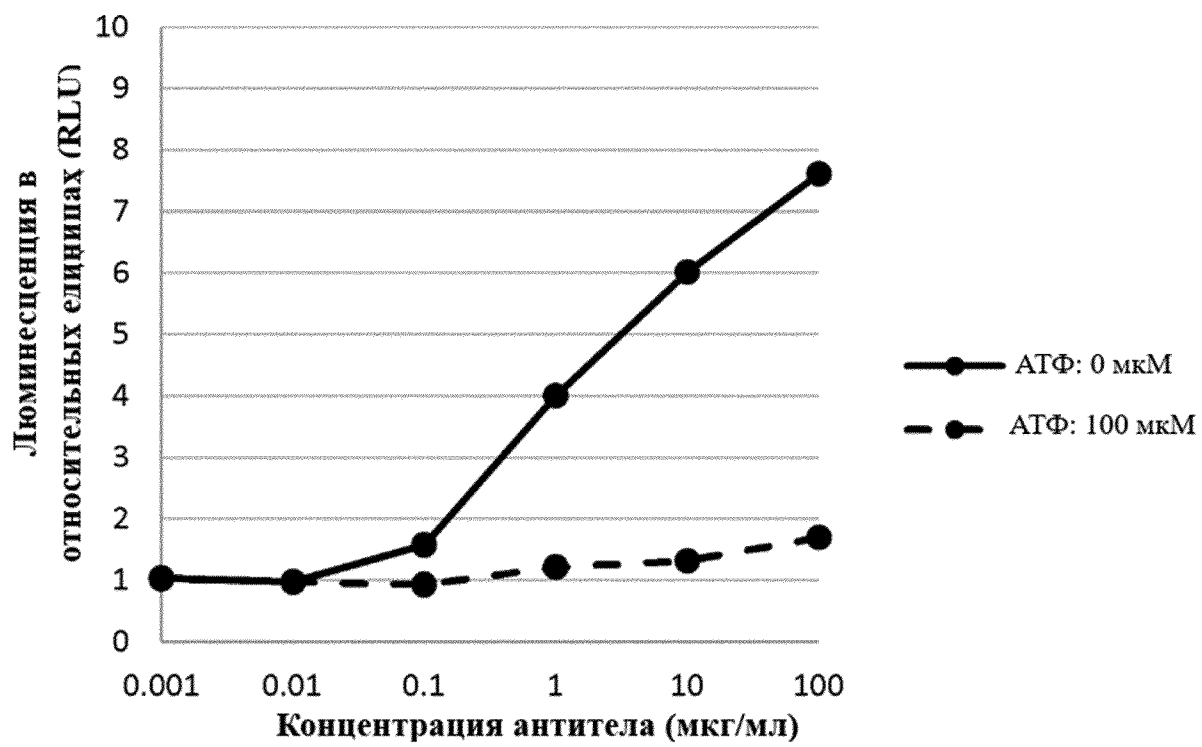
Фигура 26.



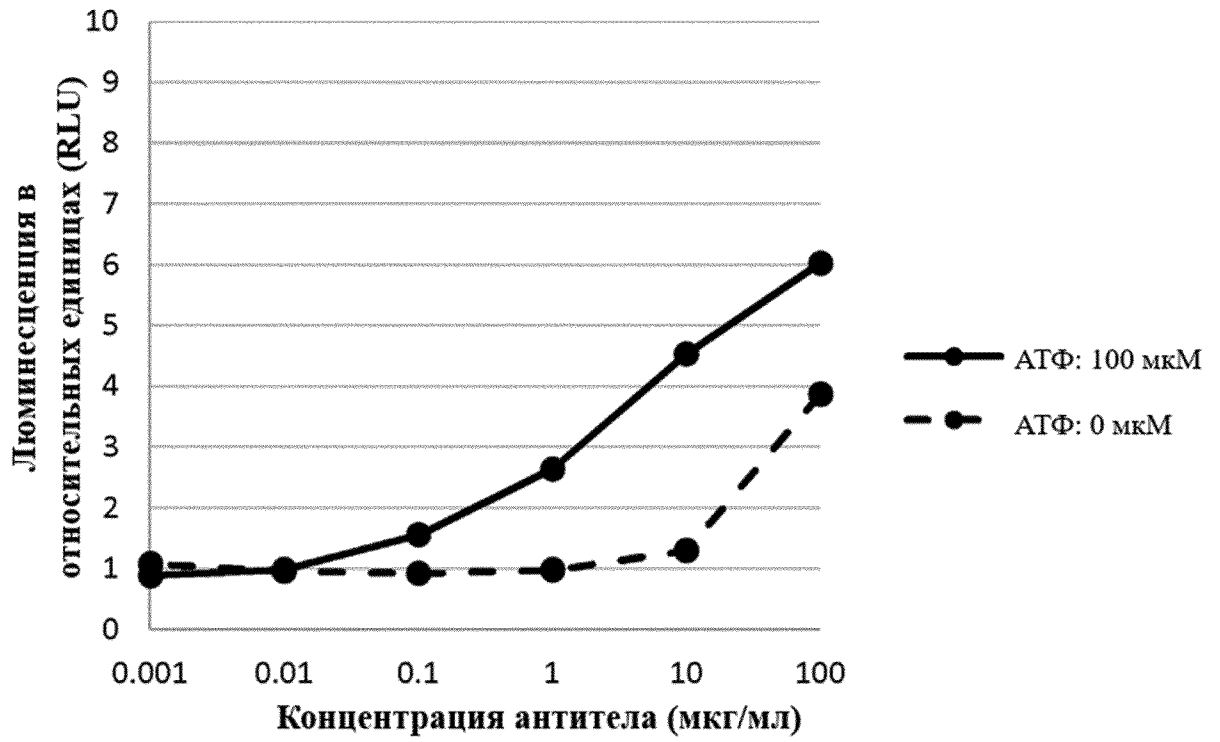
Фигура 27.



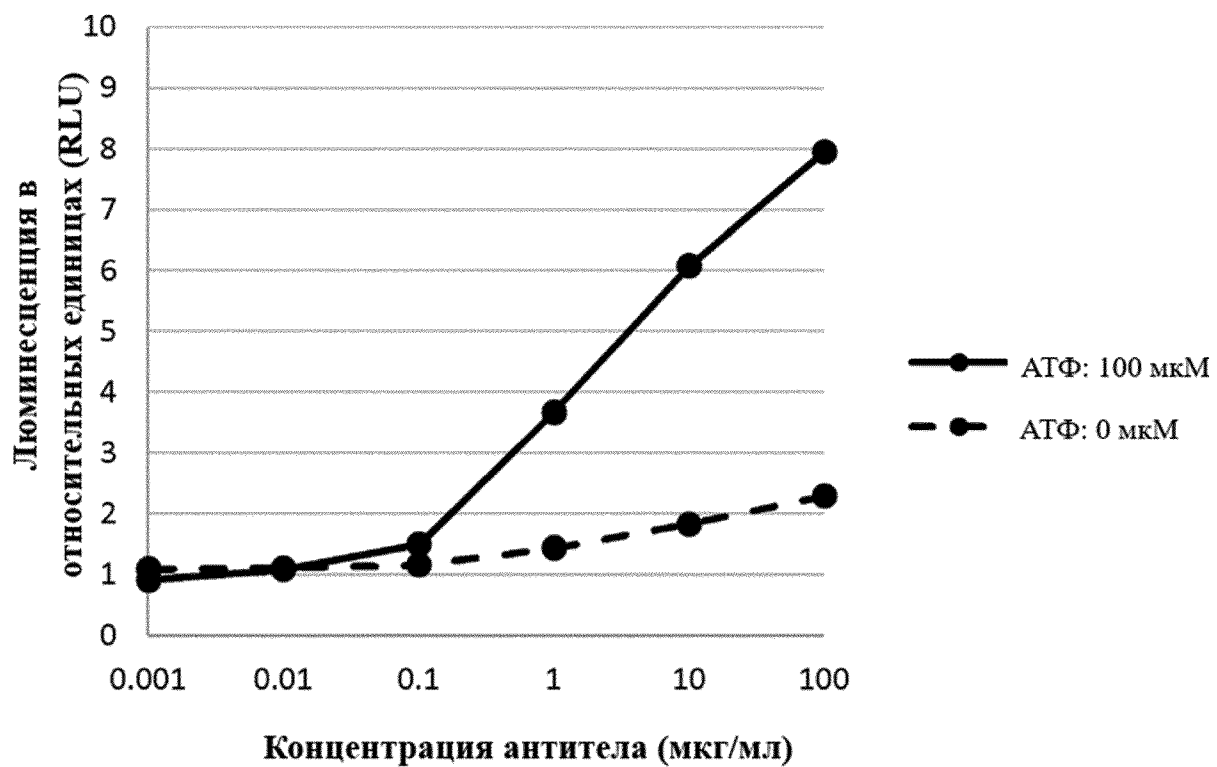
Фигура 28.



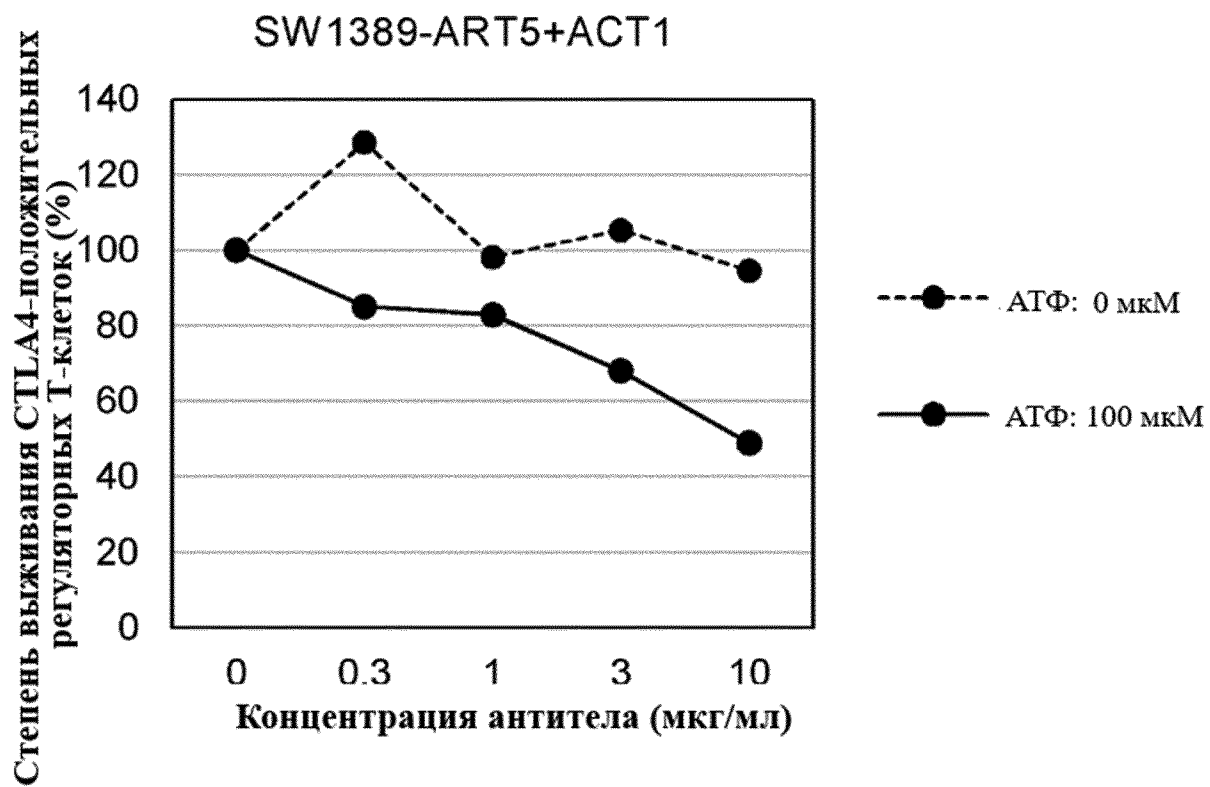
Фигура 29.



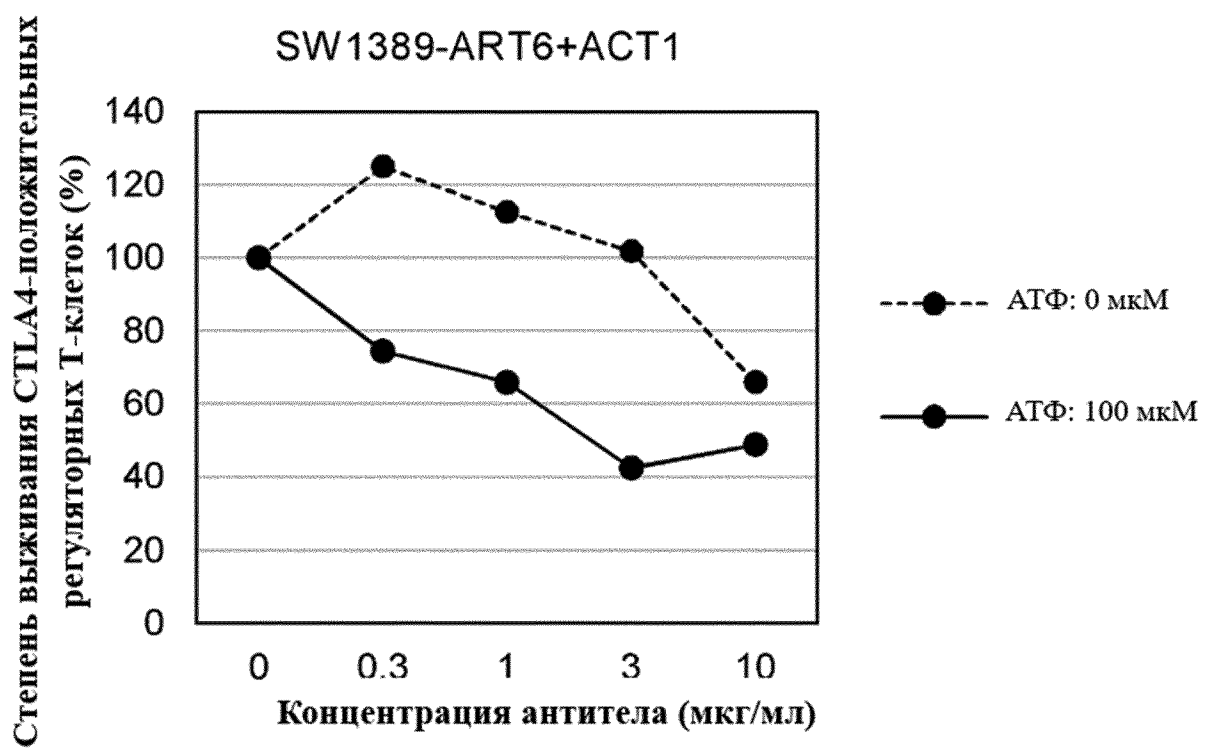
Фигура 30.



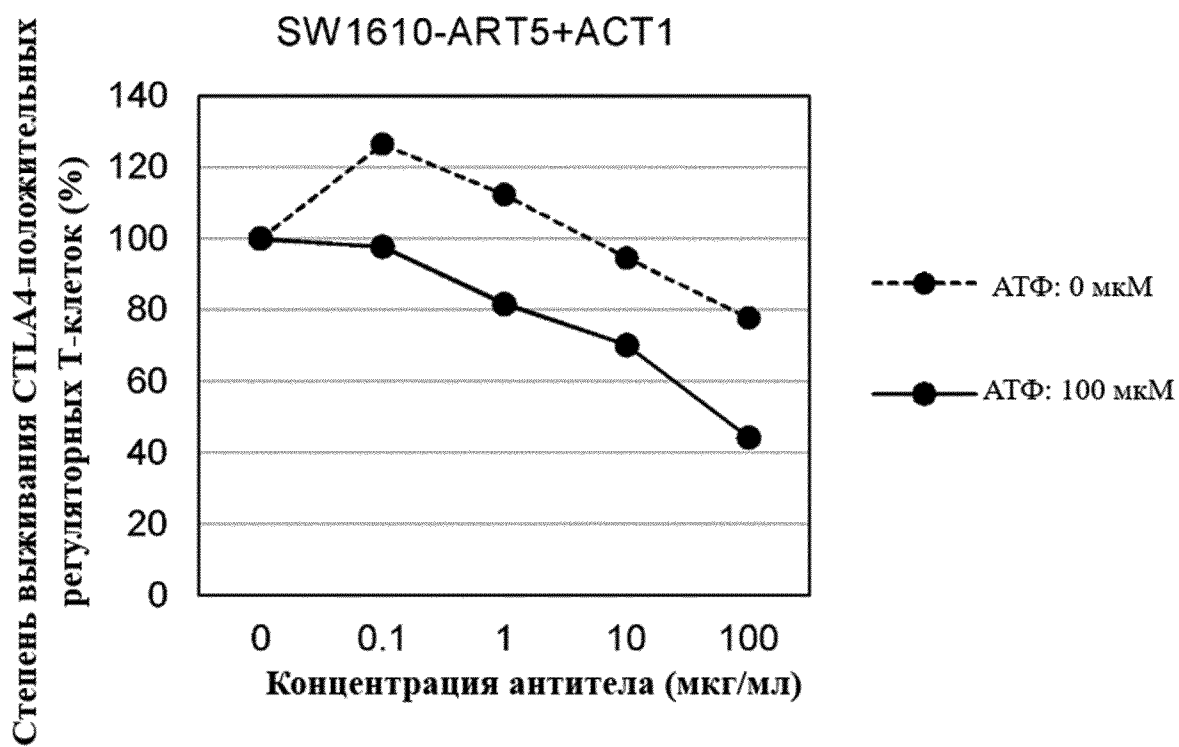
Фигура 31.



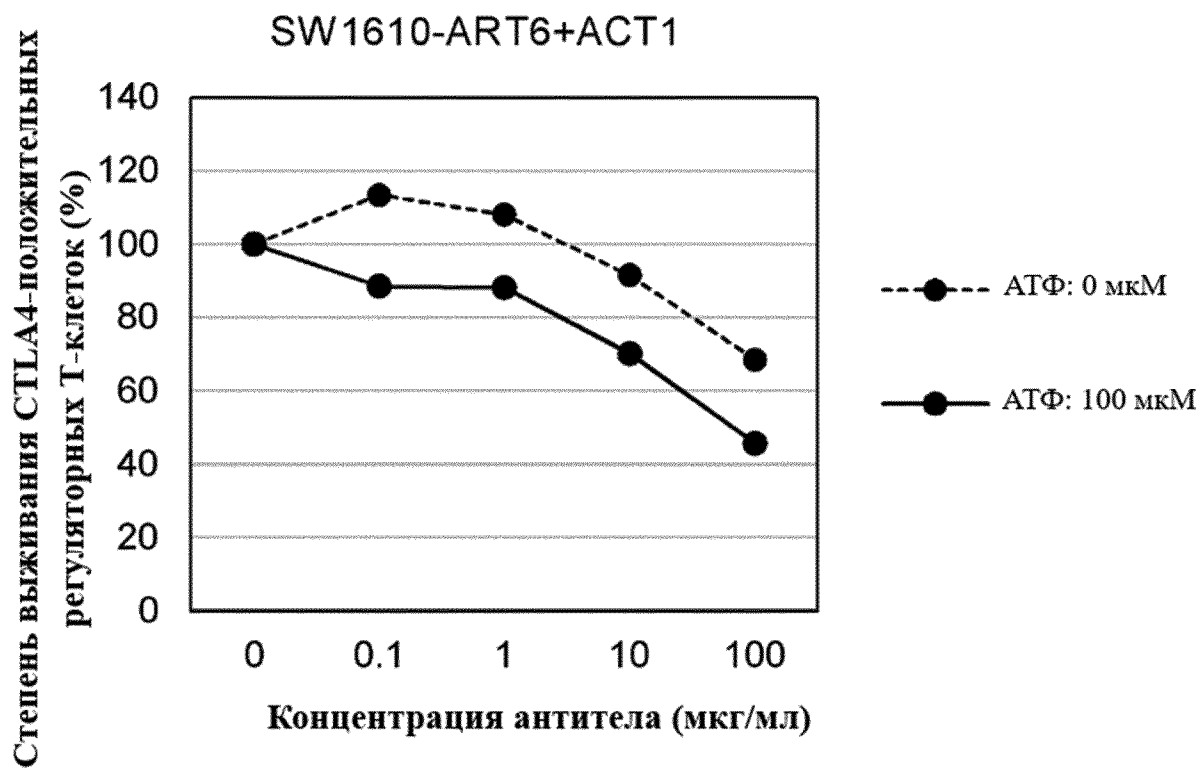
Фигура 32.



Фигура 33.



Фигура 34.



Фигура 35.