

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043382**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.22

(21) Номер заявки
201990875

(22) Дата подачи заявки
2017.11.02

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АКТИВИРУЕМЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ СТЛА-4 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **62/417,212**

(32) **2016.11.03**

(33) **US**

(43) **2019.09.30**

(86) **PCT/US2017/059740**

(87) **WO 2018/085555 2018.05.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ
КОМПАНИ; ЦИТОМИКС
ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Типтон Кимберли Энн, Уэст Джеймс
Уильям, Дешпанде Шрикант,
Энгельхардт Джон Дж. (US)**

(74) Представитель:
Угрюмов В.М. (RU)

(56) **WO-A2-2010081173
WO-A2-2016149201
EP-A1-3059319
WO-A1-2016115275**

JOSEPH M. RYAN ET AL.: "Enhancing the safety of antibody-based immunomodulatory cancer therapy without compromising therapeutic benefit: Can we have our cake and eat it too?", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, vol. 16, № 5, 25 February 2016 (2016-02-25), p. 655-674, XP055448265, ASHLEY, LONDON, GB, ISSN: 1471-2598, DOI: 10.1517/14712598.2016.1152256

DATABASE EMBASE [Online] ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, 1 January 2018 (2018-01-01), PRICE K.D. ET AL.: "Nonclinical safety evaluation of two distinct second generation variants of anti-CTLA4 monoclonal antibody, ipilimumab, in monkeys", XP002779024, database accession № EMB-620384233

DATABASE EMBASE [Online] ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, 1 July 2017 (2017-07-01), KORMAN A.J. ET AL.: "Next-generation anti-CTLA-4 antibodies", XP002779025, database accession № EMB-619155523

(57) Изобретение относится к активируемым антителам против СТЛА-4 человека, содержащим тяжелую цепь, содержащую домен VH, и легкую цепь, содержащую маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ) и домен VL. Такие активируемые антитела против СТЛА-4 человека обладают активностью связывания СТЛА-4 в микроокружении опухоли, где маскирующий фрагмент удаляется путем протеолитического расщепления расщепляемого фрагмента специфичными к опухоли протеазами, но демонстрируют значительно сниженное связывание с СТЛА-4 за пределами опухоли. Таким образом, активируемые антитела против СТЛА-4 человека по настоящему изобретению сохраняют противоопухолевую активность, уменьшая при этом побочные эффекты, связанные с активностью против СТЛА-4 вне опухоли.

B1**043382****043382****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По этой заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке США № 62/417,212, поданной 3 ноября 2016 г., которая включена сюда посредством отсылки во всей своей полноте.

Ссылка на список последовательностей

Представлена в электронном виде через EFS-WEB.

Содержание представленного в электронном виде списка последовательностей (название: 3338_059PC02_SeqListing.txt; размер: 527968 байт; и дата создания: 27 октября 2017 г.) включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Уровень техники

Иммунная система способна контролировать развитие опухоли и опосредовать регрессию опухоли. Это требует генерации и активации опухолевых антигенспецифических Т-клеток. Множественные Т-клеточные состимуляторные рецепторы и Т-клеточные отрицательные регуляторы или соингибирующие рецепторы действуют совместно, чтобы контролировать активацию, пролиферацию Т-клеток и усиление или потерю эффекторной функции. Одними из самых ранних и наиболее характерных для Т-клеток состимулирующих и соингибирующих молекул являются CD28 и CTLA-4. Rudd et al. (2009), *Immunol. Rev.*, 229:12. CD28 обеспечивает состимулирующие сигналы для вовлечения Т-клеточных рецепторов путем связывания с лигандами B7-1 и B7-2 на антигенпредставляющих клетках, тогда как CTLA-4 обеспечивает отрицательный сигнал, подавляющий пролиферацию и функцию Т-клеток. CTLA-4, который также связывает лиганды B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86), но с более высокой аффинностью, чем CD28, действует в качестве отрицательного регулятора функции Т-клеток как через клеточный автономный (или внутренний), так и клеточный не автономный (или внешний) пути. Внутренний контроль CD8 и CD4 Т-эффекторной (T_{eff}) функции опосредуется индуцибельной поверхностной экспрессией CTLA-4 в результате активации Т-клеток и ингибированием пролиферации Т-клеток и пролиферации цитокинов путем мультивалентного вовлечения лигандов B7 в противоположные клетки. Peggs et al. (2008), *Immunol. Rev.*, 224:141.

Антитела против CTLA-4, когда сшиты, подавляют функцию Т-клеток *in vitro*. Krummel & Allison (1995), *J. Exp. Med.*, 182:459; Walunas et al. (1994), *Immunity*, 1:405. Регуляторные Т-клетки (T_{reg}), которые конститутивно экспрессируют CTLA-4, контролируют эффекторные функции Т-клеток (T_{eff}) не-клеточным автономным способом. T_{reg} , имеющие дефицит CTLA-4, обладают нарушенной супрессионной способностью (Wing et al. (2008), *Science*, 322:271) и антитела, которые блокируют взаимодействие CTLA-4 с B7, могут ингибировать функцию T_{reg} (Read et al. (2000), *J. Exp. Med.*, 192:295; Quezada et al. (2006), *J. Clin. Invest.*, 116:1935). Совсем недавно было показано, что T_{eff} контролируют функцию Т-клеток через внешние пути (Corse & Allison (2012), *J. Immunol.*, 189:1123; Wang et al. (2012), *J. Immunol.*, 189:1118). Внешний контроль Т-клеточной функции с помощью T_{reg} и T_{eff} происходит через способность CTLA-4-положительных клеток удалять лиганды B7 на антигенпрезентирующих клетках, тем самым ограничивая их состимуляторный потенциал. Qureshi et al. (2011), *Science*, 332:600; Onishi et al. (2008), *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)*, 105:10113. Считается, что блокада антителами взаимодействий CTLA-4/B7 promотирует активацию T_{eff} , препятствуя отрицательным сигналам, передаваемым при взаимодействии CTLA-4; этот внутренний контроль активации и пролиферации Т-клеток может способствовать как пролиферации T_{eff} , так и T_{reg} (Krummel & Allison (1995), *J. Exp. Med.*, 182:459; Quezada et al. (2006), *J. Clin. Invest.*, 116:1935). В ранних исследованиях на животных моделях было показано, что блокада антителами CTLA-4 усиливает аутоиммунитет. Perrin et al. (1996), *J. Immunol.*, 157:1333; Hurwitz et al. (1997), *J. Neuroimmunol.*, 73:57. Расширение иммунитета против опухоли, способность анти-CTLA-4 вызывать регрессию установленных опухолей, является ярким примером терапевтического потенциала блокады CTLA-4. Leach et al. (1996), *Science*, 271:1734.

Антитела человека к CTLA-4 человека, ипилимумаб и тремелиумаб, были отобраны для ингибирования взаимодействий CTLA-4-B7 (Keler et al. (2003), *J. Immunol.*, 171:6251; Ribas et al. (2007), *Oncologist*, 12:873) и протестированы в различных клинических испытаниях на множественных злокачественных новообразованиях. Hoos et al. (2010), *Semin. Oncol.*, 37:533; Ascierto et al. (2011), *J. Transl. Med.*, 9:196. Часто наблюдались регрессии опухоли и стабилизация заболевания, и лечение этими антителами сопровождалось побочными эффектами с воспалительными инфильтратами, способными поражать различные системы органов. В 2011 г. в США и ЕС был одобрен ипилимумаб с константной областью IgG1 для лечения неоперабельной или метастатической меланомы на основании улучшения общей выживаемости в исследовании III фазы ранее пролеченных пациентов с прогрессирующей меланомой. Hodi et al. (2010), *N. Engl. J. Med.*, 363:711.

Однако лечение ипилимумабом затрудняется ограничивающей дозу токсичностью, такой как колит. Di Giacomo et al. (2010), *Seminars in Oncology*, 37:499. Соответственно существует потребность в улучшенных антителах против CTLA-4, таких как модифицированные формы ипилимумаба, с пониженной токсичностью, но с сопоставимой противоопухолевой эффективностью. Такие улучшенные антитела против CTLA-4 могут быть более эффективными противоопухолевыми агентами, чем разработанные антитела.

Краткое описание изобретения

В настоящем документе представлены активируемые антитела против CTLA-4 человека, содержащие тяжелую цепь, включающую домен VH, и легкую цепь, включающую маскирующий фрагмент (MM), расщепляемый фрагмент (CM) и домен VL. Такие активируемые антитела против CTLA-4 человека обладают активностью связывания CTLA-4 в микроокружении опухоли, где маскирующий фрагмент удаляется путем протеолитического расщепления расщепляемого фрагмента специфичными к опухоли протеазами, но демонстрирует значительно сниженное связывание с CTLA-4 за пределами опухоли. Таким образом, активируемые антитела против CTLA-4 человека по настоящему изобретению сохраняют противоопухолевую активность, уменьшая при этом побочные эффекты, связанные с активностью против CTLA-4 вне опухоли.

В настоящем документе представлены улучшенные антитела против CTLA-4, такие как улучшенный ипилимумаб, в частности активируемое антитело, которое при активации связывается с цитотоксическим Т-лимфоцитарным антигеном 4 (CTLA-4). В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело против CTLA-4 человека содержит

(i) тяжелую цепь, содержащую переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий

CDRH1: SYTMH (SEQ ID NO: 557);

CDRH2: FISYDGNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 558); и

CDRH3: TGWLGPFDY (SEQ ID NO: 559); и

(ii) легкую цепь, содержащую

(a) переменный домен легкой цепи (VL), содержащий

CDRL1: RASQSVGSSYLA (SEQ ID NO: 560);

CDRL2: GAFSRAT (SEQ ID NO: 561); и

CDRL3: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 562);

(b) расщепляемый фрагмент (CM); и

(c) маскирующий фрагмент (MM), в котором MM выбран из группы, состоящей из YV01 (SEQ ID NO: 1), YV02 (SEQ ID NO: 2), YV03 (SEQ ID NO: 3), YV04 (SEQ ID NO: 4), YV09 (SEQ ID NO: 9), YV23 (SEQ ID NO: 23), YV24 (SEQ ID NO: 24), YV35 (SEQ ID NO: 35), YV39 (SEQ ID NO: 39), YV51 (SEQ ID NO: 51), YV61 (SEQ ID NO: 60), YV62 (SEQ ID NO: 61), YV63 (SEQ ID NO: 62), YV64 (SEQ ID NO: 63), YV65 (SEQ ID NO: 64) и YV66 (SEQ ID NO: 65),

где легкая цепь имеет структурное расположение от N-конца до C-конца следующим образом: MM-CM-VL.

В некоторых вариантах выполнения изобретения CM представляет собой субстрат для протеазы, выбранный из группы, состоящей из MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP11, MMP13, MMP14, MMP17, легумина, матриптазы и uPA.

В некоторых вариантах выполнения изобретения CM выбран из группы, состоящей из 2001 (SEQ ID NO: 297), 2003 (SEQ ID NO: 298), 2005 (SEQ ID NO: 299), 2006 (SEQ ID NO: 300), 2007 (SEQ ID NO: 301), 2008 (SEQ ID NO: 302), 2009 (SEQ ID NO: 303), 2011 (SEQ ID NO: 304), 2012 (SEQ ID NO: 305), 3001 (SEQ ID NO: 306), 3006 (SEQ ID NO: 307), 3007 (SEQ ID NO: 308), 3008 (SEQ ID NO: 309), 3009 (SEQ ID NO: 310), 3011 (SEQ ID NO: 311) и 3012 (SEQ ID NO: 312).

В некоторых вариантах выполнения изобретения MM представляет собой YV04 (SEQ ID NO: 4), YV23 (SEQ ID NO: 23), YV24 (SEQ ID NO: 24), YV39 (SEQ ID NO: 39), YV61 (SEQ ID NO: 60), YV62 (SEQ ID NO: 61), YV63 (SEQ ID NO: 62) или YV64 (SEQ ID NO: 63).

В некоторых вариантах выполнения изобретения MM представляет собой YV39 (SEQ ID NO: 39).

В некоторых вариантах выполнения изобретения CM представляет собой 2001 (SEQ ID NO: 297), 2011 (SEQ ID NO: 304) или 2012 (SEQ ID NO: 305).

В некоторых вариантах выполнения изобретения CM представляет собой 2011 (SEQ ID NO: 304).

В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело против CTLA-4 человека содержит

(i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 345; и

(ii) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 563, 564 и 565.

Активируемое антитело против CTLA-4 человека (см. выше) содержит

(i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 345; и

(ii) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 564.

Активируемое антитело против CTLA-4 человека (см. выше) содержит

(i) тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 350 константного домена IgG1 человека; и

(ii) легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 346 константного каппа домена легкой цепи человека.

В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело против CTLA-4 человека дополнительно содержит первый линкерный пептид (LP1) между MM и CM или между CM и VL.

В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело против CTLA-4 человека

дополнительно содержит второй линкерный пептид (LP2), где активируемое антитело против CTLA-4 человека имеет структурное расположение от N-конца к С-концу MM-LP1-CM-LP2-VL или MM-LP2-CM-LP1-VL.

В некоторых вариантах выполнения изобретения LP1 и LP2 не идентичны друг другу.

В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело против CTLA-4 человека дополнительно содержит спейсер и имеет структурное расположение от N-конца к С-концу, спейсер-MM-CM-VL.

В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело против CTLA-4 человека содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 353; и

легкая цепь, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 448.

В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело против CTLA-4 человека конъюгировано с токсическим агентом, причем активируемое антитело против CTLA-4 человека содержит

(i) тяжелую цепь, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий

CDRH1: SYTMH (SEQ ID NO: 557);

CDRH2: FISYDGNNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 558); и

CDRH3: TGWLGPFDY (SEQ ID NO: 559); и

(ii) легкую цепь, содержащую

(a) вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий

CDRL1: RASQSVGSSYLA (SEQ ID NO: 560);

CDRL2: GAFSRAT (SEQ ID NO: 561); и

CDRL3: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 562);

(b) расщепляемый фрагмент (CM); и

(c) маскирующий фрагмент (MM), в котором MM выбран из группы, состоящей из YV01 (SEQ ID NO: 1), YV02 (SEQ ID NO: 2), YV03 (SEQ ID NO: 3), YV04 (SEQ ID NO: 4), YV09 (SEQ ID NO: 9), YV23 (SEQ ID NO: 23), YV24 (SEQ ID NO: 24), YV35 (SEQ ID NO: 35), YV39 (SEQ ID NO: 39), YV51 (SEQ ID NO: 51), YV61 (SEQ ID NO: 60), YV62 (SEQ ID NO: 61), YV63 (SEQ ID NO: 62), YV64 (SEQ ID NO: 63), YV65 (SEQ ID NO: 64) и YV66 (SEQ ID NO: 65), и

где легкая цепь имеет структурное расположение от N-конца до С-конца следующим образом: MM-CM-VL.

В некоторых вариантах выполнения изобретения токсический агент конъюгирован с активируемым антителом через расщепляемый линкер.

В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело против CTLA-4 человека дополнительно содержит детектируемый фрагмент.

В некоторых вариантах выполнения изобретения детектируемый фрагмент представляет собой диагностический агент.

Заявленное изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим активируемое антитело против CTLA-4 человека и носитель.

В некоторых вариантах выполнения изобретения фармацевтическая композиция содержит дополнительный терапевтический агент.

Изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь и легкую цепь активируемого антитела против CTLA-4 человека.

Изобретение относится к вектору, содержащему выделенную молекулу нуклеиновой кислоты.

Изобретение относится к способу получения активируемого антитела против CTLA-4 человека, включающему

(i) культивирование клетки, содержащей (a) вектор по (см. выше) или (b) вектор, содержащий изолированную нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь активированного антитела против CTLA-4 (см. выше), и отдельный вектор, содержащий изолированную нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь активированного антитела против CTLA-4 (см. выше), в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела; и

(ii) выделение активируемого антитела.

Изобретение относится к способу снижения активности CTLA-4 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции.

Изобретение относится к способу лечения, ослабления симптома или задержки прогрессирования солидной опухоли у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах выполнения изобретения солидная опухоль представляет собой рак мочевого пузыря, рак кости, рак молочной железы, карциноид, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак эндометрия, глиому, рак головы и шеи, рак печени, рак легкого, лимфому, меланому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, саркому, рак кожи, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак мочеполовой системы или рак уротелия.

В некоторых вариантах выполнения изобретения солидная опухоль представляет собой меланому.

Активируемые антитела против CTLA-4 по изобретению активируются, когда расщепляемый фрагмент расщепляется протеазой. В некоторых вариантах выполнения изобретения протеаза продуцируется опухолью, которая находится вблизи Т-клеток, которые экспрессируют CTLA-4. В некоторых вариантах выполнения изобретения протеаза продуцируется опухолью, которая локализована совместно с Т-клетками, которые экспрессируют CTLA-4. В некоторых вариантах выполнения изобретения протеаза выбрана из группы протеаз, представленной в табл. 1, представленной ниже. В некоторых вариантах выполнения изобретения протеаза выбрана из группы, состоящей из матричной металлопротеазы (ММР), тромбина, нейтрофильной эластазы, цистеиновой протеазы, легумаина и сериновой протеазы, такой как матриптаза или урокиназа (uPA). В некоторых вариантах выполнения изобретения протеаза выбрана из группы, состоящей из MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP11, MMP13, MMP14, MMP17, легумаина, матриптазы и uPA или комбинации одной или нескольких таких протеаз. В некоторых вариантах выполнения изобретения CM расщепляется матриксной металлопротеазой (ММР) и сериновой протеазой. В некоторых вариантах выполнения изобретения CM расщепляется матричной металлопротеазой (ММР), сериновой протеазой и легумаином.

Таблица 1

Типичные протеазы и/или ферменты

ADAMS, ADAMTS, <i>напр.</i>	Цистеиновые протеиназы, <i>напр.</i> ,	Сериновые протеазы, <i>напр.</i> ,
ADAM8	Крузипаин	активированный протеин С
ADAM9	Легумаин	Катепсин А
ADAM10	Отубаин-2	Катепсин G
ADAM12		Химаза
ADAM15	KLK, <i>напр.</i> ,	протеазы факторов свертываемости
ADAM17/TACE	KLK4	(<i>напр.</i> , FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa)
ADAMDEC1	KLK5	Эластаза
ADAMTS1	KLK6	Гранзим В
ADAMTS4	KLK7	Гуанидинобензоатаза
ADAMTS5	KLK8	HtrA1
	KLK10	

Аспартатные протеазы, <i>напр.</i> , BACE	KLK11	Нейтрофильная Эластаза Человека
Ренин	KLK13	Лактоферрин
	KLK14	Марапсин
Аспарагиновые катепсины, <i>напр.</i> , Катепсин D Катепсин E	Металло протеиназы, <i>напр.</i> , Меприн Неприлизин PSMA BMP-1	NS3/4A PACE4 Плазмин PSA tPA Тромбин Триптаза uPA
Каспазы, <i>напр.</i> , Каспаза 1 Каспаза 2 Каспаза 3 Каспаза 4		
	MMP, <i>напр.</i> , MMP1 MMP2	
Каспаза 5 Каспаза 6 Каспаза 7 Каспаза 8 Каспаза 9 Каспаза 10 Каспаза 14	MMP3 MMP7 MMP8 MMP9 MMP10 MMP11 MMP12	Трансмембранные Сериновые Протеазы Типа II (TTSPs), <i>напр.</i> , DESC1 DPP-4 FAP Гепсин Матриптаза-2 MT-SP1/Матриптаза TMPRSS2 TMPRSS3
Цистеиновые Катепсины, <i>напр.</i> , Катепсин B Катепсин C Катепсин K Катепсин L Катепсин S Катепсин V/L2 Катепсин X/Z/P	MMP13 MMP14 MMP15 MMP16 MMP17 MMP19 MMP20 MMP23 MMP24 MMP26 MMP27	TMPSRSS4

Заявленное изобретение относится к активируемым антителам против CTLA-4, которые дополнительно содержат один или несколько линкерных пептидов. В некоторых вариантах выполнения изобретения линкерный пептид находится между MM и CM. В некоторых вариантах выполнения изобретения линкерный пептид находится между CM и VL. В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело содержит первый линкерный пептид (LP1) и второй линкерный пептид (LP2). В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, так что легкая цепь имеет структурное расположение от N-конца до C-конца легкой цепи MM-LP1-CM-LP2-VL. В некоторых вариантах выполнения изобретения LP1 и LP2 не являются идентичными друг другу. В некоторых вариантах выполнения изобретения LP1 и LP2 идентичны друг другу. В некоторых вариантах выполнения изобретения, продомен содержит MM-LP1-CM-LP2.

В некоторых вариантах выполнения изобретения LP1 и/или LP2 содержат глицин-сериновый полимер. В некоторых вариантах выполнения изобретения LP1 и/или LP2 содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)_n (SEQ ID NO: 532), (GGS)_n (SEQ ID NO: 533), (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 534) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 535), где n является целым числом, по меньшей мере, единицей. В некоторых вариантах выполнения изобретения LP1 содержит аминокислотную последовательность GGGSSGGS (SEQ ID NO: 542). В некоторых вариантах выполнения изобретения LP2 содержит аминокислотную последовательность GGGS (SEQ ID NO: 543).

Заявленное изобретение относится к активируемым антителам против CTLA-4, которые также содержат спейсер. В некоторых вариантах выполнения изобретения спейсер соединен непосредственно с MM и имеет структурное расположение от N-конца до C-конца следующим образом: спейсер-MM-CM-VL. В некоторых вариантах выполнения изобретения спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из QGQSGQG (SEQ ID NO: 544), QGSGQG (SEQ ID NO: 545), QGQSGS (SEQ ID NO: 546), QGQSGQ (SEQ ID NO: 547), QSGQG (SEQ ID NO: 548), QGSGS (SEQ ID NO: 549), QGQSG (SEQ ID NO: 550), SGQG (SEQ ID NO: 551), QSGS (SEQ ID NO: 552), QGQS (SEQ ID NO: 553), QQG, SGS, QGQ, QG, GS, G, S и Q. В некоторых вариантах выполнения изобретения спейсер и MM содержат аминокислотную последовательность QGQSGSCRTQLYGYNLCPY (SEQ ID NO: 556).

Заявленное изобретение относится к активируемым антителам, которые содержат токсический

агент, такой как доластатин, ауристатин, ауристатин Е, монометилауристатин Е (ММАЕ), майтансиноид, дуокармицин, калихеамицин, пирролобензодиазепин или их производное. В некоторых вариантах выполнения изобретения токсический агент конъюгирован с активируемым антителом через линкер. В некоторых вариантах выполнения изобретения линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах выполнения изобретения линкер представляет собой нерасщепляемый линкер.

Заявленное изобретение относится к активируемым антителам против CTLA-4, которые содержат детектируемый фрагмент. В некоторых вариантах выполнения изобретения детектируемый фрагмент представляет собой диагностический агент.

Заявленное изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим активируемое антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе. В некоторых вариантах выполнения изобретения фармацевтическая композиция содержит дополнительный терапевтический агент.

Заявленное изобретение относится к изолированным молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим тяжелую и/или легкую цепи активируемых антител против CTLA-4, описанных в настоящем документе, векторам, которые содержат одну или несколько изолированных молекул нуклеиновой кислоты, и способам получения активируемого антитела путем культивирования клетки, содержащей вектор или векторы, в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела.

Заявленное изобретение относится к способам получения активируемого антитела, включающим

(a) культивирование клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, которая кодирует активируемое антитело, описанное в настоящем документе, в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела; и

(b) восстановление активируемого антитела.

Заявленное изобретение относится к способам снижения активности CTLA-4, включающим введение эффективного количества активируемого антитела, описанного в настоящем документе, или фармацевтических композиций, содержащих активируемое антитело против CTLA-4, описанных в настоящем документе, субъекту, нуждающемуся в этом.

Заявленное изобретение относится к способам лечения, облегчения симптома или задержки прогрессирования расстройства, связанного с CTLA-4, включающим введение терапевтически эффективного количества активируемых антител, описанных в настоящем документе, или фармацевтических композиций, содержащих активируемое антитело против CTLA-4, описанных в настоящем документе, субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах выполнения изобретения расстройство, связанное с CTLA-4, представляет собой рак. В некоторых вариантах выполнения изобретения рак представляет собой меланому, такую как неоперабельная или метастатическая меланома, рак молочной железы, колоректальный рак, рак желудка, глиобластома, рак головы и шеи, рак легких, рак яичников, рак эндометрия, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак почки, саркому или рак кожи. В некоторых вариантах выполнения изобретения расстройство, связанное с CTLA-4, представляет собой расстройство, о котором известно, что его можно лечить ипилимумабом.

В тех случаях, когда аспекты или варианты выполнения изобретения описаны в терминах группы Маркуша или другой группировки альтернатив, настоящее изобретение охватывает не только всю группу, перечисленную в целом, но также каждого члена группы в отдельности и все возможные подгруппы основной группы, а также когда в основной группе отсутствует один или несколько членов группы. Настоящее изобретение также предусматривает явное исключение одного или нескольких членов группы в заявленном изобретении.

Краткое описание чертежей/фигур

На фиг. 1A-1C показаны объемы опухолей в зависимости от дней после имплантации опухоли мышам (n=10), которым вводили (i) неродственное антитело IgG2a мыши (фиг. 1A), (ii) антитело IgG2a мыши против CTLA-4 (9D9) (фиг. 2B) или (iii) активируемое антитело 9D9 (фиг. 1C). Все антитела и активируемые антитела дозировали в дозе 25 мкг/мышь. Активируемое антитело 9D9 содержит MY11 (SEQ ID NO: 294) в качестве маскирующего фрагмента и 2001 (SEQ ID NO: 297) в качестве расщепляемого фрагмента. "TF" обозначает количество мышей без опухолей в конце каждого эксперимента. Неродственное антитело IgG2a мыши и антитело IgG2a мыши против CTLA-4 (9D9) использовали в качестве контролей.

На фиг. 2A-2C показана частота регуляторных Т-клеток в опухоли (фиг. 2A) и пролиферация и активация регуляторных Т-клеток в селезенке (фиг. 2B и 2C) мышей, получавших разные активируемые антитела IgG2a мыши против CTLA-4 (9D9). Различные активируемые антитела 9D9 содержат (i) либо MY03 (SEQ ID NO: 293), либо MY11 (SEQ ID NO: 294) в качестве маскирующего фрагмента и (2) 0003 (SEQ ID NO: 320), 1004 (SEQ ID NO: 323) или 2001 (SEQ ID NO: 297) в качестве расщепляемого фрагмента. Неродственное антитело IgG2a мыши ("DT 1D12 mg2a") и антитело IgG2a мыши против CTLA-4 (9D9) ("9D9 mg2a") использовали в качестве контролей. На фиг. 2A частота регуляторных Т-клеток показана в процентах от общего количества CD4+ Т-клеток, которые являются Foxp3+ в опухоли. На фиг. 2B и 2C показана частота пролиферирующих (Ki-67+) и активированных (ICOS+) регуляторных Т-клеток в процентах от Foxp3+ Т-клеток в селезенке соответственно.

На фиг. 3A-3E показана способность различных активируемых антител против CTLA-4 (изотипа

IgG1 человека) связываться с CTLA-4 человека, как измерено *in vitro* с помощью анализа связывания ELISA. Ипилимумаб ("YV1") использовали в качестве контроля во всех экспериментах. На фиг. 3А активируемые антитела против CTLA-4 содержат YV04 (SEQ ID NO: 4), YV06 (SEQ ID NO: 6), YV09 (SEQ ID NO: 9) или YV23 (SEQ ID NO: 23) в качестве маскирующего фрагмента. На фиг. 3В активируемые антитела против CTLA-4 содержат YV27 (SEQ ID NO: 27), YV29 (SEQ ID NO: 29), YV32 (SEQ ID NO: 32) или YV33 (SEQ ID NO: 33) в качестве маскирующего фрагмента. На фиг. 3С активируемые антитела против CTLA-4 содержат YV35 (SEQ ID NO: 35) или YV41 (SEQ ID NO: 41) в качестве маскирующего фрагмента. На фиг. 3D активируемые антитела против CTLA-4 содержат YV24 (SEQ ID NO: 24), YV39 (SEQ ID NO: 39), YV51 (SEQ ID NO: 51), YV52 (SEQ ID NO: 52) или YV53 (SEQ ID NO: 53) в качестве маскирующего фрагмента. На фиг. 3Е активируемые антитела против CTLA-4 содержат YV54 (SEQ ID NO: 54), YV55 (SEQ ID NO: 55), YV56 (SEQ ID NO: 56), YV57 (SEQ ID NO: 57) или YV58 (SEQ ID NO: 58) в качестве маскирующего фрагмента. На фиг. 3А-3Е все активируемые антитела против CTLA-4 содержат 2001 (SEQ ID NO: 297) в качестве расщепляемого фрагмента.

На фиг. 4А-4D показана способность дополнительных активируемых антител против CTLA-4 (изотипа IgG1 человека) связываться с CTLA-4 человека, как измерено *in vitro* с помощью анализа связывания ELISA. Ипилимумаб ("YV1") использовали в качестве контроля во всех экспериментах. На фиг. 4А активируемые антитела против CTLA-4 содержат YV04, YV06, YV09, YV23, YV27 или YV29 в качестве маскирующего фрагмента. На фиг. 4В активируемые антитела против CTLA-4 содержат YV32, YV33, YV35 или YV41 в качестве маскирующего фрагмента. На фиг. 4С активируемые антитела против CTLA-4 содержат YV24, YV39, YV51, YV52 или YV53 в качестве маскирующего фрагмента. На фиг. 4D активируемые антитела против CTLA-4 содержат YV54, YV55, YV56, YV57 или YV58 в качестве маскирующего фрагмента. На фиг. 4А-4D все активируемые антитела против CTLA-4 содержат 3001 в качестве расщепляемого фрагмента.

На фиг. 5А-5F показана способность нескольких активируемых антител против CTLA-4 (изотипа IgG2а мыши) связываться с CTLA-4 человека, как измерено *in vitro* с помощью анализа связывания ELISA. Ипилимумаб ("YV1") использовали в качестве контроля. На фиг. 5А активируемые антитела против CTLA-4 содержат YV04 в качестве маскирующего фрагмента и 2001 (SEQ ID NO: 297), 2006 (SEQ ID NO: 300), 2007 (SEQ ID NO: 301), 2008 (SEQ ID NO: 302) или 2009 (SEQ ID NO: 303) в качестве расщепляемого фрагмента. На фиг. 5В активируемые антитела против CTLA-4 содержат YV04 или YV23 в качестве маскирующего фрагмента и 2001, 2006, 2007, 2008 или 2009 в качестве расщепляемого фрагмента. На фиг. 5С активируемые антитела против CTLA-4 содержат YV39 в качестве маскирующего фрагмента и 2001, 2006, 2008 или 2009 в качестве расщепляемого фрагмента. На фиг. 5D активируемые антитела против CTLA-4 содержат YV61 (SEQ ID NO: 60), YV62 (SEQ ID NO: 61), YV63 (SEQ ID NO: 62), YV64 (SEQ ID NO: 63) или YV39 (SEQ ID NO: 39) в качестве маскирующего фрагмента и 2001 или 2012 в качестве расщепляемого фрагмента. На фиг. 5Е активируемые антитела против CTLA-4 содержат YV65 (SEQ ID NO: 64), YV66 (SEQ ID NO: 65), YV01 (SEQ ID NO: 1), YV02 (SEQ ID NO: 2) или YV39 (SEQ ID NO: 39) в качестве маскирующего фрагмента и 2001 или 2012 в качестве расщепляемого фрагмента. На фиг. 5F активируемые антитела против CTLA-4 содержат YV39 или YV03 (SEQ ID NO: 3) в качестве маскирующего фрагмента и 2001 или 2012 в качестве расщепляемого фрагмента.

На фиг. 6А и 6В сравнивается способность активируемых антител против CTLA-4, имеющих либо изотип IgG2а мыши (фиг. 6А), либо изотип IgG1 человека (фиг. 6В), связываться с CTLA-4 человека, как измерено *in vitro* с помощью анализа связывания ELISA. Ипилимумаб ("YV1") использовали в качестве контроля. На обеих фиг. 6А и 6В, активируемые антитела против CTLA-4 содержат YV39 в качестве маскирующего фрагмента и 2001, 2008, 2011 или 2012 в качестве расщепляемого фрагмента. В модифицированном антителе по изобретению (YV39-NSUB) расщепляемый фрагмент был заменен устойчивым к протеазе линкером ("NSUB"), содержащим аминокислотную последовательность GSGSGSGSGSGGS (SEQ ID NO: 570).

На фиг. 7А-7D показана способность различных активируемых антител против CTLA-4 связывать 58 $\alpha\beta$ -клетки, сверхэкспрессирующие CTLA-4 человека, при измерении с помощью проточной цитометрии. Связывание представлено в виде условных единиц флуоресценции (среднее значение интенсивности флуоресценции, MFI, или среднее геометрическое интенсивности флуоресценции, gMFI) в зависимости от концентрации добавленного антитела против CTLA-4. На фиг. 7А активируемые антитела против CTLA-4 содержат YV04, YV23, YV24 или YV39 в качестве маскирующего фрагмента и 2001 в качестве расщепляемого фрагмента. На фиг. 7В активируемые антитела против CTLA-4 содержат YV61, YV62, YV64 или YV39 в качестве маскирующего фрагмента и 2001 или 2011 в качестве расщепляемого фрагмента. На фиг. 7С активируемые антитела против CTLA-4 содержат YV39 в качестве маскирующего фрагмента и для расщепляемого фрагмента, 2011 ("Ipi YV39 2011") или три варианта Ipi YV39 2011: (i) моноскрепленное ("Ipi YV39 MMP моноскрепленное"), (ii) полностью скрепленное MMP ("Ipi YV39 MMP") или (iii) полностью скрепленное uPA ("Ipi YV39 2011 uPA"). На фиг. 7D представлены значения EC₅₀ для различных активируемых антител, показанных на фиг. 7С. Ипилимумаб использовали в качестве контроля для фиг. 7А-7D.

На фиг. 8 показана активность активируемого антитела против CTLA-4, содержащего YV39 в каче-

стве маскирующего фрагмента и 2011 в качестве расщепляемого фрагмента ("Ipi YV39 2011") (квадрат) при различных концентрациях, как измерено *in vitro* с помощью анализа SEB (стафилококковый энтеротоксин В).

Активность антител показана через продукцию IL-2 PBMC человека после стимуляции SEB. В качестве контроля использовали неродственный изотип IgG1 человека (треугольник), ипилимумаб (кружок) и стимуляцию только SEB (обозначение "х").

На фиг. 9A-9F показан объем опухоли в зависимости от дней после имплантации опухоли мышам с CTLA-4 человека (n=10), которым вводили разные активируемые антитела против CTLA-4 человека (изотип IgG2a мыши), дозированные один раз в дозе 10 мг/кг. В качестве контролей использовали неродственное антитело IgG2a мыши (фиг. 9A) и ипилимумаб с изотипом IgG2a мыши (фиг. 9B). На фиг. 9C-9F активируемые антитела содержат YV04, YV23, YV24 и YV39 соответственно в качестве маскирующего фрагмента и 2001 в качестве расщепляемого фрагмента.

На фиг. 10A-10F показан объем опухоли в зависимости от дней после имплантации опухоли мышам с CTLA-4 человека (n=10), которым вводили разные активируемые антитела против CTLA-4 человека (изотип IgG1 человека). Антитела вводили один раз в дозе 200 мкг/мышь на 7-й день после имплантации. В качестве контролей использовали неродственное антитело IgG1 человека (фиг. 10A) и ипилимумаб с изотипом IgG1 человека (фиг. 10B). На фиг. 10C-10F, активируемые антитела содержат YV39 в качестве маскирующего фрагмента и 2001, 2012, 2011 или 2008 в качестве расщепляемого фрагмента. Расщепляемые фрагменты 2012, 2011 и 2008 были модифицированы для преодоления сайта деамидирования в 2001.

На фиг. 11A-11G показан объем опухоли в зависимости от дней после имплантации опухоли мышам с CTLA-4 (n=16), которым вводили разные дозы активируемого антитела против CTLA, содержащего YV39 в качестве маскирующего фрагмента и 2011 в качестве расщепляемого фрагмента ("Ipi YV39 2011") (фиг. 11E-11G). Антитело вводили один раз в дозе 10 мг/кг (фиг. 11E), 3 мг/кг (фиг. 11F) или 1 мг/кг (фиг. 11G) на 7-й день после имплантации опухоли. Контрольным животным вводили ипилимумаб (10, 3 или 1 мг/кг; фиг. 11B-11D соответственно) или неродственное антитело IgG1 человека (фиг. 11A).

На фиг. 12A-12D показана частота регуляторных Т-клеток в опухоли (фиг. 12A и 12B) или селезенке (фиг. 12C и 12D) у мышей с CTLA-4 человека (n=10), получавших разные активируемые антитела против CTLA-4 человека с изотипом IgG2a мыши. Все антитела дозировали один раз в дозе 10 мг/кг. Активируемые антитела содержат YV04, YV23, YV24 или YV39 в качестве маскирующего фрагмента и 2001 - в качестве расщепляемого фрагмента. Метки на абсциссах фиг. 12C и 12D также относятся к фиг. 12A и 12B соответственно. В качестве контроля использовали неродственное антитело IgG1 человека и ипилимумаб с изотипом IgG2a мыши. На фиг. 12A и 12C частота регуляторных Т-клеток показана в процентах от общего количества CD4⁺ Т-клеток, которые представляют собой Foxp3⁺. На фиг. 12B и 12D частота регуляторных Т-клеток показана в процентах от общего количества CD45⁺ Т-клеток, которые представляют собой Foxp3⁺. На фиг. 12E и 12F показана частота активированных (ICOS⁺) клеток и пролиферирующих (Ki-67⁺) клеток в процентах от регуляторных Т-клеток в селезенке.

На фиг. 13A-13C показана частота регуляторных Т-клеток в опухоли (фиг. 13A и 13B) или селезенке (фиг. 13C) у мышей с CTLA-4 человека, которым вводили активируемое антитело против CTLA-4. Используемое активируемое антитело содержит YV39 в качестве маскирующего фрагмента и имело либо изотип IgG2a мыши, либо изотип IgG1 человека. В качестве контроля использовали неродственное антитело IgG1 человека и ипилимумаб с изотипом IgG1 человека. На фиг. 13A и 13C частота регуляторных Т-клеток показана в процентах от общего количества CD4⁺ Т-клеток, которые представляют собой Foxp3⁺. На фиг. 13B частота регуляторных Т-клеток показана в процентах от общего количества CD45⁺ Т-клеток, которые представляют собой Foxp3⁺. На фиг. 13D и 13E показана частота пролиферирующих (Ki-67⁺) и активированных (ICOS⁺) клеток в процентах от регуляторных Т-клеток в селезенке.

На фиг. 14A-14C показана частота регуляторных Т-клеток (фиг. 14A и 14B) или CD4⁺ эффекторных Т-клеток (фиг. 14C) в опухолях мышей, которым вводили различные активируемые антитела против CTLA-4. На фиг. 14D и 14E показаны регуляторные Т-клетки в селезенке. Активируемые антитела против CTLA-4 содержат YV39 в качестве маскирующего фрагмента и 2012, 2011, 2008 или 2001 в качестве расщепляемого фрагмента. В качестве контроля использовали неродственное антитело IgG1 человека и ипилимумаб с изотипом IgG1 человека. На фиг. 14A и 14D частота регуляторных Т-клеток показана в процентах от общего количества CD4⁺ Т-клеток, которые представляют собой Foxp3⁺. На фиг. 14B и 14E частота регуляторных Т-клеток показана в процентах от общего количества CD45⁺ Т-клеток, которые представляют собой Foxp3⁺. На фиг. 14C показана частота CD4⁺ эффекторных Т-клеток в процентах от общего количества CD45⁺ Т-клеток в опухоли. На фиг. 14F и 14G показан процент пролиферирующих (Ki-67⁺) и активированных (ICOS⁺) регуляторных Т-клеток в селезенке.

На фиг. 15 показана частота регуляторных Т-клеток в опухолях мышей с CTLA-4 человека (n=8), которым вводили разные дозы либо ипилимумаба, либо активируемого антитела против CTLA-4, содержащего YV39 в качестве маскирующего фрагмента и 2011 в качестве расщепляемого фрагмента ("Ipi YV39 2011"). Антитела дозировали один раз в дозе 10, 3 или 1 мг/кг на 7-й день после имплантации опухоли. Неродственное антитело IgG1 человека использовали в качестве контроля.

На фиг. 16A и 16B показаны проценты активированных (ICOS⁺) и пролиферирующих (Ki-67⁺) ре-

гуляторных Т-клеток в селезенке мышей с CTLA-4 человека (n=8), которым вводили разные дозы либо ипилимумаба, либо активируемого антитела против CTLA-4, содержащего YV39 в качестве маскирующего фрагмента и 2011 в качестве расщепляемого фрагмента ("Ipi YV39 2011"). Антитела дозировали один раз в дозе 10, 3 или 1 мг/кг на 7-й день после имплантации опухоли. Неродственное антитело IgG1 человека использовали в качестве контроля.

На фиг. 17A-17D показан объем опухоли в зависимости от дней после имплантации опухоли у мышей с CTLA-4 человека (n=10), которым вводили разные дозы ипилимумаба ("Ipi") (фиг. 17B), нефукозилированной версии ипилимумаба ("Ipi NF") (фиг. 17C) или нефукозилированной версии активируемого антитела против CTLA-4, содержащего YV39 в качестве маскирующего фрагмента и 2011 в качестве расщепляемого фрагмента ("Ipi YV39 2011 NF") (фиг. 17D). Антитела дозировали один раз в дозе 10, 3 или 1 мг/кг (левая панель, средняя панель и правая панель соответственно на фиг. 17B-17D). Контрольные животные получали неродственное антитело IgG1 человека (фиг. 17A).

На фиг. 18 показана частота регуляторных Т-клеток в опухолях мышей с CTLA-4 человека (n=5), которым вводили либо нефукозилированную версию ипилимумаба ("Ipi NF"), либо нефукозилированную версию активируемого антитела против CTLA-4, содержащего YV39 в качестве маскирующего фрагмента и 2011 в качестве расщепляемого фрагмента ("NF Ipi YV39 2011"). Антитела дозировали один раз в дозе 200 мкг/мышь на 7-й день после имплантации опухоли. Неродственное антитело IgG1 человека использовали в качестве контроля.

На фиг. 19 показаны аффинности связывания (Kd) как для ипилимумаба ("Ipi"), так и для нефукозилированной версии ипилимумаба ("Ipi NF") с различными Fc-рецепторами человека, макака и мыши.

На фиг. 20 показан средний процент Ki67+ CD4+ Т-клеток в крови яванских макаков после введения активируемого антитела против CTLA-4. Активируемое антитело против CTLA-4 содержит YV39 в качестве маскирующего фрагмента и 2001 в качестве расщепляемого фрагмента. Носитель и ипилимумаб использовали в качестве контроля.

Подробное описание изобретения

Для того чтобы настоящее раскрытие могло быть более легко понято, сначала разъясняются конкретные термины. Дополнительные определения излагаются по тексту подробного описания изобретения.

Следует отметить, что термин относится к одному или нескольким объектам; например, под "нуклеотидной последовательностью" понимают одну или несколько нуклеотидных последовательностей. Как таковые, термины "один или несколько" и "по меньшей мере один" могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо.

Кроме того, "и/или" при использовании в настоящем документе следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, термин "и/или", используемый во фразе, такой как "А и/или В" в настоящем документе, предназначен для включения "А и В", "А или В", "А" (отдельно) и "В" (отдельно). Аналогичным образом, термин "и/или", используемый в такой фразе, как "А, В и/или С", предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В и С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

Понятно, что везде, где аспекты описаны в настоящем документе на языке "содержащий", также обеспечиваются аналогичные аспекты, описанные в терминах "состоящий из" и/или "состоящий по существу из".

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится это раскрытие. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; and the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press предоставляют специалисту общий словарь для многих терминов, использованных в настоящей заявке.

Единицы, префиксы и символы обозначаются в принятой форме Système International de Unites (SI). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, нуклеотидные последовательности пишутся слева направо в ориентации от 5' до 3'. Аминокислотные последовательности пишутся слева направо в ориентации от аминокислоты до карбокси. Заголовки, представленные в настоящем документе, не являются ограничениями различных аспектов раскрытия, которые могут иметься со ссылкой на описание в целом. Соответственно термины, определенные непосредственно ниже, более полно определены посредством ссылки на описание во всей его полноте.

Используемый в настоящем документе термин "антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов" или "CTLA-4" относится к рецептору, который является членом суперсемейства иммуноглобулинов, который экспрессируется активированными Т-клетками и передает ингибирующий сигнал Т-клеткам. CTLA-4 гомологичен стимулирующему белку Т-клеток, CD28, и обе молекулы связываются с CD80 и CD86, также называемыми B7-1 и B7-2 соответственно, на антигенпрезентирующих клетках. CTLA4 также обнаружен в регуляторных Т-клетках и способствует его ингибирующей функции. CTLA-4 также называют цитотоксическим Т-лимфоцит-ассоциированным белком 4, CD152, инсулинозависимым сахарным диа-

бетом 12 (IDDM12), целиакической болезнью 3 (CELIAC3), GRD4 и GSE. Термин "CTLA-4" включает любые варианты или изоформы CTLA-4, которые естественным образом экспрессируются клетками.

Используемый в настоящем документе термин "Т-клетка" определяется как полученный из тимуса лимфоцит, который участвует в различных клеточных иммунных реакциях. Используемый в настоящем документе термин "регуляторная Т-клетка" относится к CD4+CD25+Foxp3+ Т-клетке с супрессивными свойствами. "T_{reg}" является аббревиатурой, используемой в настоящем документе для регуляторной Т-клетки.

Используемый в настоящем документе термин "хелперная Т-клетка" относится к CD4+ Т-клетке; хелперные Т-клетки распознают антиген, связанный с молекулами МНС класса II. Существует по меньшей мере два типа хелперных Т-клеток, Th1 и Th2, которые продуцируют разные цитокины. Хелперные Т-клетки становятся CD25+ при активации, но только временно становятся Foxp3+.

Используемый в настоящем документе термин "цитотоксическая Т-клетка" относится к CD8+ Т-клетке; цитотоксические Т-клетки распознают антиген, связанный с молекулами МНС класса I.

Термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулина и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулина (Ig), т.е. молекулам, которые содержат сайт связывания антигена, который специфически связывает (иммунореагирует с) антиген. Под "специфическим связыванием" или "иммунореагированием с" или "иммуноспецифическим связыванием" подразумевается, что антитело реагирует с одной или несколькими антигенными детерминантами требуемого антигена и не реагирует с другими полипептидами или связывается с ними с гораздо более низким сродством ($K_d > 10^{-6}$). Антитела включают, но без ограничения поликлональные, моноклональные, химерные, доменные антитела, одноцепочечные, фрагменты Fab и F(ab')₂, scFv и экспрессионную библиотеку Fab.

Известно, что основная структурная единица антитела содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну "легкую" (около 25 кДа) и одну "тяжелую" (около 50-70 кДа) цепь. Аминоконцевая часть каждой цепи включает вариабельную область от около 100 до около 110 или более аминокислот, в первую очередь, ответственную за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, в первую очередь, ответственную за эффекторную функцию. В целом, молекулы антител, полученные от людей, относятся к любому из классов IgG, IgM, IgA, IgE и IgD, которые отличаются друг от друга природой тяжелой цепи, присутствующей в молекуле. Некоторые классы также имеют подклассы, такие как IgG1, IgG2 и другие. Кроме того, у человека легкая цепь может представлять собой каппа-цепь или ламбда-цепь.

Используемый в настоящем документе термин "активируемое антитело" относится к антителу, которое также содержит маскирующий фрагмент (ММ) и расщепляемый фрагмент (СМ), где ММ присоединен к VL антитела через СМ, который расщепляется посредством протеазы. Используемый в настоящем документе термин "продомен" включает N-концевой фрагмент, который присоединен к домену VL активируемых антител против CTLA-4 человека и, как таковой, включает ММ и СМ. В некоторых вариантах выполнения изобретения легкая цепь активируемого антитела имеет структурное расположение от N-конца до С-конца следующим образом: ММ-СМ-VL. В некоторых вариантах выполнения изобретения, продомен находится в VH-домене антитела против CTLA-4 человека. Активируемое антитело предназначено для расщепления активированной протеолитической активностью, присутствующей в большинстве, если не во всех раковых опухолях. Такое протеолитическое расщепление или активация удаляет продомен и высвобождает активное антитело, то есть активированное активируемое антитело. Активация протеазой активируемых антител в нормальной ткани значительно снижается из-за жесткого контроля протеолитической активности в нормальных тканях. Как таковые, активируемые антитела остаются в значительной степени инертными в кровотоке и в нормальных тканях.

Активируемое антитело ввиду того, что его продомен маскирует антигенсвязывающий домен, тем самым ингибируя способность антигенсвязывающего домена связываться с его мишенью, имеет более низкое сродство к связыванию с мишенью, чем активированное активируемое антитело, в котором ММ был удален путем протеолитического расщепления СМ, тем самым высвобождая активное антитело. Такое высвобожденное антитело проявляет более высокое сродство к связыванию с его мишенью. В некоторых вариантах выполнения изобретения ММ специфически взаимодействует с антигенсвязывающим доменом ипилимумаба, чтобы уменьшить способность антитела связываться с его мишенью. Когда ММ удаляется путем протеолитического расщепления активируемого антитела, высвобожденное антитело связывается со своей мишенью со сродством, сходным с исходным ипилимумабом.

Схематические представления активируемых антител по настоящему изобретению, например ММ-СМ-VL, не предназначены для ограничения. Другие элементы последовательности, такие как линкеры, спейсеры и сигнальные последовательности, могут присутствовать до, после или между перечисленными элементами последовательности в таких схематических представлениях. Также следует понимать, что продомен, содержащий ММ и СМ, может быть присоединен к VH антитела, а не к VL антитела, так что тяжелая цепь имеет структурное расположение от N-конца до С-конца в виде ММ-СМ-VH.

Используемый в настоящем документе термин "моноклональное антитело" (mAb) или "композиция моноклонального антитела" относится к популяции молекул антитела, которые содержат только один

молекулярный вид молекулы антитела, состоящий из уникального генного продукта легкой цепи и уникального генного продукта тяжелой цепи. В частности, определяющие комплементарность области (CDR) моноклонального антитела идентичны во всех молекулах популяции. MAb содержат антигенсвязывающий сайт или домен, способный иммунореагировать с конкретным эпитопом антигена, характеризующимся уникальной аффинностью связывания с ним. Молекулы моноклональных антител обычно содержат две тяжелые цепи и две легкие цепи.

Термин "антигенсвязывающий домен" относится к той части молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена. Антигенсвязывающий сайт образован аминокислотными остатками N-концевых вариабельных ("V") областей тяжелой ("H") и легкой ("L") цепей. Три сильно расходящихся участка в V-областях тяжелой и легкой цепей, называемых "гипервариабельными областями", расположены между более консервативными фланкирующими участками, известными как "каркасные области" или "FR". Таким образом, термин "FR" относится к аминокислотным последовательностям, которые естественным образом находятся между гипервариабельными областями в иммуноглобулинах и прилегают к ним. В молекуле антитела три гипервариабельных участка легкой цепи и три гипервариабельных участка тяжелой цепи расположены друг относительно друга в трехмерном пространстве с формированием антигенсвязывающей поверхности. Антигенсвязывающая поверхность является комплементарной трехмерной поверхности связанного антигена, и три гипервариабельные области каждой из тяжелых и легких цепей называются "определяющими комплементарность областями" или "CDR". Присвоение аминокислот каждому домену соответствует определению Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)); или Chothia & Lesk J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature, 342:878-883 (1989).

Используемый в настоящем документе термин "эпитоп" включает любую детерминанту белка, способную специфически связываться с иммуноглобулином, scFv или Т-клеточным рецептором. Термин "эпитоп" включает любую белковую детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, и специфические характеристики заряда. Например, антитела могут быть получены против N-концевых или C-концевых пептидов полипептида. Считается, что антитело специфически связывается с антигеном, когда константа диссоциации составляет ≤ 1 мкМ; предпочтительно ≤ 100 нМ и наиболее предпочтительно ≤ 10 нМ.

Используемые в настоящем документе термины "специфическое связывание", "иммунологическое связывание" и "иммунологические свойства связывания" относятся к нековалентным взаимодействиям такого типа, которые происходят между молекулой иммуноглобулина и антигеном, для которого иммуноглобулин специфичен. Сила или аффинность иммунологических связывающих взаимодействий могут быть выражены через константу диссоциации (K_d) взаимодействия, где меньшая K_d указывает на большую аффинность. Иммунологические свойства связывания выбранных полипептидов могут быть определены количественно с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. Один из таких способов включает измерение скорости образования и диссоциации комплекса антигенсвязывающий сайт/антиген, причем эти скорости зависят от концентраций партнеров комплекса, аффинности взаимодействия и геометрических параметров, которые в равной степени влияют на скорость в обоих направлениях. Таким образом, как "константа скорости ассоциации" (k_{on}), так и "константа скорости диссоциации" (k_{off}) могут быть определены путем расчета концентраций и фактических скоростей ассоциации и диссоциации. (См. Nature, 361:186-87 (1993)). Отношение k_{off}/k_{on} позволяет аннулировать все параметры, не связанные с аффинностью, и равно константе диссоциации K_d . (См. в общем Davies et al. (1990), Annual. Rev. Biochem., 59:439-473). Антитело по настоящему изобретению, как полагают, специфически связывается с CTLA-4, когда константа равновесия связывания (K_d) ≤ 1 мкМ, предпочтительно ≤ 100 нМ, более предпочтительно ≤ 10 нМ и наиболее предпочтительно ≤ 100 пМ до около 1 пМ, как измерено с помощью анализов, таких как анализы радиолигандного связывания или аналогичные анализы, известные специалистам в данной области техники.

Используемый в настоящем документе термин "выделенный полинуклеотид" относится к полинуклеотиду геномного, кДНК или синтетического происхождения или некоторой их комбинации, который в силу своего происхождения "выделенного полинуклеотида"

- (1) не ассоциирован со всем или частью полинуклеотида, в котором "выделенный полинуклеотид" обнаружен в природе,
- (2) функционально связан с полинуклеотидом, с которым он не ассоциирован в природе, или
- (3) не встречается в природе как часть большей последовательности.

Полинуклеотиды в соответствии с изобретением включают молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие молекулы иммуноглобулина тяжелой цепи, показанные в настоящем документе, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие молекулы иммуноглобулина легкой цепи, показанные в настоящем документе.

Термин "выделенный белок", упоминаемый в настоящем документе, означает белок кДНК, рекомбинантной РНК или синтетического происхождения или некоторую их комбинацию, который в силу сво-

его происхождения или источника происхождения "изолированного белка"

- (1) не связан с белками, встречающимися в природе,
- (2) не содержит других белков из того же источника, например не содержит мышинных белков,
- (3) экспрессируется клеткой другого вида, или
- (4) не встречается в природе.

Термин "полипептид" используется в настоящем документе как общий термин для обозначения нативного белка, фрагментов или аналогов полипептидной последовательности. Следовательно, нативные белковые фрагменты и аналоги являются видами полипептидного рода. Полипептиды в соответствии с изобретением включают молекулы иммуноглобулина тяжелой цепи, показанные в настоящем документе, и молекулы иммуноглобулина легкой цепи, показанные в настоящем документе, а также молекулы анти-тела, образованные комбинациями, содержащими молекулы иммуноглобулина тяжелой цепи с молекулами иммуноглобулина легкой цепи, такими как молекулы иммуноглобулина каппа легкой цепи, и наоборот, а также их фрагменты и аналоги.

Термин "встречающийся в природе" используется в настоящем документе применительно к объекту, относящемуся к тому факту, что объект может быть найден в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая вирусы), которые могут быть выделены из природного источника и которые не были намеренно модифицированы человеком в лаборатории, являются в природными.

Используемый в настоящем документе термин "функционально связанный" относится к положениям компонентов, которые описаны таким образом, что позволяют им функционировать по назначению. Контрольная последовательность, "функционально связанная" с кодирующей последовательностью, лигируется таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается в условиях, совместимых с контрольными последовательностями.

Используемый в настоящем документе термин "контрольная последовательность" относится к полинуклеотидным последовательностям, которые необходимы для осуществления экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы. Природа таких контрольных последовательностей различается в зависимости от организма-хозяина в прокариотах, такие контрольные последовательности обычно включают промотор, сайт связывания рибосомы и транскрипционную терминирующую последовательность в эукариотах, как правило, такие контрольные последовательности включают промоторы и транскрипционную терминирующую последовательность. Предполагается, что термин "контрольные последовательности" включает, как минимум, все компоненты, присутствие которых является существенным для экспрессии и процессинга, и может также включать дополнительные компоненты, присутствие которых является выгодным, например, лидерные последовательности и последовательности партнеров слияния. Термин "полинуклеотид" в контексте настоящего описания означает нуклеотиды длиной по меньшей мере 10 оснований, либо рибонуклеотиды, либо дезоксирибонуклеотиды, либо модифицированную форму нуклеотидов любого типа. Термин включает одноцепочечные и двухцепочечные формы ДНК.

Используемый в настоящем документе термин "олигонуклеотид" включает встречающиеся в природе и модифицированные нуклеотиды, связанные вместе встречающимися в природе и не встречающимися в природе олигонуклеотидными связями. Олигонуклеотиды представляют собой полинуклеотидное подмножество, обычно длиной 200 оснований или менее. Предпочтительно олигонуклеотиды имеют длину от 10 до 60 оснований и наиболее предпочтительно - длину от 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 до 40 оснований. Олигонуклеотиды обычно являются одноцепочечными, например, для зондов, хотя олигонуклеотиды могут быть и двухцепочечными, например, для использования в конструировании мутанта гена. Олигонуклеотиды по изобретению представляют собой смысловые или бессмысловые олигонуклеотиды.

Используемый в настоящем документе термин "встречающиеся в природе нуклеотиды" включает дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Используемый в настоящем документе термин "модифицированные нуклеотиды" включает нуклеотиды с модифицированными или замещенными сахарными группами и т.п. Используемый в настоящем документе термин "олигонуклеотидные связи" включает олигонуклеотидные связи, такие как фосфоротриоат, фосфородитриоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанилотриоат, фосфоранилат, фосфоронмидат и т.п. См., например, LaPlanche et al., Nucl. Acids Res., 14:9081 (1986); Stec et al., J. Am. Chem. Soc., 106:6077 (1984); Stein et al., Nucl. Acids Res., 16:3209 (1988); Zon et al., Anti-Cancer Drug Design, 6:539 (1991); Zon et al., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, p. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al., патент США № 5151510; Uhlmann, Peyman, Chemical Reviews, 90:543 (1990). При желании, олигонуклеотид может включать метку для обнаружения.

Как используется в настоящем документе, двадцать обычных аминокислот и их аббревиатуры соответствуют традиционному применению. См. Immunology - A Synthesis (2nd edition, E.S. Golub, D.R. Gren, eds., Sinauer Associates, Sunderland Mass. (1991)). Стереизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати традиционных аминокислот, не природных аминокислот, таких как α -, α -дизамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты, молочная кислота и другие нетрадиционные аминокислоты, также могут быть

подходящими компонентами для полипептидов по настоящему изобретению. Примеры нетрадиционных аминокислот включают 4-гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат, ϵ -N,N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, О-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, σ -N-метиларгинин и другие сходные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В используемом в настоящем документе обозначении полипептида левое направление представляет собой аминоконцевое направление, а правое направление представляет собой карбоксиконцевое направление в соответствии со стандартным использованием и соглашением.

Применительно к полипептидам термин "существенная идентичность" означает, что две пептидные последовательности, когда они оптимально выровнены, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием веса пробелов по умолчанию, имеют общую по меньшей мере 80%-ную идентичность последовательности, предпочтительно по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности, более предпочтительно по меньшей мере 95%-ную идентичность последовательности и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99%-ную идентичность последовательности.

Как обсуждается в настоящем документе, небольшие вариации в аминокислотных последовательностях антител или молекул иммуноглобулина рассматриваются как охватываемые настоящим изобретением при условии, что вариации в аминокислотной последовательности сохраняют по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80, 90, 95% и наиболее предпочтительно 99% идентичности последовательности. В частности, предусматриваются консервативные замены аминокислот. Консервативными заменами являются те, которые происходят в семействе аминокислот в их боковых цепях. Генетически кодируемые аминокислоты обычно делятся на следующие семейства:

- (1) кислотные аминокислоты представляют собой аспартат, глутамат;
- (2) основные аминокислоты представляют собой лизин, аргинин, гистидин;
- (3) неполярные аминокислоты представляют собой аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и
- (4) незаряженные полярные аминокислоты представляют собой глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин.

Гидрофильные аминокислоты включают аргинин, аспарагин, аспартат, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин. Гидрофобные аминокислоты включают аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин. Другие семейства аминокислот включают

- (i) серин и треонин, которые являются алифатическим гидроксидным семейством;
- (ii) аспарагин и глутамин, которые являются амидсодержащим семейством;
- (iii) аланин, валин, лейцин и изолейцин, которые являются алифатическим семейством; и
- (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, которые являются ароматическим семейством.

В случае антител разумно ожидать, что изолированная замена лейцина изолейцином или валином, аспартата глутаматом, треонина серином или аналогичная замена аминокислоты структурно родственной аминокислотой не будет оказывать существенного влияния на связывание или свойства получаемой молекулы, особенно если замена не включает аминокислоту в CDR или каркасной области. Приводит ли замена аминокислоты к функциональному пептиду, может быть легко определено путем анализа специфической активности производного полипептида. Анализы подробно описаны в настоящем документе. Фрагменты, или аналоги антител, или молекул иммуноглобулина могут быть легко получены специалистами в данной области техники. Предпочтительные аминокислотные и карбоксиконцы фрагментов или аналогов встречаются вблизи границ функциональных доменов. Структурные и функциональные домены могут быть идентифицированы путем сравнения данных нуклеотидных и/или аминокислотных последовательностей с общедоступными или фирменными базами данных последовательностей. Предпочтительно компьютерные методы сравнения используются для идентификации мотивов последовательности или доменов предсказанной конформации белка, которые встречаются в других белках с известной структурой и/или функцией. Способы идентификации последовательностей белков, которые складываются в известную трехмерную структуру, известны. Bowie et al., Science, 253:164 (1991). Таким образом, приведенные выше примеры демонстрируют, что специалисты в данной области техники могут распознавать мотивы последовательности и структурные конформации, которые могут использоваться для определения структурных и функциональных доменов в соответствии с изобретением.

Предпочтительными аминокислотными заменами являются те, которые

- (1) уменьшают восприимчивость к протеолизу в областях активируемого антитела, отличных от расщепляемого линкера, содержащего CM;
- (2) уменьшают чувствительность к окислению;
- (3) изменяют аффинность связывания для образования белковых комплексов;
- (4) изменяют аффинность связывания; и
- (5) придают или изменяют другие физико-химические или функциональные свойства таких аналогов.

Аналоги могут включать различные мутации последовательности, отличной от встречающейся в природе пептидной последовательности. Например, одиночные или множественные аминокислотные

замены (предпочтительно консервативные аминокислотные замены) могут быть сделаны во встречающейся в природе последовательности (предпочтительно в части полипептида вне домена (доменов), образующего межмолекулярные контакты). Консервативная аминокислотная замена не должна существенно изменять структурные характеристики родительской последовательности (например, замещающая аминокислота не должна разрушать спираль, которая встречается в родительской последовательности, или нарушать другие типы вторичной структуры, которая характеризует родительскую последовательность). Примеры известных из уровня техники вторичных и третичных структур полипептидов описаны в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, ed., W.H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden, J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); и Thornton et al., *Nature*, 354:105 (1991).

Используемый в настоящем документе термин "полипептидный фрагмент" относится к полипептиду, который имеет аминоконцевую и/или карбоксиконцевую делецию и/или одну или несколько внутренних делеций, но где оставшаяся аминокислотная последовательность идентична соответствующим позициям во встречающейся в природе последовательности, предсказанной, например, из полной последовательности кДНК. Фрагменты обычно имеют длину по меньшей мере 5, 6, 8 или 10 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 14 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 20 аминокислот, обычно по меньшей мере 50 аминокислот и еще более предпочтительно по меньшей мере 70 аминокислот. Используемый в настоящем документе термин "аналог" относится к полипептидам, которые содержат сегмент по меньшей мере из 25 аминокислот, который имеет существенную идентичность части предсказанной аминокислотной последовательности и который специфически связывается с CTLA-4 в подходящих условиях связывания. Обычно, полипептидные аналоги содержат консервативную аминокислотную замену (или добавление, или делецию) по отношению к встречающейся в природе последовательности. Аналоги обычно имеют длину по меньшей мере 20 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 50 аминокислот или более и часто могут быть такими же длинными, как и полноразмерный встречающийся в природе полипептид.

Используемый в настоящем документе термин "агент" обозначает химическое соединение, смесь химических соединений, биологическую макромолекулу или экстракт, изготовленный из биологических материалов.

Используемый в настоящем документе термин "метка" или "меченый" относится к включению детектируемого маркера, например, путем включения радиоактивно меченой аминокислоты или присоединения к полипептиду биотинильных фрагментов, которые могут быть обнаружены с помощью маркированного авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер, или ферментативной активности, которая может быть обнаружена оптическими или калориметрическими методами). В определенных ситуациях метка или маркер также могут быть терапевтическими. В данной области техники известны и могут использоваться различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов. Примеры меток для полипептидов включают, но без ограничения, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I) флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, лантаноидные фосфоресцентные вещества), ферментные метки (например, пероксидаза хрена, п-галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные, биотинильные группы, заранее определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательности пары "молнии" лейцина, сайты связывания для вторичных антител, домены связывания металлов, метки эпитопа). В некоторых вариантах выполнения изобретения метки прикрепляются спейсерными группами различной длины, чтобы уменьшить потенциальное стерическое препятствие.

Другие химические термины в данном описании используются в соответствии с общепринятым применением в данной области техники, как показано в *The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (Parker, S., ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Используемый в настоящем документе термин "по существу чистый" означает, что вид объекта представляет собой присутствие преобладающего вида (т.е. на молярной основе он является более распространенным, чем любой другой отдельный вид в композиции), и предпочтительно по существу очищенная фракция представляет собой композицию, в которой вид объекта составляет по меньшей мере около 50% (в молярном отношении) от присутствия всех макромолекулярных видов. Как правило, по существу чистая композиция будет содержать более чем около 80% присутствия всех макромолекулярных видов в композиции, более предпочтительно более чем около 85, 90, 95 и 99%. Наиболее предпочтительно вид объекта очищен до существенной гомогенности (загрязняющие виды не могут быть обнаружены в композиции обычными способами обнаружения), где композиция состоит по существу из одного макромолекулярного вида.

Используемый в настоящем документе термин "лечение" представляет собой подход для получения полезных или желаемых клинических результатов. Благоприятные или желаемые клинические результаты могут включать, но без ограничения любое одно или несколько из ослабления одного или нескольких симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) состояние заболевания, предотвращение или задержку распространения (например, метастазирования) заболевания, предотвращение или задержку возникновения или рецидива заболевания, задержку или замедление про-

грессирования заболевания, улучшение состояния заболевания и ремиссию (частичную или полную). Термин "лечение" также включает уменьшение патологических последствий пролиферативного заболевания, такого как рак. Способы, представленные в настоящем документе, предусматривают любой один или несколько из этих аспектов лечения.

Используемый в настоящем документе термин "эффективное количество" относится к количеству соединения или композиции, когда оно используется отдельно или в комбинации со второй терапией, достаточное для лечения определенного расстройства, состояния или заболевания, такого как улучшение, облегчение, уменьшение и/или задержка одного или нескольких его симптомов. Что касается рака или другой нежелательной пролиферации клеток, то эффективное количество включает количество, достаточное для того, чтобы заставить опухоль уменьшиться и/или уменьшить скорость роста опухоли (такое как для подавления роста опухоли) или для предотвращения или задержки другой нежелательной клеточной пролиферации. Эффективное количество может быть введено за одно или несколько введений.

Используемый в настоящем документе термин "комбинированная терапия" означает, что первый агент вводят в сочетании с другим агентом. "В сочетании с" относится к применению одного способа лечения в дополнение к другому способу лечения. Как таковое, "в сочетании с" относится к применению одного способа лечения до, во время или после доставки другого способа лечения индивидууму.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтический агент или лекарственное средство" относится к химическому соединению или композиции, способным вызывать желаемый терапевтический эффект при правильном введении субъекту.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый" или "фармакологически совместимый" означает материал, который не является биологически или иным образом нежелательным, например, материал может быть включен в фармацевтическую композицию, вводимую индивидууму или субъекту, не вызывая каких-либо значительных нежелательных биологических эффектов или вредным образом не взаимодействуя с любым другим компонентом композиции, в которой он содержится. Фармацевтически приемлемые носители или наполнители, например, соответствуют необходимым стандартам токсикологических и производственных испытаний и/или включены в Руководство по Неактивным Ингредиентам (Inactive Ingredient Guide), подготовленное Управлением по Контролю за Продуктами и Лекарствами США (U.S. Food and Drug administration).

Термины "рак", "раковый" или "злокачественный" относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака включают, например, меланому, такую как неоперабельная или метастатическая меланома, лейкоз, лимфому, бластому, карциному и саркому. Более конкретные примеры таких раковых заболеваний включают хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз с положительным результатом по Филадельфийской хромосоме (Ph+ ALL), сквамозную клеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, глиому, желудочно-кишечный рак, почечный рак, рак яичников, рак печени, колоректальный рак, рак эндометрия, рак почки, рак предстательной железы, рак щитовидной железы, нейробластому, рак поджелудочной железы, мультиформную глиобластому, рак шейки матки, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, карциному толстой кишки, а также рак головы и шеи, рак желудка, герминогенную опухоль, детскую саркому, синоназальный естественный киллер, множественную миелому, острый миелогенный лейкоз (AML) и хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL).

"Лейкоз" относится к прогрессирующим злокачественным заболеваниям кроветворных органов и обычно характеризуется искаженным распространением и развитием лейкоцитов и их предшественников в крови и костном мозге. Лейкоз обычно клинически классифицируется на основании

- (1) продолжительности и характера заболевания - острый или хронический;
- (2) типа задействованной клетки; миелоидный (миелогенный), лимфоидный (лимфогенный) или моноцитарный; и
- (3) увеличения или отсутствия увеличения количества аномальных клеток в крови - лейкоемических или алейкемических (сублейкозных).

Лейкоз включает, например, острый нелимфоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый гранулоцитарный лейкоз, хронический гранулоцитарный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, Т-клеточный лейкоз взрослых, алейкемический лейкоз, лейкоцитемический лейкоз, базофильный лейкоз, недифференцируемый лейкоз, лейкоз крупного рогатого скота, хронический миелоцитарный лейкоз, гематодерматоз, эмбриональный лейкоз, эозинофильный лейкоз, лейкоз Гросса, волосатоклеточный лейкоз, гемобластный лейкоз, гемоцитобластный лейкоз, гистиоцитарный лейкоз, лейкоз стволовых клеток, острый моноцитарный лейкоз, лейкопенический лейкоз, лимфатический лейкоз, лимфобластный лейкоз, лимфоцитарный лейкоз, лимфогенный лейкоз, лимфоидный лейкоз, лейкоз с лимфосаркомными клетками, лейкоз тучных клеток, мегакариоцитарный лейкоз, микромиелобластный лейкоз, моноцитарный лейкоз, миелобластный лейкоз, миелоцитарный лейкоз, миелоидный гранулоцитарный лейкоз, миеломоноцитарный лейкоз, лейкоз Нигели, лейкоз плазматических клеток, плазмацитарный лейкоз, промиелоцитарный лейкоз, лейкоз клеток Ридера, лейкоз Шиллинга, лейкоз стволовых клеток, сублейкеми-

ческий лейкоз и недифференцированный клеточный лейкоз. В определенных аспектах настоящее изобретение относится к лечению хронического миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза и/или острого лимфобластного лейкоза, положительного по Филадельфийской хромосоме (Ph⁺ ALL).

I. Активируемые антитела против CTLA-4.

Настоящее изобретение относится к улучшенным антителам против CTLA-4, которые являются такими же эффективными, как традиционные антитела против CTLA-4 (например, ипилимумаб), но с более высоким, т.е. улучшенным, профилем безопасности. В частности, улучшенные антитела против CTLA-4 представляют собой активируемые моноклональные антитела (mAb), которые специфически связываются с CTLA-4 человека при активации. Эти улучшенные антитела против CTLA-4, также называемые в настоящем документе активируемыми антителами против CTLA-4 или CTLA-4-активируемыми антителами, применяются в способах лечения, предотвращения, замедления прогрессирования, ослабления и/или облегчения симптома заболевания или расстройства, включая, но без ограничения, заболевание или расстройство, связанное с экспрессией и/или активностью aberrантного CTLA-4. Например, активируемые антитела против CTLA-4 применяются в способах лечения, предотвращения, замедления прогрессирования, ослабления и/или облегчения симптома рака или другого неопластического состояния. Активируемые антитела описаны, например, в Патентах США № 8513390; 8518404; 9120853; 9127053 и международной публикации № WO 2016/149201.

В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемые антитела против CTLA-4, представленные в настоящем документе, включают

- (i) ипилимумаб или его антигенсвязывающий домен (AB), такой как варибельная легкая цепь ипилимумаба (VL);
- (ii) расщепляемый фрагмент (CM); и
- (iii) маскирующий фрагмент (MM).

В некоторых вариантах выполнения изобретения VL связана с MM, так что связывание с MM уменьшает способность ипилимумаба связываться с CTLA-4. В некоторых вариантах выполнения изобретения MM связан с VL через расщепляемый фрагмент (CM) (также известный как субстратный линкер), который включает субстрат для протеазы, например, протеазы, которая сверхэкспрессируется в микроокружении опухоли.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах выполнения изобретения антитело или его антигенсвязывающий домен (AB) содержит определяющие комплементарность области (CDR) антитела против CTLA-4 ипилимумаба, обозначенные как 10D1 в патентах США № 6984720 и 7605238, которые включены сюда посредством ссылки во всем их объеме. Ипилимумаб (также известный как MDX-010 и BMS-734016) продается под торговой маркой YERVOY® и был одобрен для лечения метастатической меланомы и проходит клинические испытания на других формах рака. См. Hoos et al. (2010), *Semin. Oncol.*, 37:533; Hodi et al. (2010), *N. Engl. J. Med.*, 363:711; Pardoll (2012), *Nat. Immunol.*, 13(12):1129.

Ипилимумаб имеет изотип IgG1 человека, который лучше всего связывается с большинством человеческих Fc-рецепторов (Bruhns et al. (2009), *Blood*, 113:3716) и считается эквивалентным IgG2a мыши в отношении типов активирующих Fc-рецепторов, которые он связывает. Поскольку IgG1 связывается с активирующим рецептором CD16 (FcγRIIIa), экспрессируемым человеческими NK-клетками и моноцитами, ипилимумаб может опосредовать ADCC. Ипилимумаб изотипа IgG1 был первоначально выделен непосредственно из гибридомы, но впоследствии был клонирован и экспрессирован в клетках яичника китайского хомячка (CHO). Несмотря на то что изотип, который опосредует ADCC и/или CDC, может быть нежелательным в антителе, нацеленном на рецептор на Т-клетках, который стремится усилить иммунный ответ, изотип IgG1 антитела был сохранен отчасти потому, что он усиливал ответ на вакцину у яванского макака и считался функциональным. Было показано, что ипилимумаб увеличивает количество активированных Т-клеток в крови, о чем свидетельствует, например, значительное увеличение экспрессии HLA-DR на поверхности клеток CD4⁺ и CD8⁺ после обработки, а также увеличение абсолютного количества лимфоцитов (Ku et al. (2010), *Cancer*, 116:1767; Attia et al. (2005), *J. Clin. Oncol.*, 23:6043; Maker et al. (2005), *J. Immunol.*, 175:7746; Berman et al. (2009), *J. Clin. Oncol.*, 27(suppl):15s.3020; Hamid et al. (2009), *J. Clin. Oncol.*, 27(suppl):15s.9008), что указывает на то, что истощение Т-клеток не происходит на периферии у человека. Ипилимумаб продемонстрировал только умеренные уровни ADCC в активированных Т-клетках с использованием IL-2-активированных РВМС в качестве эффекторных клеток; однако применение T_{reg} в качестве целей не было проверено. Наблюдаются незначительные изменения частоты периферического T_{reg} в крови пациентов, получавших ипилимумаб (Maker et al. (2005), *J. Immunol.*, 175:7746), но доступно мало информации о влиянии ипилимумаба на внутриопухолевые T_{reg}. Тем не менее, была описана положительная корреляция между высоким отношением CD8⁺ к T_{reg} и некрозом опухоли в биопсиях из метастатических поражений меланомой у пациентов, получавших ипилимумаб. Hodi et al. (2008), *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)*, 105:3005. Кроме того, опухолевая ткань от пациентов с раком мочевого пузыря, получавших ипилимумаб, имела более низкий процент CD4⁺ Foxp3⁺ Т-клеток, чем опухоли от нелеченных пациентов с раком мочевого пузыря. Liakou et al. (2008), *Proc. Nat'l Acad. Sci.*

(USA), 105:14987.

В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело против CTLA-4 содержит комбинацию вариабельной тяжелой цепи CDR1 (VH CDR1, также называемой в настоящем документе CDRH1), CDR2 (VH CDR2, также называемой в настоящем документе CDRH2) и CDR3 (VH CDR3, также называемой в настоящем документе CDRH3) и вариабельной легкой цепи CDR1 (VL CDR1, также называемой в настоящем документе CDRL1), CDR2 (VL CDR2, также называемой в настоящем документе CDRL2) и CDR3 (VL CDR3, также называемой в настоящем документе CDRL3). Последовательности этих CDR представлены в табл. 2.

Таблица 2

Последовательности CDR тяжелых и легких цепей для ипилимумаба

ЦЕПЬ	CDR1	CDR2	CDR3
ЛЕГКАЯ	RASQSVGSSYLA (SEQ ID NO: 560)	GAFSRAT (SEQ ID NO: 561)	QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 562)
ТЯЖЕЛАЯ	SYTMH (SEQ ID NO: 557)	FISYDGNNKYYADSV KG (SEQ ID NO: 558)	TGWLGPFDY (SEQ ID NO: 559)

Ипилимумаба-цепь VL

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFS
RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK (SEQ
ID NO: 344)

Ипилимумаба-цепь VH

QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFIS
YDGNNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFY
WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 345)

Различные другие последовательности, как указано, представлены ниже.

Каппа константная LC человека

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 346)

Каппа константная легкая цепь мыши

RADAAPTVISFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVL
NSWTDQDSKDSYSTLSSTLTLSKDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ
ID NO: 347)

Ипилимумаб-Каппа LC Человека

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFS
 RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:
 348)

Ипилимумаб-Каппа LC Мыши

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFS
 RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRADA
 APTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSK
 DSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO: 349)

Константная HC IgG1 человека

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:
 350)

Константная HC IgG1 мыши

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:
 351)

Константная HC IgG2a мыши

AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTF
 PAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCP
 APNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSISPIVTCVVDVSEDDPDVQISWVFVNNVEVHTAQT
 QTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSRAP
 QVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDG
 SYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO:
 352)

Ипилимумаб-VH-Константная HC IgG1 Человека

QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFIS
 YDGNKKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDY
 WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL

TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVPEPKSCD
 KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
 ID NO: 353)

Ипилимумаб-VH-Константная HC IgG1 мыши

QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFIS
 YDGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDY
 WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVPEPKSCD
 KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO: 354)

Ипилимумаб-VH-Константная HC IgG2a мыши

QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFIS
 YDGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDY
 WGQGTLLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSL
 SSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKP
 CPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVDVSEDDPDVQISWVFNNV
 EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPIERTISKPK
 KGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNT
 PVLDSGYSFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ
 ID NO: 355)

В некоторых вариантах выполнения изобретения антитело содержит комбинацию последовательности VH CDR1, последовательности VH CDR2, последовательности VH CDR3, последовательности VL CDR1, последовательности VL CDR2 и последовательности VL CDR3, где по меньшей мере одна последовательность CDR содержит 1, 2, 3, 4 или более различий в аминокислотных последовательностях по сравнению с последовательностями CDR, показанными в табл. 2, включая консервативные аминокислотные различия.

В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело против CTLA-4 содержит вариабельный домен тяжелой цепи, который на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше идентичен группе, состоящей из SEQ ID NO: 345. В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело против CTLA-4 содержит вариабельный домен легкой цепи, не включающий любой MM, CM, линкер, спейсер или другую последовательность, добавленную при создании активируемой формы антитела, который на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичен группе, состоящей из SEQ ID NO: 563-56.

В некоторых вариантах выполнения изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CTLA-4 в активируемых антителах, может включать модификации, особенно в области Fc антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, взаимодействие антител с Fc γ R может быть усилено путем модификации гликановой части, присоединенной к каждому фрагменту Fc в остатке N297. В частности, отсутствие остатков коровой фукозы значительно усиливает ADCC посредством улучшенного связывания IgG с активирующим Fc γ RIIA без изменения связывания антигена или CDC. Natsume et al. (2009), Drug Des. Devel. Ther., 3:7. Существует убедительное доказательство того, что афукозилированные опухолеспецифические антитела обуславливают повышенную терапевтическую активность на мышинной модели *in vivo*. Nimmerjahn & Ravetch (2005), Science, 310:1510; Mossner et al. (2010), Blood, 115:4393.

Модификация гликозилирования антител может быть осуществлена, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. Клетки с измененным механизмом гликозилирования были описаны в данной области техники и могут использоваться в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируются рекомбинантные антитела по настоящему изобретению, чтобы тем самым продуцировать антитело с измененным гликозилированием. Например, клеточные линии Ms704, Ms705 и Ms709 лишены гена гликозилтрансферазы, FUT8 (α -(1,6)-фукозилтрансферазы) (см. публикацию патентной заявки США № 20040110704; Yamane-Ohnuki et al. (2004), Biotechnol. Bioeng., 87:614), так что антитела, экспрессируемые в этих клеточных линиях, лишены фукозы на своих углеводах. В качестве другого примера в EP 1176195 также описывается клеточная линия с функционально нарушенным геном FUT8, и клеточные линии, которые имеют небольшую или нулевую активность по добавлению фукозы к N-ацетилглюкозамину, который связывается с областью Fc антитела, на-

пример, клеточная линия миеломы крысы YB2/0 (ATCC CRL 1662). В Публикации PCT WO 03/035835 описывается вариант клеточной линии CHO, Lec13, со сниженной способностью присоединять фукозу к Asn (297)-связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессированных в этой клетке-хозяине. См. также Shields et al. (2002), J. Biol. Chem., 277:26733. Антитела с модифицированным профилем гликозилирования также можно продуцировать в куриных яйцах, как описано в публикации PCT № WO 2006/089231. Альтернативно антитела с модифицированным профилем гликозилирования могут продуцироваться в клетках растений, таких как Lemna. См., например, публикацию США № 2012/0276086. В Публикации PCT № WO 99/54342 описываются клеточные линии, сконструированные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, бета(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), так что антитела, экспрессируемые в сконструированных клеточных линиях, проявляют повышенное разделение структур GlcNac, что приводит к увеличению активности ADCC антител. См. также Umaña et al. (1999), Nat. Biotech., 17:176. Альтернативно остатки фукозы антитела могут быть отщеплены с использованием фермента фукозидазы. Например, фукозильные остатки из антител удаляет фермент альфа-L-фукозидаза. Tarentino et al. (1975), Biochem., 14:5516. Коровье фукозилирование может быть уменьшено путем культивирования антителопродуцирующих клеток в присутствии низкомолекулярных аналогов фукозы, таких как те, которые описаны в EP 2282773B1, или в присутствии кастаноспермина, как описано в WO 08/052030.

Расщепляемый фрагмент.

В некоторых вариантах выполнения изобретения СМ является специфичным для протеазы, которая полезна для усиления дисрегуляционной протеазной активности в опухолевых клетках для целевой активации активируемых антител в месте лечения и/или диагностики. Многочисленные исследования продемонстрировали корреляцию уровней aberrантных протеаз, например, uPA, легумина, MT-SP1, матриксных металлопротеаз (MMP), в солидных опухолях (см., например, Murthy R.V. et al., "Legumain expression in relation to clinicopathologic and biological variables in colorectal cancer", Clin. Cancer Res., 11(2005):2293-2299; Nielsen B.S. et al., "Urokinase plasminogen activator is localized in stromal cells in ductal breast cancer", Lab. Invest., 81(2001):1485-1501; Look O.R. et al., "In situ localization of gelatinolytic activity in the extracellular matrix of metastases of colon cancer in rat liver using quenched fluorogenic DQ-gelatin", J. Histochem. Cytochem., 51(2003):821-829).

Общий обзор этого процесса обсуждается в патентах № 7666817, 8513390 и 9120853 и международных публикациях № WO 2016/118629 и WO 2016/149201, которые включены в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте. Процесс отбора расщепляемых фрагментов используется для идентификации расщепляемых фрагментов, которые имеют ряд желательных характеристик. Например, выбранные расщепляемые фрагменты являются системно стабильными (т.е. стабильными в системном кровообращении субъекта), как правило, не подвержены расщеплению циркулирующими протеазами, такими как плазмин, тромбин, активатор тканевого плазминогена (tPA) или калликреин (KLK), такой как KLK-5 и/или KLK-7, нетоксичны, как правило, не подвержены расщеплению на потенциальных участках токсичности, таких как кожа, протеазами, такими как ADAM 9, ADAM 10, ADAM 17 и/или калликреинами, такими как KLK-5 и KLK-7, и активны в предполагаемом месте лечения и/или диагностики. В некоторых вариантах выполнения изобретения идентифицированные расщепляемые фрагменты отбираются для протеаз, которые сверхэкспрессируются в предполагаемом месте терапии и/или диагностики, но обычно не экспрессируются на или в нормальной, здоровой или иным образом незараженной или неповрежденной ткани, а затем выбранные субстраты подвергаются контрольному скринингу против протеаз, экспрессируемых в нормальной, например, в не пораженной ткани. Типичные протеазы и/или ферменты представлены в табл. 1, как указано ранее.

В некоторых вариантах выполнения изобретения расщепляемый фрагмент выбран из группы, состоящей из 2001 и 3001, и их производных. В некоторых вариантах выполнения изобретения расщепляемый фрагмент выбран из группы, состоящей из 2001 (SEQ ID NO: 297), 2006 (SEQ ID NO: 300), 2007 (SEQ ID NO: 301), 2008 (SEQ ID NO: 302), 2009 (SEQ ID NO: 303), 2012 (SEQ ID NO: 305), 2011 (SEQ ID NO: 304), 2003 (SEQ ID NO: 298), 3001 (SEQ ID NO: 306), 3006 (SEQ ID NO: 313), 3007 (SEQ ID NO: 308), 3008 (SEQ ID NO: 309), 3009 (SEQ ID NO: 310), 3012 (SEQ ID NO: 312), 3011 (SEQ ID NO: 311) и 2005 (SEQ ID NO: 299). В табл. 3 представлены дополнительные расщепляемые фрагменты, которые можно использовать с активируемыми антителами против CTLA-4, раскрытыми в настоящем документе.

Таблица 3

Расщепляемые фрагменты активируемого анти-CTLA-4

ИДЕНТИФИКАТОР ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	Последовательность СМ
313	LSGRSDNH
314	LSGRSANPRG
315	TGRGPSWV
316	PLTGRSGG
317	TARGPSFK
318	NLSGRSEHSG
319	NLSGRSGNHGS
320	TSTSGRSANPRG
321	TSGRSANP
322	VHMPGLFLGP
306	AVGLLAPPGGLSGRSDNH
307	AVGLLAPPGGLSGRSDDH
308	AVGLLAPPGGLSGRSDIH
309	AVGLLAPPGGLSGRSDQH
310	AVGLLAPPGGLSGRSDTH
338	AVGLLAPPGGLSGRSDYH
339	AVGLLAPPGGLSGRSANI
340	AVGLLAPPGGLSGRSDNI
312	AVGLLAPPGGLSGRSANP
311	AVGLLAPPGGLSGRSDNP
299	AVGLLAPPSGRSANPRG
323	AVGLLAPP
324	AQNLLGMV
325	QNQALRMA
326	LAAPLGLL
327	STFPFGMF
328	ISSGLLSS
329	PAGLWLDP
330	VAGRSMRP
331	VVPEGRRS
332	ILPRSPAF
333	MVLGRSLL
334	VAGRSMRP
335	QGRAITFI
336	SPRSIMLA
337	SMLRSMPL
297	ISSGLLSGRSDNH
300	ISSGLLSGRSDDH
301	ISSGLLSGRSDIH
302	ISSGLLSGRSDQH
303	ISSGLLSGRSDTH
341	ISSGLLSGRSDYH
342	ISSGLLSGRSANI
343	ISSGLLSGRSDNI
305	ISSGLLSGRSANP
304	ISSGLLSGRSDNP
298	ISSGLLSGRSANPRG

Маскирующий фрагмент.

Активируемые антитела против CTLA-4, представленные в настоящем документе, содержат маскирующий фрагмент (ММ). В некоторых вариантах выполнения изобретения ММ представляет собой аминокислотную последовательность, которая связана или иным образом присоединена к антителу против CTLA-4 и расположена в конструкции активируемого антитела против CTLA-4, так что ММ снижает способность антитела против CTLA-4 специфически связывать CTLA-4. В некоторых вариантах выполнения изобретения ММ специфически связывается с антигенсвязывающим доменом. Подходящие ММ идентифицируются с использованием любой из множества известных методик. Например, пептидные ММ идентифицируют с использованием способов, описанных в Публикациях Патентных

Заявок США № 2009/0062142, Daugherty et al.; и 2012/0244154, Daugherty et al., содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте.

В некоторых вариантах выполнения изобретения ММ выбран из группы, состоящей из YV01-YV66,

и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из приведенной ниже табл. 4.

Таблица 4

Маскирующие фрагменты (ММ) анти-CTLA-4

ИДЕНТИФИКАТОР ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ММ	ИДЕНТИФИКАТОР ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ММ
1	DFSLHSMYNVCLDP	147	EHCDVWMFGFNLCPY
2	QPCAQMYGYSMCPHT	148	EPCDYWMFGVNLCPY
3	LHCRTQMYGYNLCPY	149	EQCTMWMYGFNLCPY
4	LHCRTQLYGYNLCPY	150	ESACSLRMYEVCLQP
5	CTYSFFNVC	151	ESCASMYGYSMCPRT
6	CAQMYGYSMC	152	ESCSYWMFGVNLCPY
7	CPNHPMC	153	FSNTCPHHPMCYDYR
8	GTACTYSFFNVCLDP	154	FWNTCPHHPMCHDYK
9	FGTACPNHPMCHDWQ	155	FYQNCYPPTWCSMFS
10	SACAYWMFGVNLCPY	156	GECSYWMFGVNLCPY
11	CRTQLYGYNLC	157	GGSCMYSFFNICLDP
12	CRTQIYGYNLC	158	GGSCVYVMYNVCLDP
13	LHCRTQIYGYNLCPY	159	GHCLMHMYGYNLCPK
14	CPNHPMCHDWQ	160	GHCRRMSMYEMTLCPR
15	GTACPNHPMCHDWQ	161	GISCVHIMFNFCLDP
16	CAYWMFGVNLCPY	162	GLCVMYMFGVNLCPY
17	QECHLYMYGVNLCPY	163	GSCDYWMFGVNLCPY
18	CHLYMYGVNLCPY	164	GSYCMYVMYNVCLDP
19	GQCQFYMFYGYNLCPY	165	GTKCIYSFYNVCLDP
20	LSTCMYSFFNVCLDP	166	GTSTCPYHPMCHDYR
21	CLHSMYNVCLDP	167	GTTCTYSFFNVCLDP
22	CLHSMYNVC	168	GVCHFFMYGVSMCPA
23	CLHSLYNVCLDP	169	GVPCWYSMYNVCLDP
24	CLHSAYNVCLDP	170	GVSCMYSMFNICLDP
25	CMYSFFNVCLDP	171	HAKCVYSFFNVCLDP
26	CMYSFFNVC	172	HDSCMYSMYNFCLDP
27	QPCAQMYGYSMC	173	HGNTCPNHMPCHDYQ
28	CAQLYGYSMCPHT	174	HKGCLYSFYNICLDP
29	CAQMYGYSMCAHT	175	HKGCLYSFYNVCLDP
30	CAQMYGYSMCPAT	176	HLSCMYIMYNVCLDP

31	CAQMYGYSMCPHT	177	HSSCIYSMFNVCLDP
32	CPNHPLCHDWQ	178	HTNMCPYHPMCYDYK
33	CPNHPMCADWQ	179	HTPCTYSFFNVCLDP
34	CPNHPMCHAWQ	180	IMNTCPYHPMCHDYQ
35	CPNHPMCHDAQ	181	IVPCTYMMFGVCLQP
36	CPNHPMCHDWA	182	KKCDYWFYGVNLCPY
37	GTACPNHPMC	183	KNTCVYSFFNVCLDP
38	LHCRTQLYGYNLC	184	KPCAQMYGYSMCPHP
39	CRTQLYGYNLCPY	185	KPSCMYSFFNVCLDP
40	CRTQLYGYNLCAY	186	KRPCMYSFYNVCLDP
41	CRTQLYGYNLCPA	187	KTSCMYSFYNICLDP
42	FGTACPNHPLCHDWQ	188	KTTCTYSFFNVCLDP
43	CPNHPLCHDFQ	189	LDCQMYWWFGACGDM
44	CPNHPLCHDYQ	190	LHCAIYMYGYNLCPF
45	CPNHPLCPY	191	LHCPFQMYGYNLCPH
46	CPNHPLCPA	192	LHCSMYMYGFNLCPN
47	CMYSFFNVCYP	193	RECMAYMYGYNLCPY
48	CMYSFFNVCYA	194	RHCQMFMFGYDLCPY
49	CLYSFFNVCYP	195	LIHCRYVMYGMCLP
50	CLYSFFNVCYA	196	LLPCEVMGSPRCKHD
51	FGAACPNHPICHDWQ	197	LPCHAYMYGYSLCPY
52	FGAACPNHPLCHDWQ	198	LPCLAYMYGVNLCPN
53	FGAACPNHPMCHDAQ	199	LPCMAYMFGFNLCPH
54	CLHSAYNACLDP	200	LPCNFHMFNFNLCPY
55	CAHSAYNVCLDP	201	LQCAMYMYGYNLCPY
56	CLHSAYNVCADP	202	LSSCTYSFFNVCLDP
57	CLHSAYNVCLAP	203	LTCPFQMYGYNLCPY
58	CLHSAYNVCLDA	204	LTSQCSPPWYWCQIYD
59	KNTCTYVVMYNVCLDP	205	LYCPYMMYGYNLCPY
60	YISDCPYHPMCHDYQ	206	LYHCTYSFYNVCLDP
61	FRNTCPYHPMCHDYR	207	LYRCIYSFYNVCLDP
62	RECHMWMFGVNLCPY	208	MGCSMRMWGMELCPE
63	AVCHMYMYGYNLCPF	209	MKCDYWLYGYNLCPY
64	RSCPQMYGYSMCPHT	210	MNHCTLHMYNICMDP
65	QPCAQMFGYSMCPHT	211	MNPECPHHPMCHNSN
66	TAKCTYSFFNVCLDP	212	MPACTYSFFNICLDP
67	DFSCLYSMYNVCLDP	213	MPQCHVIMYNLCCLDP
68	DVSCMYMMYNFCLDP	214	MSTCTYSFFNVCLDP
69	CPNHPMC	215	MTCNYWFYGVNLCPY
70	CMYSFFNVCYP	216	MYCHQSMFGFRMCPD
71	CMYSFFNVCPA	217	NACAQMYGYSMCPHT
72	CTYSFFNVCYP	218	NDCDISMFDQSLCPY
73	CTYSFFNVCPA	219	NFSCVYVMFNVCLDP
74	GFPCMYSMFNVCLDP	220	NFTCALTMYEVCLDP

75	GLSCMYSMYGYCLDP	221	NLCHAFMFGFNLCPY
76	IPCDYWMFGVNLCPY	222	NLNNCPHPMCHDYQ
77	QVCHAYMYGYNLCPY	223	NPPCMYSFFNICLDP
78	RMYCTYSFYNVCLDP	224	NSACTYSFFNVCLDP
79	ALSCMYIMYNVCLDP	225	NVCTVSMFGVMLCPS
80	DFSCMYVMFNVCLDP	226	PACATLMYSVPLCPA
81	DFSCVYSMFNVCLDP	227	PAPCMYSFYNVCLDP
82	DMNTCPNHPMCYDYR	228	PLCAEMYGYSMCPHN
83	DMNTCPRHPMCHDYH	229	PQCHLYMYGYNLCPY
84	DSRCMYVMYNVCLDP	230	PRPCMYSFYNVCLDP
85	EHLCTYSFYNVCLDP	231	QHCPFQMYGYNLCPY
86	ELSCVYSMFGFCLDP	232	QHCQMFMFGYNLCPY
87	FTNNCPYHPMCHDYL	233	QHSCMYSFFNVCLDP
88	GFSCYIMYDVCLDP	234	QKCHSYLYGVNLCPY
89	GSSCMYSMYNVCLDP	235	QKCNMFMFGYNLCPY
90	HFSCMYIMYNVCLDP	236	QMNDCPNHPMCHDYH
91	LHCGMWMFGVNLCPK	237	QPCAQMYGYSMCPAT
92	LPCQMWMFGHNLCPH	238	QPCAQMYGYSMCPRT
93	LPCTMYMYGYNLCPY	239	RECHFFYGVNLCPY
94	LTCHHWMFGVNLCPY	240	LNCGMFMFGYNLCPY
95	NFSCMYSMFNVCLDP	241	RLCTSYMFGYNLCPQ
96	NNHCMYSFFNICLDP	242	RLSCMYSMFNVCLDP
97	NRSCMYIMYNVCLDP	243	RNCPFVMFGVNLCPY
98	NSCTMFMFGVNLCPY	244	RNGCMYSFFNVCLDP
99	NTCELYMFGVNLCPY	245	RNGCVYSFFNVCLDP
100	QHCDMWMFGYNLCPY	246	RPCHLYMFGYNLCPD
101	QHCPMYMFGYNLCPF	247	RPCHSYMYGINLCPY
102	QVCHIQMYGFDLCPH	248	RSCDMIMFGFNLCPY
103	RACDYWMYGVNLCPY	249	RSCPMWFGVNLCPY
104	RQCHMQMFGYDLCPF	250	RSTVCFYDFCGPWER
105	SGSCLYSFYNVCLDP	251	RTCHFYMFGVNLCPY
106	SNGCTYSFFNVCLDP	252	RTCSMVVMFGVNLCPY
107	STCAQMYGYSMCPH	253	SGKCTYSFFNVCLDP
108	SYKCLYSFYNVCLDP	254	SIVCDLYWEATCLRP
109	VLYCTYVMYNVCLDP	255	SLSCTYSFFNICLDP
110	VNCGMWMFGYNLCPK	256	SMNTCPYHPMCFDYK
111	YGSCLYSFYNICLDP	257	SQCWMWMYGYNLCPK
112	YPCAQMYGYSMCPHT	258	SSSCMYSFFNVCLDP
113	AACDLWMFGVNLCPY	259	STACTYSFYNVCLDP
114	AFCTLAPYNQACIAN	260	STCAQMYGYSMCPHT
115	AGSCLYSMYNVCLDP	261	STRCVYSFYNVCLDP
116	ALCENTMYGYHLCPW	262	TACGAWMFGVNLCPY
117	ALSCMYIMYGVCLDP	263	TGACMYSFYNVCLDP
118	APVCDVLMFGFCMQP	264	TLSCMYSMYNVCLDP

119	AQVCSIMMYGTCLMP	265	TSCTVTMYQISMCPY
120	ASTCMYSFYNVCLDP	266	VGGCRHSFYNVCLDP
121	AVCEFWMFGENLCPY	267	VHCQMYMYGYNLCPY
122	DANTCPNHPMCYDYH	268	VHNCMYSFFNVCLDP
123	DFSCIYIMFDVCLDP	269	VMCKLHMYGIPVCPK
124	DFSCMYVMYGFCLDP	270	VNFCNYSMYGICLLP
125	DFTCMYSMYNVCLDP	271	VNFCYACYCMSCVFS
126	DFTCTYSMYNVCLDP	272	VNQCTYSFFNVCLDP
127	DHYCTYIMYSICLDP	273	VPCPFHMFYGNLCPY
128	DICTNFMFGVNLCPY	274	VRCQMWMYGFNLCPH
129	DINTCPYHPMCHDYH	275	VRPCTYSFFNVCLDP
130	DKNTCPHHPMCHDYR	276	VSGCTYSFFNICLDP
131	DMNMCPNHPMCHDWH	277	YCSSWDTMTIPACNN
132	DMNSCPNHPMCHDYH	278	YDCDLSMFGIEMCPQ
133	DMNSCPNHPMCYDYR	279	YGNTCPFHHPMCHDYK
134	DMNTCPNHPMCFDYR	280	YGYSMYYSFFNVCLDP
135	DMNTCPNHPMCHDFQ	281	YHCTMHMFYGNLCPF
136	DMNTCPNHPMCHDYR	282	YMNTCPNHPMCFDYQ
137	DMNTCPNHPMCYDYH	283	YMNTCPYHPMCHDYH
138	DMNTCPNHPMCYDYK	284	YMNTCPYHPMCHDYR
139	DMSTCPNHPMCHDYH	285	YNNCTYSFFNVCLDP
140	DRNMCPYHPMCYDYR	286	YPGCQYSFFNVCLDP
141	DSCAFMMFGVNLCPY	287	YRSCTHIMYNVCLDP
142	DSCRSVFDVMVWNCWN	288	YSFCDMLMYDVCLVP
143	DTPNCPHHPMCHNHM	289	YSIDCGLSWWCGGMT
144	DVSCLYVMYSVCLDP	290	YSTTCPYHPMCHDYH
145	DWCASMMFGYNLCPY	291	YVNTCPHHPMCHDYH
146	EFSCMYSMFNVCLDP	292	YVNTCPYHPMCHDYN

В некоторых вариантах выполнения изобретения K_d активируемого антитела против CTLA-4, содержащего раскрытый в настоящем документе MM, в отношении мишени по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 раз больше или в 5-10, 10-100, 10-200, 10-500, 10-1000 раз больше, чем K_d АВ, не модифицированного MM или родительского АВ по отношению к цели.

В некоторых вариантах MM не является природным партнером связывания активируемого антитела. В некоторых вариантах выполнения изобретения MM не содержит или по существу не имеет гомологии с любым природным партнером связывания активируемого антитела. В некоторых вариантах выполнения изобретения MM не более чем на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80% идентичен любому природному партнеру связывания активируемого антитела. В некоторых вариантах выполнения изобретения MM не более чем на 50, 25, 20 или 10% идентичен любому природному партнеру связывания активируемого антитела. В некоторых вариантах выполнения изобретения MM не более чем на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80% идентичен CTLA-4 человека. В некоторых вариантах выполнения изобретения MM не более чем на 50, 25, 20 или 10% идентичен CTLA-4 человека.

Типичные активируемые антитела против CTLA-4.

Конкретные антитела, описанные в настоящем документе, представляют собой активируемые антитела против CTLA-4, содержащие любую комбинацию маскирующих фрагментов, расщепляемых фрагментов, вариабельных доменов легкой цепи (VL) (или соответствующих CDR) и вариабельных доменов тяжелой цепи (VH) (или соответствующих CDR), описанных в табл. 2-6. В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело против CTLA-4 содержит легкую цепь, содержащую YV01 (SEQ ID NO: 1) в качестве маскирующего фрагмента, LSGRSDNH (SEQ ID NO: 313) в качестве расщепляемого фрагмента и вариабельный домен легкой цепи (VL) ипилимумаба (SEQ ID NO: 344). В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело против CTLA-4 содержит легкую цепь, содержащую YV01 (SEQ ID NO: 1) в качестве маскирующего фрагмента, ISSGLLSGRSDNH (2001) (SEQ ID NO: 297) в качестве расщепляемого фрагмента и CDR вариабельного домена легкой цепи (VL) ипилимумаба (SEQ ID NO: 560, 561 и 562 соответственно). В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело против CTLA-4 содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) ипилимумаба (SEQ ID NO: 345) или только соответствующие CDR (SEQ ID NO: 557, 558 и 559).

В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое анти-CTLA-4 содержит YV39 (SEQ ID NO: 39) в качестве маскирующего фрагмента и ISSGLLSGRSDNP ("2011") (SEQ ID NO: 304) в качестве расщепляемого фрагмента, а также вариабельные домены тяжелой и легкой цепей ипилимумаба ((SEQ ID NO: 345 и 344 соответственно), где MM и CM связаны с VL в расположении MM-CM-VL.

В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело против CTLA-4 включает сигнальный пептид. Сигнальный пептид может быть связан с активируемым антителом против CTLA-4 с помощью спейсера. В некоторых вариантах выполнения изобретения спейсер конъюгирован с активируемым антителом в отсутствие сигнального пептида. В некоторых вариантах выполнения изобретения спейс-

сер соединен непосредственно с ММ активируемого антитела. В некоторых вариантах выполнения изобретения спейсер имеет аминокислотную последовательность QGQSGS (SEQ ID NO: 546). В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело содержит спейсер последовательности QGQSGS (SEQ ID NO: 546), соединенный непосредственно с последовательностью ММ CRTQLYGYNLCPY (YV39) (SEQ ID NO: 39) в структурном расположении от N-конца до С-конца "спейсер-ММ-СМ-VL" или "спейсер-ММ-СМ-AB".

В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело против CTLA-4 содержит линкерный пептид (LP) между ММ и СМ. В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело против CTLA-4 содержит линкерный пептид между СМ и антителом или его антигенсвязывающим доменом (AB). В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело против CTLA-4 содержит первый линкерный пептид (LP1) и второй линкерный пептид (LP2), причем активируемое антитело против CTLA-4 имеет структурное расположение от N-конца до С-конца следующим образом: ММ-LP1-СМ-LP2-AB. В некоторых вариантах выполнения изобретения легкая цепь активируемого антитела против CTLA-4 имеет структурное расположение от N-конца до С-конца следующим образом: ММ-LP1-СМ-LP2-VL. В некоторых вариантах выполнения изобретения два линкерных пептида не должны быть идентичными друг другу. Примеры линкерных пептидов, которые можно использовать с активируемыми антителами против CTLA-4, как описано в настоящем документе, представлены в патентной публикации США № 2016/0193332 и международной публикации WO 2016/149201, *ibid*.

Изобретение также относится к модифицированному антителу против CTLA-4, которое содержит ММ, который присоединен к легкой цепи антитела через не расщепляемый протеазой линкер. В некоторых вариантах выполнения изобретения не расщепляемый протеазой линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 570. В некоторых вариантах выполнения изобретения такое модифицированное антитело против CTLA-4 имеет легкую цепь, содержащую YV39 и не расщепляемый протеазой линкер. В некоторых вариантах выполнения изобретения легкая цепь модифицированного антитела против CTLA-4 содержит аминокислотную последовательность

QGQSGSCRTQLYGYNLCPYGGGSSGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPGTLSSL
SPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQYQGSSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 530) или

CRTQLYGYNLCPYGGGSSGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPGTLSSLSPGERAT
LSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
LEPEDFAVYYCQYQGSSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
LNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 531).

Линкеры, подходящие для применения в описанных в настоящем документе композициях, обычно представляют собой линкеры, которые обеспечивают гибкость активируемого антитела против CTLA-4 для облегчения ингибирования связывания активируемого антитела с мишенью. Такие линкеры обычно называют гибкими линкерами (также называемыми в настоящем документе линкерными пептидами). Подходящие линкеры могут быть легко выбраны и могут иметь любую подходящую различную длину, такую как от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 аминокислот до 15 аминокислот, от 3 аминокислот до 12 аминокислот, в том числе от 4 до 10 аминокислот, от 5 до 9 аминокислот, от 6 до 8 аминокислот или от 7 до 8 аминокислот, и могут составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот в длину.

Типичные гибкие линкеры включают глициновые полимеры (G)_n, глицин-сериновые полимеры (включая, например, (GS)_n, (GSGGS)_n (GSGGS представляет собой SEQ ID NO: 534) и (GGGS)_n (GGGS представляет собой SEQ ID NO: 535), где n - целое число по меньшей мере единица), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники. Глициновые и глицин-сериновые полимеры являются относительно неструктурированными и, следовательно, могут быть в состоянии служить нейтральной связью между компонентами. Глицин получает доступ к значительно большему количеству phi-psi-пространства, чем даже аланин, и гораздо менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem., 11173-142 (1992)). Типичные гибкие линкеры включают, но без ограничения Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 536), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 537), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 538), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 539), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 540), Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 541) и т.п. Специалист в данной области поймет, что конструкция активируемых антител может включать линкеры, которые являются полностью или частично гибкими, так что линкер может включать гибкий линкер, а также одну или несколько частей, которые придают менее гибкую структуру для обеспечения структуры желаемых активируемых антител.

В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемые антитела против CTLA-4 включают VL и VH (или соответствующие CDR) ипилимумаба и комбинацию ММ и СМ, представленные в приве-

денной ниже табл. 5, так что любой ММ в столбце 2 можно комбинировать с любым СМ в колонке 4.

Таблица 5

Комбинации активируемых антител против CTLA-4

SEQ ID NO.	Маскирующий Фрагмент (ММ)	SEQ ID NO.	Расщепляемый Фрагмент (СМ)
1	(YV01) DFSCLSMYNVCLDP	313	LSGRSDNH
2	(YV02) QPCAQMYGYSMCPHT	314	LSGRSANPRG
3	(YV03) LHCRTQMYGYNLCPY	315	TGRGPSWV
4	(YV04) LHCRTQLYGYNLCPY	316	PLTGRSGG
5	(YV05) CTYSFFNVC	317	TARGPSFK
6	(YV06) CAQMYGYSMC	318	NTLSGRSENHSG
7	(YV07) CPNHPMC	319	NTLSGRSGNHGS
8	(YV08) GTACTYSFFNVCLDP	320	TSTSGRSANPRG
9	(YV09) FGTACPNHPMCHDWQ	321	TSGRSANP
10	(YV10) SACAYWMFGVNLCPY	322	VHMPLGFLGP
11	(YV11) CRTQLYGYNLC	323	AVGLLAPP
12	(YV12) CRTQIYGYNLC	324	AQNLLGMV
13	(YV13) LHCRTQIYGYNLCPY	325	QNQALRMA
14	(YV14) CPNHPMCHDWQ	326	LAAPLGLL
15	(YV15) GTACPNHPMCHDWQ	327	STFPFGMF
16	(YV16) CAYWMFGVNLCPY	328	ISSGLLSS
17	(YV17) QECHLYMYGVNLCPY	329	PAGLWLDP
18	(YV18) CHLYMYGVNLCPY	330	VAGRSMRP
19	(YV19) GQCQFYMFYGYNLCPY	331	VVPEGRRS
20	(YV20) LSTCMYSFFNVCLDP	332	ILPRSPAF
21	(YV21) CLHSMYNVCLDP	333	MVLGRSL
22	(YV22) CLHSMYNV	334	VAGRSMRP
23	(YV23) CLHSLYNVCLDP	335	QGRAITFI
24	(YV24) CLHSAYNVCLDP	336	SPRSIMLA
25	(YV25) CMYSFFNVCLDP	337	SMLRSMPL
26	(YV26) CMYSFFNVC	297	ISSGLLSGRSDNH
27	(YV27) QPCAQMYGYSMC	300	ISSGLLSGRSDDH
28	(YV28) CAQLYGYSMCPHT	301	ISSGLLSGRSDIH
29	(YV29) CAQMYGYSMCAHT	302	ISSGLLSGRSDQH
30	(YV30) CAQMYGYSMCPAT	303	ISSGLLSGRSDTH
31	(YV31) CAQMYGYSMCPHT	341	ISSGLLSGRSDYH
32	(YV32) CPNHPLCHDWQ	342	ISSGLLSGRSANI
33	(YV33) CPNHPMCADWQ	343	ISSGLLSGRSDNI
35	(YV34) CPNHPMCHAWQ	305	ISSGLLSGRSANP
35	(YV35) CPNHPMCHDAQ	304	ISSGLLSGRSDNP
36	(YV36) CPNHPMCHDWA	298	ISSGLLSGRSANPRG
37	(YV37) GTACPNHPMC	306	AVGLLAPPGGLSGRSDNH
38	(YV38) LHCRTQLYGYNLC	307	AVGLLAPPGGLSGRSDDH
39	(YV39) CRTQLYGYNLCPY	308	AVGLLAPPGGLSGRSDIH
40	(YV40) CRTQLYGYNLCA	309	AVGLLAPPGGLSGRSDQH
41	(YV41) CRTQLYGYNLCPA	310	AVGLLAPPGGLSGRSDTH
42	(YV42) FGTACPNHPLCHDWQ	338	AVGLLAPPGGLSGRSDYH

43	(YV43) CPNHPLCHDFQ	339	AVGLLAPPGGLSGRSANI
44	(YV44) CPNHPLCHDYQ	340	AVGLLAPPGGLSGRSDNI
45	(YV45) CPNHPLCPY	312	AVGLLAPPGGLSGRSANP
46	(YV46) CPNHPLCPA	311	AVGLLAPPGGLSGRSDNP
47	(YV47) CMYSFFNVCYP	299	AVGLLAPPSGRSANPRG
48	(YV48) CMYSFFNVCYA		
49	(YV49) CLYSFFNVCYP		
50	(YV50) CLYSFFNVCYA		
51	(YV51) FGAACPNHPICHDWQ		
52	(YV52) FGAACPNHPLCHDWQ		
53	(YV53) FGAACPNHPMCHDAQ		
54	(YV54) CLHSAYNACLDP		
55	(YV55) CAHSAYNVCLDP		
56	(YV56) CLHSAYNVCADP		
57	(YV57) CLHSAYNVCLAP		
58	(YV58) CLHSAYNVCLDA		
59	(YV60) KNTCTYVMYNVCLDP		
60	(YV61) YISDCPYHPMCHDYQ		
61	(YV62) FRNTCPYHPMCHDYR		
62	(YV63) RECHMWMFGVNLCYP		
63	(YV64) AVCHMYMYGYNLCPF		
64	(YV65) RSCPQMYGYSMCPHT		
65	(YV66) QPCAQMFGYSMCPHT		

В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемые антитела против CTLA-4 включают конкретную комбинацию MM и CM, представленную в табл. 6 ниже.

Таблица 6
Типичная комбинация активируемого антитела против CTLA-4

Комб. No.	Маскирующий Фрагмент (MM)	Расщепляемый Фрагмент (CM)
1	CRTQLYGYNLCPY (SEQ ID NO: 39)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
2	CRTQLYGYNLCPY (SEQ ID NO: 39)	ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 304)
3	CRTQLYGYNLCPY (SEQ ID NO: 39)	ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 305)
4	CRTQLYGYNLCPY (SEQ ID NO: 39)	ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 302)
5	CRTQLYGYNLCPY (SEQ ID NO: 39)	ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 300)
6	CRTQLYGYNLCPY (SEQ ID NO: 39)	ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 303)
7	LHCRTQMYGYNLCPY	ISSGLLSGRSDNH

	(SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 297)
8	LHCRTQMYGYNLCPY (SEQ ID NO: 3)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
9	LHCRTQMYGYNLCPY (SEQ ID NO: 3)	ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 300)
10	LHCRTQMYGYNLCPY (SEQ ID NO: 3)	ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 301)
11	LHCRTQMYGYNLCPY (SEQ ID NO: 3)	ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 302)
12	LHCRTQMYGYNLCPY (SEQ ID NO: 3)	ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 303)
13	CAQMYGYSMC (SEQ ID NO: 06)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
14	CAQMYGYSMC (SEQ ID NO: 06)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
15	FGTACPNHPMCHDWQ (SEQ ID NO: 09)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
16	FGTACPNHPMCHDWQ (SEQ ID NO: 09)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
17	CLHSLYNVCLDP (SEQ ID NO: 23)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
18	CLHSLYNVCLDP (SEQ ID NO: 23)	ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 300)
19	CLHSLYNVCLDP (SEQ ID NO: 23)	ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 301)
20	CLHSLYNVCLDP (SEQ ID NO: 23)	ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 302)
21	CLHSLYNVCLDP (SEQ ID NO: 23)	ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 303)
22	CLHSLYNVCLDP (SEQ ID NO: 23)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
23	CLHSAYNVCLDP (SEQ ID NO: 24)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
24	CLHSAYNVCLDP (SEQ ID NO: 24)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
25	QPCAQMYGYSMC (SEQ ID NO: 27)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
26	QPCAQMYGYSMC (SEQ ID NO: 27)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
27	CAQMYGYSMCAHT (SEQ ID NO: 29)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
28	CAQMYGYSMCAHT (SEQ ID NO: 29)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
29	CPNHPLCHDWQ	ISSGLLSGRSDNH

	(SEQ ID NO: 32)	(SEQ ID NO: 297)
30	CPNHPLCHDWQ (SEQ ID NO: 32)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
31	CPNHMPCADWQ (SEQ ID NO: 33)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
32	CPNHMPCADWQ (SEQ ID NO: 33)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
33	CPNHMPCHDAQ (SEQ ID NO: 35)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
34	CPNHMPCHDAQ (SEQ ID NO: 35)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
35	CRTQLYGYNLCPY (SEQ ID NO: 39)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
36	CRTQLYGYNLCPA (SEQ ID NO: 41)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
37	CRTQLYGYNLCPA (SEQ ID NO: 41)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
38	FGAACPNHPICHDWQ (SEQ ID NO: 51)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
39	FGAACPNHPICHDWQ (SEQ ID NO: 51)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
40	FGAACPNHPLCHDWQ (SEQ ID NO: 52)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
41	FGAACPNHPLCHDWQ (SEQ ID NO: 52)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
42	FGAACPNHPMCHDAQ (SEQ ID NO: 53)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
43	FGAACPNHPMCHDAQ (SEQ ID NO: 53)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
44	CLHSAYNACLDP (SEQ ID NO: 54)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
45	CLHSAYNACLDP (SEQ ID NO: 54)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
46	CAHSAYNVCLDP (SEQ ID NO: 55)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
47	CAHSAYNVCLDP (SEQ ID NO: 55)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
48	CLHSAYNVCADP (SEQ ID NO: 56)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
49	CLHSAYNVCADP (SEQ ID NO: 56)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
50	CLHSAYNVCLAP (SEQ ID NO: 57)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
51	CLHSAYNVCLAP (SEQ ID NO: 57)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
	(SEQ ID NO: 57)	(SEQ ID NO: 306)
52	CLHSAYNVCLDA (SEQ ID NO: 58)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
53	CLHSAYNVCLDA (SEQ ID NO: 58)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
54	YISDCPYHPMCHDYQ (SEQ ID NO: 60)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
55	FRNTCPYHPMCHDYR (SEQ ID NO: 61)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
56	AVCHMYMYGYNLCPF (SEQ ID NO: 63)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
57	RSCPQMYGYSMCPHT (SEQ ID NO: 64)	ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 305)
58	QPCAQMFGYSMCPHT (SEQ ID NO: 65)	ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 305)

В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемые антитела против CTLA-4, описанные в настоящем документе, также включают агент, конъюгированный с активируемым антителом. В некоторых вариантах выполнения изобретения конъюгированный агент представляет собой терапевтический агент, такой как противоопухолевый агент. В некоторых вариантах выполнения изобретения этот агент конъюгирован с углеводным фрагментом активируемого антитела, предпочтительно, когда углеводный фрагмент расположен вне антигенсвязывающей области антитела или антигенсвязывающего фрагмента в активируемом антителе. В некоторых вариантах выполнения изобретения агент конъюгирован с сульфгидрильной группой антитела или антигенсвязывающего фрагмента в активируемом антителе. В некоторых вариантах выполнения изобретения агент конъюгирован с аминогруппой антитела или антигенсвязывающего фрагмента активируемого антитела. В некоторых вариантах выполнения изобретения агент конъюгирован с группой карбоновой кислоты антитела или антигенсвязывающего фрагмента активируемого антитела.

В некоторых вариантах выполнения изобретения агент представляет собой цитотоксический агент, такой как токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или его фрагменты), или радиоактивный изотоп (т.е. радиокоъюгат).

В некоторых вариантах выполнения изобретения конъюгированное активируемое антитело может быть модифицировано для сайт-специфической конъюгации через модифицированные аминокислотные последовательности, вставленные или иным образом включенные в последовательность активируемого антитела. Эти модифицированные аминокислотные последовательности предназначены для обеспечения контролируемого размещения и/или дозировки конъюгированного агента в конъюгированном активируемом антителе против CTLA-4. Например, активируемое антитело может быть сконструировано так, чтобы включать замены цистеина в положениях на легких и тяжелых цепях, которые обеспечивают реакционноспособные тиоловые группы и не оказывают отрицательного влияния на укладку и сборку белка, и изменяют связывание антигена. В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело может быть сконструировано так, чтобы включать или иным образом вводить один или несколько не встречающихся в природе аминокислотных остатков в активируемом антителе для обеспечения подходящих сайтов для конъюгации. В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело может быть сконструировано так, чтобы включать или иным образом вводить ферментативно активируемые пептидные последовательности в последовательность активируемого антитела.

В некоторых вариантах выполнения изобретения агент представляет собой детектируемый фрагмент, такой как, например, метка или другой маркер. Например, агент представляет собой или включает меченую радиоактивным изотопом аминокислоту, одну или несколько биотинильных групп, которые могут быть обнаружены с помощью меченого авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которая может быть обнаружена оптическими или калориметрическими методами), один или несколько радиоизотопов или радионуклидов, одну или несколько флуоресцентных меток, одну или несколько ферментных меток и/или один или несколько хемилюминесцентных агентов. В некоторых вариантах выполнения изобретения обнаруживаемые фрагменты присоединяются с помощью линкерных молекул.

Коъюгаты антитела и цитотоксического агента могут быть получены с использованием множества бифункциональных связывающих белки агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдителиол)пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бис-азидо соединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис(п-дiazонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицина может быть получен, как описано в Vitetta et al., Science, 238:1098 (1987). Меченая углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) представляет собой типичный хелатирующий агент для конъюгации радионуклеотида с антителом (см. WO 94/11026).

Специалистам в данной области должно быть понятно, что большое число возможных фрагментов может быть связано с полученными антителами по изобретению (см., например, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J.M. Cruse, R.E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки).

II. Применения активируемых антител против CTLA-4.

Терапевтические составы по изобретению, которые включают активируемое антитело против CTLA-4, применяются для предотвращения, лечения или иного облегчения заболевания или расстройства, включая, но без ограничения, заболевание или расстройство, связанное с aberrантной экспрессией и/или активностью CTLA-4. Например, терапевтические составы по изобретению, которые включают активируемое антитело против CTLA-4, применяются в качестве иммунотерапии рака, например, для усиления эндогенного иммунного ответа у субъекта, страдающего раком, чтобы таким образом лечить субъекта, где способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества любого из активируемых антител против CTLA-4, описанных в настоящем документе.

Примеры раковых заболеваний, которые можно лечить с применением иммунотерапевтических способов по настоящему изобретению, включают рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, рак молочной железы, рак легких, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, неоперабельную или метастатическую меланому, рак почки, рак матки, рак яичников, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак яичка, рак матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному вагины, карциному вульвы, карциному пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак околощитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак мочеиспускательного канала, рак пениса, гематологическую злокачественную опухоль, солидные опухоли детского возраста, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, рак почечной лоханки, неоплазму центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоль спинного мозга, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, рак эпидермоида, плоскоклеточный рак, рак, вызванный окружающей средой, включая рак, вызванный асбестом, метастазированные раковые заболевания и любые комбинации указанных видов рака. В некоторых вариантах выполнения изобретения рак выбран из MEL, RCC, плоскоклеточного NSCLC, неплоскоклеточного NSCLC, CRC, CRPC, плоскоклеточного рака головы и шеи и карцином пищевода, яичника, желудочно-кишечного тракта и молочной железы. Настоящие способы также применимы для лечения метастатических видов рака.

Другие виды рака включают гематологические злокачественные новообразования, включая, например, множественную миелому, В-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина/первичную В-клеточную медиастенальную лимфому, неходжкинские лимфомы, острую миелоидную лимфому, хронический миелогенный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз, фолликулярную лейкемию, диффузную В-крупноклеточную лимфому, лимфому Беркитта, иммунобластическую крупноклеточную лимфому, В-лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников, лимфому мантийных клеток, острый лимфобластный лейкоз, фунгоидный микоз, анапластическую крупноклеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, Т-лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников и любые комбинации указанных видов рака.

Известно, что усиленный протеолиз является признаком рака (см., например, Affara N.I. et al., "De-lineating protease functions during cancer development", *Methods Mol. Biol.*, 539(2009):1-32). Прогрессирование, инвазия и метастазирование опухолей являются результатом нескольких взаимозависимых процессов, в которые вовлечены протеазы. Этот процесс в целом описан в публикации США № 2016/0193332 A1, которая включена в полном объеме.

В некоторых вариантах выполнения этих способов лечения субъекта, страдающего раком, активируемые антитела по настоящему изобретению, например, активируемый ипилимумаб, вводят субъекту в качестве монотерапии. В некоторых вариантах выполнения изобретения стимуляция или блокада иммуномодулирующих мишеней может эффективно сочетаться со стандартными методами лечения рака, включая химиотерапевтические режимы, облучение, хирургическое вмешательство, гормональную депривацию и ингибиторы ангиогенеза. Активируемое антитело против CTLA-4 может быть связано с противоопухолевым агентом (в виде иммуноконъюгата) или может вводиться отдельно от агента. В последнем случае (раздельное введение) антитело можно вводить до, после или одновременно с агентом или можно вводить совместно с другими известными терапевтическими агентами. Химиотерапевтические лекарственные средства включают, среди прочих, доксорубин (ADRIAMYCIN®), цисплатин, карбоплатин, блеомицин сульфат, кармустин, хлорамбуцил (LEUKERAN®), циклофосфамид (CYTOXAN®; NEOSAR®), леналидомид (REVLIMID®), бортезомиб (VELCADE®), дексаметазон, митоксантрон, этопозид, цитарабин, бендамустин (TREANDA®), ритуксимаб (RITUXAN®), ифосфамид, винкристин (ONCOVIN®), флударабин (FLUDARA®), талидомид (THALOMID®), алемтузумаб (CAMPATH®), офатумумаб (ARZERRA®) эверолимус (AFINITOR®, ZORTRESS®) и карфилзомиб (KYPROLISTM). Совместное введение противораковых агентов, которые действуют через различные механизмы, может помочь преодолеть развитие устойчивости к лекарственным средствам или изменения антигенности опухолевых клеток.

Активируемые антитела против CTLA-4 по настоящему изобретению, такие как активируемый ипилимумаб, также можно применять в комбинации с другими иммуномодулирующими агентами, такими как антитела против других иммуномодулирующих рецепторов или их лигандов. Было идентифицировано несколько других соstimулирующих и ингибирующих рецепторов и лигандов, которые регулируют ответы Т-клеток. Примеры стимулирующих рецепторов включают индуцибельный соstimулятор Т-клеток (ICOS), CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), CD27, обусловленный глюкокортикоидами связанный с TNFR белок (GITR) и медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM), тогда как примеры ингибирующих рецепторов включают запрограммированную смерть-1 (PD-1), запрограммированный лиганд-1 смерти (PD-L1), аттенуатор В и Т-лимфоцитов (BTLA), иммуноглобулин Т-клеток и домен-3 муцина (TIM-3), ген-3 активации лимфоцитов (LAG-3), аденозиновый рецептор A2a (A2aR), лектиноподобный рецептор G1 клетки-киллера (KLRG-1), природный рецептор 2B4 клетки-киллера (CD244), CD160, иммунорецептор Т-клеток с доменами Ig и ITIM (TIGIT) и рецептор для Ig-супрессора V-домена активации

Т-клеток (VISTA). Mellman et al. (2011), *Nature*, 480:480; Pardoll (2012), *Nat. Rev. Cancer*, 12:252; Baitsch et al. (2012), *PloS One*, 7:e30852.

Антитела против PD-1 OPDIVO® (ниволумаб) и KEYTRUDA® (пембролизумаб), как и антитело против PD-L1 TECENTRIQ® (атезолизумаб) были одобрены для применения при лечении рака и могут сочетаться с активируемым антителом против CTLA-4 по настоящему изобретению, например, активируемым ипилимумабом. Эти рецепторы и их лиганды обеспечивают мишени для терапевтических средств, предназначенных для стимуляции, или предотвращения супрессии, иммунного ответа, чтобы тем самым атаковать опухолевые клетки. Weber (2010), *Semin. Oncol.*, 37:430; Flies et al. (2011), *Yale J. Biol. Med.*, 84:409; Mellman et al. (2011), *Nature*, 480:480; Pardoll (2012), *Nat. Rev. Cancer*, 12:252. Стимулирующие рецепторы или рецепторные лиганды являются мишенями для агонистов, тогда как ингибирующие рецепторы или рецепторные лиганды являются мишенями для блокирующих агентов. Одним из наиболее многообещающих подходов к усилению иммунотерапевтической противоопухолевой активности является блокада так называемых "иммунных контрольных точек", которые относятся к множеству ингибирующих сигнальных путей, которые регулируют иммунную систему и имеют решающее значение для поддержания самостоятельной толерантности и модуляции продолжительности и амплитуды физиологических иммунных ответов в периферических тканях для того, чтобы минимизировать повреждение коллатеральных тканей. См., например, Weber (2010), *Semin. Oncol.*, 37:430; Pardoll (2012), *Nat. Rev. Cancer*, 12:252. Поскольку многие из иммунных контрольных точек инициируются взаимодействиями лиганд-рецептор, они могут быть легко заблокированы антителами или модулированы рекомбинантными формами лигандов или рецепторов.

Антитела против PD-1, пригодные для изобретения.

Любое антитело против PD-1, которое известно в данной области, можно использовать в описанных в настоящем документе способах. В частности, различные моноклональные антитела человека, которые специфически связываются с PD-1 с высокой аффинностью, были раскрыты в патенте США № 8008449. Было продемонстрировано, что каждое из гуманизированных антител против PD-1, раскрытое в патенте США № 8008449, обладает одной или несколькими из следующих характеристик:

- (a) связывается с PD-1 человека с K_D 1×10^{-7} М или меньше, как определено поверхностным плазмонным резонансом с использованием биосенсорной системы Biacore;
- (b) практически не связывается с C28 человека, CTLA-4 или ICOS;
- (c) увеличивает пролиферацию Т-клеток в анализе реакции смешанных лимфоцитов (MLR);
- (d) увеличивает выработку интерферона- γ в анализе MLR;
- (e) увеличивает секрецию IL-2 в анализе MLR;
- (f) связывается с PD-1 человека и PD-1 яванского макака;
- (g) ингибирует связывание PD-L1 и/или PD-L2 с PD-1;
- (h) стимулирует антигенспецифические реакции памяти;
- (i) стимулирует ответы антител; и
- (j) ингибирует рост опухолевых клеток *in vivo*.

Антитела против PD-1, используемые в настоящем изобретении, включают моноклональные антитела, которые специфически связываются с PD-1 человека и проявляют по меньшей мере одну, в некоторых вариантах выполнения по меньшей мере пять из предшествующих характеристик.

Другие моноклональные антитела против PD-1 были описаны, например, в патентах США № 6808710, 7488802, 8168757 и 8354509, публикации США № 2016/0272708 и публикациях PCT № WO 2012/145493, WO 2008/156712, WO 2015/112900, WO 2012/145493, WO 2015/112800, WO 2014/206107, WO 2015/35606, WO 2015/085847, WO 2014/179664, WO 2017/020291, WO 2017/020858, WO 2016/197367, WO 2017/024515, WO 2017/025051, WO 2017/123557, WO 2016/106159, WO 2014/194302, WO 2017/040790, WO 2017/133540, WO 2017/132827, WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/106061, каждая из которых включена посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах выполнения изобретения антитело против PD-1 выбирается из группы, состоящей из ниволумаба (также известного как "OPDIVO®"; ранее обозначенного 5C4, BMS-936558, MDX-1106 или ONO-4538), пембролизумаба (Merck, также известного как "KEYTRUDA®", ламбролизумаб и MK-3475; см. WO 2008/156712 A1), PDR001 (Novartis; см. WO 2015/112900), MEDI-0680 (AstraZeneca; AMP-514; см. WO 2012/145493), REGN-2810 (Regeneron; см. WO 2015/112800), JS001 (TAIZHOU JUNSHI PHARMA; см. Si-Yang Liu et al., *J. Hematol. Oncol.*, 10:136 (2017)), BGB-A317 (Beigene; см. WO 2015/35606 и US 2015/0079109), INCSHR1210 (SHR-1210; Jiangsu Hengrui Medicine; см. WO 2015/085847; Si-Yang Liu et al., *J. Hematol. Oncol.*, 10:136 (2017)), TSR-042 (ANB011; Tesaro Biopharmaceutical; см. WO 2014/179664), GLS-010 (WBP3055; Wuxi/Harbin Gloria Pharmaceuticals; см. Si-Yang Liu et al., *J. Hematol. Oncol.*, 10:136 (2017)), AM-0001 (Armo), STI-1110 (Sorrento Therapeutics; см. WO 2014/194302), AGEN2034 (Agenus; см. WO 2017/040790) и MGD013 (MacroGenics).

В одном варианте выполнения изобретения антитело против PD-1 представляет собой ниволумаб. Ниволумаб является полностью человеческим антителом IgG4 (S228P), ингибитором PD-1 в иммунной контрольной точке, которое избирательно предотвращает взаимодействие с лигандами PD-1 (PD-L1 и

PD-L2), тем самым блокируя подавление противоопухолевой функции Т-клеток (Патент США № 8008449; Wang et al., 2014, Cancer Immunol. Res., 2(9):846-56).

В другом варианте выполнения изобретения антитело против PD-1 представляет собой пембролизумаб. Пембролизумаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG4, направленное против рецептора клеточной поверхности человека PD-1 (запрограммированная смерть-1 или запрограммированная гибель клетки-1). Пембролизумаб описан, например, в патентах США № 8354509 и 8900587; см. также www.cancer.gov/drugdictionary?cdrid=695789 (последний доступ: 14 декабря 2014 г.). Пембролизумаб был одобрен FDA для лечения рецидивирующей или рефрактерной меланомы.

Антитела против PD-1, применяемые в раскрытых способах, также включают выделенные антитела, которые специфически связываются с PD-1 человека перекрестно и конкурируют за связывание с PD-1 человека с любым антителом против PD-1, раскрытым в настоящем документе, например, ниволумабом (см. например, патенты США № 8008449 и 8779105; WO 2013/173223). В некоторых вариантах выполнения изобретения антитело против PD-1 связывается с тем же эпитопом, что и любое из антител против PD-1, описанных в настоящем документе, например, ниволумаб. Способность антител к перекрестной конкуренции за связывание с антигеном указывает на то, что эти моноклональные антитела связываются с одной и той же эпитопной областью антигена и стерически препятствуют связыванию других перекрестно конкурирующих антител с этой конкретной эпитопной областью. Ожидается, что эти перекрестно конкурирующие антитела имеют функциональные свойства, очень похожие на свойства эталонного антитела, например, ниволумаба, благодаря их связыванию с той же эпитопной областью PD-1. Кросс-конкурирующие антитела могут быть легко идентифицированы на основе их способности к перекрестной конкуренции с ниволумабом в стандартных анализах связывания PD-1, таких как анализ Biacore, анализы ELISA или проточная цитометрия (см., например, WO 2013/173223).

В конкретных вариантах выполнения изобретения антитела, которые вступают в перекрестную конкуренцию за связывание с PD-1 человека с или связываются с одной и той же эпитопной областью антитела против PD-1 человека, ниволумаба, являются моноклональными антителами. Для введения субъектам-людям эти перекрестно конкурирующие антитела представляют собой химерные антитела, сконструированные антитела, или гуманизированные антитела, или антитела человека. Такие химерные, сконструированные, гуманизированные или моноклональные антитела человека могут быть получены и выделены способами, хорошо известными в данной области техники.

Антитела против PD-1, используемые в способах раскрытого изобретения, также включают антигенсвязывающие части вышеуказанных антител. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществлена фрагментами полноразмерного антитела.

Антитела против PD-1, подходящие для применения в раскрытых способах или композициях, представляют собой антитела, которые связываются с PD-1 с высокими специфичностью и аффинностью, блокируют связывание PD-L1 и/или PD-L2 и ингибируют иммуносупрессивный эффект сигнального пути PD-1. В любой из композиций или способов, раскрытых в настоящем документе, "антитело" против PD-1 включает антигенсвязывающую часть или фрагмент, который связывается с рецептором PD-1 и проявляет функциональные свойства, аналогичные свойствам целых антител в ингибировании связывания лиганда и активизации иммунной системы. В некоторых вариантах выполнения изобретения антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть конкурируют с ниволумабом за связывание с PD-1 человека.

Антитела против PD-L1, пригодные для изобретения.

Любое антитело против PD-L1 может быть применено в способах по настоящему изобретению. Примеры антител против PD-L1, полезных в способах по настоящему изобретению, включают антитела, раскрытые в Патенте США № 9580507. Было продемонстрировано, что каждое из моноклональных антител человека против PD-L1, раскрытых в Патенте США № 9580507, обладает одной или несколькими из следующих характеристик:

- (a) связывается с PD-L1 человека с K_D 1×10^{-7} М или менее, как определено поверхностным плазмонным резонансом с использованием биосенсорной системы Biacore;
- (b) увеличивает пролиферацию Т-клеток в анализе реакции смешанных лимфоцитов (MLR);
- (c) увеличивает продукцию интерферона- γ в анализе MLR;
- (d) увеличивает секрецию IL-2 в анализе MLR;
- (e) стимулирует ответы антител; и
- (f) обращает эффект Т-регуляторных клеток на эффекторные и/или дендритные клетки Т-клеток.

Антитела против PD-L1, применяемые в настоящем изобретении, включают моноклональные антитела, которые специфически связываются с PD-L1 человека и проявляют по меньшей мере одну, в некоторых вариантах выполнения изобретения по меньшей мере пять из предшествующих характеристик.

В конкретных вариантах выполнения изобретения антитело против PD-L1 выбрано из группы, состоящей из BMS-936559 (ранее 12A4 или MDX-1105; см., например, патент США № 7,943,743 и WO 2013/173223), MPDL3280A (также известный как RG7446, атезолизумаб и TECENTRIQ®; US 8217149; см. также Herbst et al. (2013), J. Clin. Oncol. 31(suppl):3000), дупвалумаб (IMFINZI™; MEDI-4736; Astra-

Zeneca; см. WO 2011/066389), авелумаб (Pfizer; MSB-0010718C; BAVENCIO®; см. WO 2013/079174), STI-1014 (Sorrento; см. WO 2013/181634), CX-072 (CytomX; см. WO 2016/149201), KN035 (3D Med/Alphamab; см. Zhang et al., Cell Discov., 7:3 (март 2017), LY3300054 (Eli Lilly Co.; см., например, WO 2017/034916) и CK-301 (Checkpoint Therapeutics; см. Gorelik et al., AACR: abstract 4606 (Apr 2016)).

В конкретных вариантах выполнения изобретения антитело к PD-L1 представляет собой атезолизумаб (TECENTRIQ®). Атезолизумаб является полностью гуманизированным моноклональным антителом IgG1 против PD-L1.

В конкретных вариантах выполнения изобретения антитело к PD-L1 представляет собой дурвалумаб (IMFINZI™). Дурвалумаб является моноклональным антителом IgG1 каппа человека против PD-L1.

В конкретных вариантах выполнения изобретения антитело к PD-L1 представляет собой авелумаб (BAVENCIO®). Авелумаб является моноклональным антителом IgG1 ламбда человека против PD-L1.

В других вариантах выполнения изобретения моноклональное антитело против PD-L1 выбрано из группы, состоящей из 28-8, 28-1, 28-12, 29-8, 5H1 и любой их комбинации.

Антитела против PD-L1, применяемые в раскрытых способах, также включают в себя изолированные антитела, которые специфически связываются с PD-L1 человека и конкурируют за связывание с PD-L1 человека с любым антителом против PD-L1, раскрытым в настоящем документе, например, атезолизумабом и/или авелумабом. В некоторых вариантах выполнения изобретения антитело против PD-L1 связывается с тем же эпитопом, что и любое из антител против PD-L1, описанных в настоящем документе, например, атезолизумаб и/или авелумаб. Способность антител к перекрестной конкуренции за связывание с антигеном указывает на то, что эти антитела связываются с одной и той же эпитопной областью антигена и стерически препятствуют связыванию других перекрестно конкурирующих антител с этой конкретной эпитопной областью. Ожидается, что эти перекрестно конкурирующие антитела имеют функциональные свойства, очень похожие на свойства эталонного антитела, например, атезолизумаба и/или авелумаба, благодаря их связыванию с той же эпитопной областью PD-L1. Кросс-конкурирующие антитела могут быть легко идентифицированы на основании их способности к перекрестной конкуренции с атезолизумабом и/или авелумабом в стандартных анализах связывания PD-L1, таких как анализ Biacore, анализы ELISA или проточная цитометрия (см., например, WO 2013/173223).

В конкретных вариантах выполнения изобретения антитела, которые конкурируют за связывание с PD-L1 человека или связываются с той же эпитопной областью антитела человека против PD-L1, что и атезолизумаб и/или авелумаб, являются моноклональными антителами. Для введения субъектам-людям эти перекрестно конкурирующие антитела представляют собой химерные антитела, сконструированные антитела или гуманизированные антитела или антитела человека. Такие химерные, сконструированные, гуманизированные или моноклональные антитела человека могут быть получены и выделены способами, хорошо известными в данной области техники.

Антитела против PD-L1, применяемые в способах раскрытого изобретения, также включают антигенсвязывающие части вышеуказанных антител. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществлена фрагментами полноразмерного антитела.

Антитела против PD-L1, подходящие для применения в раскрытых способах или композициях, представляют собой антитела, которые связываются с PD-L1 с высокой специфичностью и аффинностью, блокируют связывание PD-1 и ингибируют иммуносупрессивный эффект сигнального пути PD-1. В любой из композиций или в любом из способов, раскрытых в настоящем документе, "антитело" против PD-L1 включает антигенсвязывающую часть или фрагмент, который связывается с PD-L1 и проявляет функциональные свойства, аналогичные свойствам целых антител в ингибировании связывания рецептора и положительной регуляции иммунной системы. В конкретных вариантах выполнения изобретения антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающая часть перекрестно конкурируют с атезолизумабом и/или авелумабом за связывание с PD-L1 человека.

Эффективность предотвращения, улучшения или лечения определяется в сочетании с любым известным способом диагностики или лечения заболевания или расстройства, включая, но без ограничения, заболевание или расстройство, связанное с aberrантной экспрессией и/или активностью CTLA-4. Увеличение продолжительности жизни субъекта или иная задержка прогрессирования заболевания или расстройства, включая, но без ограничения, заболевание или расстройство, связанное с aberrантной экспрессией и/или активностью CTLA-4 у субъекта, указывает на то, что активируемое антитело предоставляет клиническую выгоду.

Понятно, что терапевтические объекты в соответствии с изобретением будут вводиться с подходящими носителями, наполнителями и другими агентами, которые включены в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и т.п. Множество подходящих составов можно найти в справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1975)), в частности в главе 87 авторов Blaug, Seymour. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как Lipofectin™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакса (полиэтиленгликоли различной молекуляр-

ной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. Любая из вышеперечисленных смесей может быть подходящей для лечения и терапии в соответствии с настоящим изобретением при условии, что активный ингредиент в составе не инактивируется составом, и состав является физиологически совместимым и переносимым с путем введения. См. также Baldrick P., "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance", Regul. Toxicol. Pharmacol., 32(2):210-8 (2000); Wang W., "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals", Int. J. Pharm., 203(1-2):1-60 (2000); Charman W.N., "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts", J. Pharm. Sci., 89(8):967-78 (2000); Powell et al., "Compendium of excipients for parenteral formulations". PDA J. Pharm. Sci. Technol., 52:238-311 (1998) и ссылки в них для получения дополнительной информации, относящейся к составам, наполнителям и носителям, хорошо известным химикам в области фармацевтики.

Активируемые антитела против CTLA-4 можно вводить в форме фармацевтических композиций. Принципы и соображения, связанные с приготовлением таких композиций, и рекомендации по выбору компонентов приведены, например, в Remington: The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro et al., editors), Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

Композиция также может содержать более одного активного соединения, которое необходимо для конкретного показания, подвергаемого лечению, предпочтительно такое, которое обладает дополнительными активностями, которые не оказывают вредного влияния друг на друга. Альтернативно или в дополнение, композиция может содержать агент, который усиливает ее функцию, такой как, например, цитотоксический агент, цитокин, химиотерапевтический агент или агент, ингибирующий рост. Такие молекулы подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для предполагаемой цели.

Активные ингредиенты также могут быть захвачены в микрокапсулы, приготовленные, например, методиками коацервации или межфазной полимеризацией, например гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и микрокапсулах) или в макроэмульсиях.

Составы, применяемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко достигается путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

Могут быть приготовлены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, причем эти матрицы имеют форму профилированных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, неразлагаемый этилен-винилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT[™] (инъецируемые микросферы, составленные из сополимера молочной кислоты-гликолевой кислоты и ацетата лейпролида) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. Хотя такие полимеры, как этилен-винилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота, позволяют высвобождать молекулы в течение более 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени.

В некоторых вариантах выполнения изобретения активируемое антитело содержит обнаруживаемую метку. Можно использовать интактное антитело или его фрагмент (например, Fab, scFv или F(ab)₂). Термин "меченный" в отношении зонда или антитела предназначен для охвата прямой маркировки зонда или антитела путем связывания (т.е. физического связывания) детектируемого вещества с зондом или антителом, а также непрямого маркировки зонда или антитела по реактивности с другим реагентом, который непосредственно помечен. Примеры непрямого помечки включают обнаружение первичного антитела с использованием флуоресцентно-меченного вторичного антитела и концевую метку ДНК-зонда биотином так, чтобы его можно было обнаружить с помощью флуоресцентно-меченного стрептавидина. Предполагается, что термин "биологический образец" включает ткани, клетки и биологические жидкости, выделенные от субъекта, и ткани, клетки и жидкости, присутствующие в субъекте. Следовательно, в термин "биологический образец" входит кровь и ее фракция или компонент, включая сыворотку крови, плазму крови или лимфу. Например, антитело может быть мечено радиоактивным маркером, присутствие и местоположение которого в субъекте можно обнаружить стандартными методиками визуализации.

III. Фармацевтические композиции.

Активируемые антитела против CTLA-4 по изобретению (также называемые в настоящем документе "активными соединениями") и их производные, фрагменты, аналоги и гомологи могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции обычно содержат активируемое антитело и фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" предназначен для включения любых и всех раствори-

телей, дисперсионных сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых агентов, изотонических и задерживающих абсорбцию агентов и т.п., совместимых с фармацевтическим введением. Подходящие носители описаны в самом последнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences, стандартном справочном тексте в данной области, которое включено в настоящий документ посредством ссылки. Предпочтительные примеры таких носителей или разбавителей включают, но без ограничения, воду, физиологический раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5%-ной сывороточный альбумин человека. Также могут быть использованы липосомы и неводные носители, такие как нелетучие масла. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области техники. За исключением тех случаев, когда обычные среды или агент несовместимы с активным соединением, их применение в фармацевтических композициях возможно. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Фармацевтическая композиция по изобретению составлена так, чтобы она была совместимой с предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например, внутривенное, внутрикожное, подкожное, пероральное (например, ингаляционное), трансдермальное (т.е. местное), трансмукозальное и ректальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, внутрикожного или подкожного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. pH можно регулировать кислотами или основаниями, такими как соляная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы со множественными дозами, изготовленные из стекла или пластика.

Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (где растворимы в воде) или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсии. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, CremoPhor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко использовать в шприце. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и подходящими их смесями. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Длительная абсорбция инъектируемых композиций может быть достигнута включением в композицию агента, который задерживает абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активного соединения в необходимом количестве в подходящем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости с последующей фильтрующей стерилизацией. Обычно, дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и сушка вымораживанием (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный требуемый ингредиент из предпочтительно стерильно отфильтрованного раствора.

Для введения путем ингаляции соединения доставляются в форме аэрозольного спрея из находящегося под давлением контейнера или диспенсера, который содержит подходящий пропеллент, например газ, такой как диоксид углерода, или небулайзера.

Системное введение также может осуществляться трансмукозальным или трансдермальным способом. Для трансмукозального или трансдермального введения в составе используются пенетранты, подходящие для проникновения через барьер, для прохождения которого они предназначены. Такие пенетранты обычно известны в данной области и включают, например, для трансмукозального введения, детергенты, соли желчных кислот и производные фузидиевой кислоты. Введение через слизистую оболочку может быть достигнуто путем использования назальных спреев или суппозитория. Для трансдермального введения активные соединения составляют в виде мазей, натирок, гелей или кремов, общеиз-

вестных в данной области техники.

Активируемые антитела по настоящему изобретению также можно вводить подкожно в сочетании с агентами для облегчения введения больших объемов в одном месте (агентами для диспергирования лекарственных средств в межклеточном пространстве), такими как растворимые нейтрально-активные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, растворимые в воде гликопротеины гиалуронидазы PH-20, такие как gHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Некоторые типичные sHASEGP и способы их применения, включая gHuPH20, описаны в патентных публикациях США № 2005/0260186 и 2006/0104968. В одном аспекте sHASEGP комбинируют с одной или несколькими дополнительными гликозаминогликаназами, такими как хондроитиназы.

Соединения также могут быть получены в форме суппозитория (например, с обычными основами для суппозитория, такими как масло какао и другие глицериды) или удерживающих клизм для ректальной доставки.

В некоторых вариантах выполнения изобретения активные соединения получают с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого выведения из организма, такими как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы приготовления таких составов будут очевидны для специалистов в данной области. Материалы также могут быть получены коммерчески от Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомные суспензии (включая липосомы, нацеленные на инфицированные клетки, с моноклональными антителами к вирусным антигенам) также могут быть использованы в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области, например, как описано в патенте США № 4522811.

Особенно предпочтительно составлять пероральные или парентеральные композиции в дозированной единичной форме для простоты введения и однородности дозы. Единичная дозированная форма, как используется в настоящем документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве унифицированных доз для субъектов млекопитающих, подлежащих лечению; причем каждая единица содержит predetermined количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация дозированных лекарственных форм по изобретению продиктована и напрямую зависит от уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, и от ограничений, присущих природе приготовления такого активного соединения для лечения индивидуумов.

Фармацевтические композиции могут быть включены в контейнер, упаковку или диспенсер вместе с инструкциями для введения.

Варианты выполнения настоящего раскрытия могут быть дополнительно определены посредством ссылки на следующие неограничивающие примеры, которые подробно описывают получение конкретных антител по настоящему изобретению и способы применения антител по настоящему изобретению. Специалистам в данной области будет очевидно, что многие модификации, как материалов, так и способов, могут быть осуществлены без отклонения от объема настоящего раскрытия.

Изобретение будет дополнительно описано в следующих примерах, которые не ограничивают объем изобретения, описанный в формуле изобретения.

Примеры

Пример 1. Идентификация маскирующих фрагментов для активируемого антитела против CTLA-4.

Чтобы идентифицировать маскирующие фрагменты (ММ), которые уменьшают связывание антител против CTLA-4 с их целевым белком, антитело против CTLA-4 (т.е. ипилимумаб) использовали для скрининга пептидных библиотек с применением способов, аналогичных описанным в международных публикациях РСТ № WO 2009/025846, WO 2010/081173 и WO 2016/149201, содержание которых настоящим включено посредством ссылки во всей полноте. Скрининг состоял из двух раундов очистки с помощью магнитно-активированной сортировки клеток (MACS) с последующими тремя раундами флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS).

Первоначальную очистку MACS проводили с применением белка-A Dynabeads® (Invitrogen) и антитела против CTLA-4 в концентрации 100 нМ. Приблизительно 10^{11} клеток подвергали скринингу на связывание и собирали 6×10^6 клеток. Вторая очистка MACS была выполнена с помощью стрептавидина DYNABEADS® (Thermo Fisher Scientific) и биотинилированного антитела против CTLA-4 в концентрации 100 нМ. Элюат после начальной очистки MACS был расширен, приблизительно 10^{11} клеток было проверено на связывание и приблизительно 10^7 клеток было собрано. Выход описанной ранее очистки MACS подвергали последовательным раундам сортировки FACS с уменьшением концентрации анти-CTLA-4, меченного Alexa Fluor® 488 (Thermo Fisher Scientific). Меченые антитела против CTLA4 использовали в концентрациях 10, 1 нМ и 200 нМ для первой, второй и третьей сортировок соответственно. Индивидуальные пептидные клоны из третьей сортировки были идентифицированы с помощью анализа

последовательности и впоследствии проверены на их способность связывать антитело против CTLA4. Для созревания аффинности были выбраны две пептидные консенсусные последовательности: XXXXXXMYGYNLCPY (SEQ ID NO: 554) и XXXCXHSMYNVCLDP (SEQ ID NO: 555).

Библиотеки созревания аффинности были построены на этих консенсусных последовательностях, как описано в табл. 7. Строки 1 и 3 представляют консенсусную последовательность, а строки 2 и 4 представляют нуклеотидные последовательности, кодирующие пептидные библиотеки, которые были вставлены в систему отображения с использованием способа, аналогичного описанному в международной публикации PCT № WO 2010/081173, *ibid*.

Таблица 7

Библиотеки созревания

1	X	X	C	X	X	X	M	Y	G	Y	N	L	C	P	Y
2	NN	NN	TG	NN	NN	NN	NT	TW	GG	KW	AA	CT	TG	CC	TA
	K	K	C	K	K	K	T	T	G	T	T	G	C	G	T
3	X	X	X	C	X	H	S	M	Y	N	V	C	L	D	P
4	NN	NN	NN	TG	NN	NW	AG	NT	TW	AA	NT	TG	CT	GA	CC
	K	K	K	C	K	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T

Библиотеки созревания подвергали скринингу способом, аналогичным описанному для наивных библиотек, описанных выше. Скрининг состоял из одного раунда MACS и последующих раундов сортировки FACS. MACS выполняли с использованием белка-A DYNABEADS® (Thermo Fisher Scientific) и антитела против CTLA-4 в концентрации 100 нМ. Для MACS 10^{11} клеток были проверены на связывание, и было отобрано приблизительно 10^8 клеток. Элюат из MACS расширяли, и приблизительно 10^{11} клеток подвергали последовательным раундам сортировки FACS с уменьшающимися концентрациями меченного Alexa Fluor® 488 антитела против CTLA4. Меченые антитела против CTLA4 использовали в концентрациях 100, 20, 5, 1 и 1 нМ для первой, второй, третьей, четвертой и пятой сортировок соответственно. Индивидуальные пептидные клоны четвертой и пятой сортировок были идентифицированы с помощью анализа последовательности и впоследствии проверены на их способность связывать антитело против CTLA4. Последовательности маскирующих фрагментов анти-CTLA-4, идентифицированные с помощью способов, описанных выше, представлены в табл. 4 и 5. Четыре консенсусных последовательности могут быть получены из маскирующих последовательностей, перечисленных в табл. 4 и 5.

Консенсусная 1. C(L/M/V/T)Y(S/V/I)(F/L/M/A)(Y/F)N(V/I)CLDP (SEQ ID NO: 566)

Консенсусная 2. CAQMYGYSMC(P/A)(H/R/A)T (SEQ ID NO: 567)

Консенсусная 3. CX(M/I/Y/L/N/F)(Y/W/F/Q/T)(M/Y)YG(Y/V/F)(N/D)LCP(Y/F) (SEQ ID NO: 568)

Консенсусная 4. (N/T)(S/T/M/A)CP(N/Y)HP(M/L)C(H/F/Y)D(Y/F/W) (SEQ ID NO: 569)

Пример 2. Конструирование и характеристика активируемых антител против muCTLA-4.

Для того чтобы продемонстрировать подтверждение концепции, что активируемые антитела против CTLA-4 можно применять для лечения опухолей, шесть активируемых антител против CTLA-4 мыши (на основе клона 9D9) были сконструированы с применением методик, аналогичных тем, которые описаны в примерах 1 и 3 настоящего документа. Эти антитела содержат либо MY11, либо MY03 в качестве маскирующего фрагмента и расщепляемый фрагмент "0003", имеющий аминокислотную последовательность TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 320), "1004", имеющий аминокислотную последовательность AVGLLAPP (SEQ ID NO: 323) или "2001", имеющий аминокислотную последовательность ISSGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297). Все антитела имели изотип IgG2a мыши. В качестве контролей использовали моноклональное антитело мыши против CTLA-4 (9D9) ("9D9 mg2a") и антитело человека против дифтерийного токсина с изотипом mIgG2a ("mg2a").

В день 0 мышам BALB/c подкожно инъецировали 1×10^6 опухолевых клеток CT26. Введение различных антител начинали на 7 день после имплантации опухоли. Перед введением измеряли размер опухоли, и мышей рандомизировали в различные группы лечения, чтобы иметь сопоставимые средние объемы опухоли (например, 39-44 мм³). Опухоли измеряли штангенциркулем в двух измерениях, а объем опухоли рассчитывали как

$$L \times (W^2/2),$$

L=длина (самое длинное из 2 измерений),

W=ширина.

Затем мышам внутрибрюшинно (i.p.) вводили назначенное антитело (например, 25 мкг/доза). Объем опухоли измеряли два раза в неделю. На 12-й день после имплантации опухоли некоторых мышей из каждой группы умерщвляли, а опухоль и селезенку собирали для иммуномониторинга, чтобы исследовать влияние антител на популяции Т-клеток. Некоторых или всех оставшихся мышей из разных групп использовали для последующего анализа фармакокинетики (PK) и/или фармакодинамики (PD).

Как показано на фиг. 1А, у мышей, которые получили неродственное антитело IgG2a мыши (т.е. ан-

титело человека против дифтерийного токсина), отсутствовал контроль опухоли. В отличие от этого, как показано на фиг. 1С, у мышей, которые получили активируемое антитело мыши против CTLA-4 (содержащее MY11 в качестве маскирующего фрагмента и 2001 в качестве расщепляемого фрагмента), контролировался размер опухоли почти так же, как у мышей, которые получили mAb (9D9) против CTLA-4 мыши (фиг. 1В). Эти данные демонстрируют, что опухолеспецифическая протеаза может расщеплять расщепляемый фрагмент, что приводит к удалению маскирующего фрагмента и связыванию высвобождаемого антитела с его целевым белком.

Чтобы определить, являются ли активируемые антитела против CTLA-4 мыши активными на периферии, в селезенке определяли пролиферацию и активность регуляторных Т-клеток Foxp3+, а в образцах опухолей для сравнения определяли количество регуляторных Т-клеток, как описано в примере 5, *infra*. В соответствии с данными фиг. 1В и 1С все активируемые антитела против CTLA-4 ведут себя аналогично mAb (9D9) против CTLA-4 мыши в опухоли (фиг. 2А). Напротив, активируемые антитела напоминали неродственное антитело IgG2a мыши в селезенке (фиг. 2В и 2С). Такие данные свидетельствуют о том, что содержащий маскирующий фрагмент продомен активируемого антитела против CTLA-4 мыши остается интактным и присоединяется к антителу в селезенке, блокируя активность антитела, тогда как продомен расщепляется специфичными для опухоли протеазами с образованием полностью активного антитела против CTLA-4 в опухоли.

Пример 3. Конструирование активируемых антител против CTLA-4 человека.

Активируемые антитела против CTLA4, содержащие маскирующий фрагмент анти-CTLA4, расщепляемый фрагмент и антитело против CTLA4 (например, ипилимумаб) по изобретению, были получены в соответствии со способами, аналогичными описанным в публикациях PCT № WO 2009/025846, *ibid.*; WO 2010/081173, *ibid.*; и WO 2016/118629, *ibid.* Активируемые антитела против CTLA4 были экспрессированы в клетках EXP1293™ (Thermo Fisher Scientific) и очищены с помощью хроматографии на белке А (MabSelect SuRe, GE Healthcare) в соответствии с протоколами производителей. Контроль качества полученных активируемых антител показал, что большинство содержат по меньшей мере 95% мономера.

Для оценки возможности использования активируемых антител против CTLA-4, описанных в настоящем документе, в условиях человека, антитела были получены в виде тяжелой цепи (Hc) IgG1 (hIgG1) человека и легкой цепи (Lc) каппа (hK) человека. Все активируемые антитела содержат антитело или его антигенсвязывающий домен ипилимумаба. Расщепляемый фрагмент был выбран из группы, состоящей из расщепляемого фрагмента, обозначенного в настоящем документе как "2001" и содержащего последовательность ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297), и его производных и расщепляемого фрагмента, обозначенного в настоящем документе как "3001" и включающего последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306), и его производных. В некоторых вариантах выполнения изобретения расщепляемый фрагмент был выбран из группы, состоящей из ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297), также упоминаемый в настоящем документе как "2001"; ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 300), также упоминаемый в настоящем документе как "2006"; ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 301), также упоминаемый в настоящем документе как "2007"; ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 302), также упоминаемый в настоящем документе как "2008"; ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 303), также упоминаемый в настоящем документе как "2009"; ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 305), также упоминаемый в настоящем документе как "2012"; ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 304), также упоминаемый в настоящем документе как "2011"; ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 298), также упоминаемый в настоящем документе как "2003"; AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306), также упоминаемый в настоящем документе как "3001"; AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 307), также упоминаемый в настоящем документе как "3006"; AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 308), также упоминаемый в настоящем документе как "3007"; AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 309), также упоминаемый в настоящем документе как "3008"; AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 310), также упоминаемый в настоящем документе как "3009"; AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 312), также упоминаемый в настоящем документе как "3012"; AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 311), также упоминаемый в настоящем документе как "3011"; и AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 299), также упоминаемый в настоящем документе как "2005". Маскирующий фрагмент был выбран из группы маскирующих фрагментов, представленных в табл. 4 и 5. В некоторых вариантах выполнения изобретения маскирующий фрагмент представлял собой CRTQLY-GYNLCPY (SEQ ID NO: 39), обозначенный в настоящем документе как YV39. Некоторые из активируемых антител против CTLA-4 также включали спейсерные последовательности и/или линкерные пептиды.

Пример 4. Характеризация *in vitro* активируемых антител против CTLA-4 человека.

Для того чтобы оценить способность активируемых антител связываться с CTLA-4 в отсутствие протеазной активности, использовали иммуоферментный анализ (ELISA) для определения аффинности связывания. Вкратце планшеты Nunc MaxiSorp® покрывали в течение ночи при 40°C 100 мкл/лунку раствора 1 мкг/мл белка CTLA-4 человека (Sino Biological) в PBS, pH 7,4. Затем планшеты трижды промывали PBST (PBS, pH 7,4, 0,05% Tween-20) и лунки блокировали 200 мкл/лунку 10 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBST в течение 2 ч при комнатной температуре. После этого планшеты еще трижды промывали PBST. Активируемые антитела затем серийно разбавляли, как показано ниже в табл. 8.

Таблица 8

Серийное разбавление активируемых антител против CTLA-4 для анализа связывания

	[Антитело] = нМ Колонки 1-3	[активируемое антитело 1] = нМ Колонки 4-6	[активируемое антитело 2] = нМ Колонки 7-9	[активируемое антитело 3] = нМ Колонки 10-12
A	10	1000	1000	1000
B	3,33	333	333	333
C	1,11	111	111	111
D	0,37	37	37	37
E	0,123	12,3	12,3	12,3
F	0,041	4,1	4,1	4,1
G	0,0137	1,34	1,34	1,34
H	.0046	0,45	0,45	Пусто

В данном примере самая высокая концентрация, используемая для родительского антитела и активируемых антител, составляла 10 и 100 нМ соответственно. Однако концентрации могут быть увеличены или уменьшены для получения кривых связывания полного насыщения для активируемых антител с более сильным или более слабым маскированием.

Разбавленные антитела добавляли в планшеты и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого планшеты трижды промывали PBST. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл козьего анти-человеческого IgG (Fab-специфичный, Sigma cat # A0293; разведенный 1:4000 в 10 мг/мл BSA в PBST), и планшет инкубировали в течение еще 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты были обработаны тетраметилбензидином (TMB) и 1 н. HCl. Абсорбцию при 450 нм затем измеряли и указывали в виде оптической плотности (OD 450 нм).

Как показано на фиг. 3A-3E, активируемые антитела против CTLA-4 обычно имели пониженное связывание с CTLA-4 по сравнению с ипилимумабом ("YV1"). См. также фиг. 4A-4D, 5A-5F и 6A, 6B. Такие данные демонстрируют, что маскирующие фрагменты эффективно скрывают антигенсвязывающий домен на активируемых антителах против CTLA-4.

Для дальнейшей оценки способности к связыванию активируемые антитела человека против CTLA-4 серийно разводили (например, от 60 до 0,0003 мкг/мл) и добавляли к 58 клеткам α - β -CTLA-4/CD3 ζ , которые стабильно экспрессируют CTLA-4 человека. После 30 мин инкубации при 4°C добавляли меченое аллофикоцианином (APC) антитело против человека и связывали активируемые антитела против CTLA-4 человека с CTLA-4 человека с использованием проточного цитометра Canto. Среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции (GMFI) определяли с использованием программного обеспечения для анализа FlowJo®. Ипилимумаб использовали в качестве контроля. Как показано на фиг. 7A и 7B, активируемые антитела против CTLA-4 человека не связывались с CTLA-4 человека так же эффективно, как ипилимумаб. Эти данные дополнительно демонстрируют, что в отсутствие специфических протеаз маскирующий фрагмент активируемых антител ингибирует связывание таких активируемых антител с CTLA-4 человека.

Для того чтобы подтвердить, что пониженное связывание, наблюдаемое с активируемыми антителами против CTLA-4, было связано с маскирующим фрагментом, были проведены исследования на моно-усеченных, полностью усеченных MMP и полностью усеченных μ PA формах активируемого антитела, содержащего YV39 в качестве маскирующего фрагмента и 2011 в качестве расщепляемого фрагмента. Моно-усеченную форму антитела получали путем экспрессии конструкции, продуцирующей одну интактную легкую цепь (включая маскирующий фрагмент) и вторую легкую цепь, усеченную в том же положении, как если бы она была расщеплена MMP14. Полностью усеченные формы MMP или μ PA экспрессировались из конструкций с усеченными обеими легкими цепями, как если бы они были расщеплены MMP или μ PA соответственно. Как показано на фиг. 7C и 7D, активируемое моноусеченное антитело имело промежуточное связывание (EC_{50} =2,8 нМ) по сравнению с активируемым неусеченным антителом (EC_{50} =22 нМ) и ипилимумабом (EC_{50} =0,54 нМ). Напротив, полностью усеченные активируемые антитела MMP или μ PA вели себя аналогично ипилимумабу (усеченное MMP: EC_{50} =0,65 нМ; усеченное μ PA: EC_{50} =0,76). Такие данные подтверждают, что сниженное связывание, наблюдаемое с активируемым антителом против CTLA-4, связано с маскирующим фрагментом.

Затем, для того чтобы определить, коррелирует ли наблюдаемое сниженное связывание с CTLA-4 со сниженной активностью, активность активируемого антитела человека против CTLA-4, содержащего YV39 в качестве маскирующего фрагмента и 2011 в качестве расщепляемого фрагмента ("Ipi YV39 2011"), была охарактеризована в функциональном анализе *in vitro* с использованием стафилококкового энтеротоксина B (SEB). SEB является суперантигеном, который сильно активирует Т-клетки и стимулирует секрецию цитокинов. Целые свежие мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли от здоровых людей-доноров с использованием стандартного способа разделения с фиколл-паком.

Проводили серийное разведение антител (например, от 40 до 0,01 мкг/мл) и высевали в трех экземплярах в 96-луночный планшет с плоским дном для культивирования тканей. Используемые антитела включали

- (i) Ipi YV39 2011;
- (ii) ипилимумаб; и
- (iii) неродственный контрольный изотип.

Затем выделенные PBMC ресуспендировали в среде для анализа Т-клеток (среда RPMI+10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (HI-FBS)+1% буфера HEPES+1% заменимой аминокислоты MEM+1% Na-пируват) и добавляли к планшету в количестве 1×10^5 клеток/луноку. Клетки стимулировали субоптимальной концентрацией (например, 85 нг/мл, определяемой титрованием SEB и наблюдаемой стимуляцией пролиферации Т-клеток) SEB. Клетки инкубировали при 37°C в течение 3 дней. Затем концентрацию IL-2 в супернатантах измеряли с помощью гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF). Данные HTRF анализировали с использованием Softmax Pro и представляли графически с использованием GraphPad Prism.

Как показано на фиг. 8, ипилимумаб усиливал опосредованную SEB продукцию IL-2 PBMC дозозависимым образом. Напротив, активируемое антителом Ipi YV39 2011 имело активность, сходную с активностью контрольного изотипа, что позволяет предположить, что маскирующий фрагмент (YV39) эффективен в блокировании функциональной активности ипилимумаба. Эти данные согласуются с данными связывания, описанными выше, и демонстрируют, что в отсутствие специфических протеаз активируемые антитела против CTLA-4 человека проявляют сниженную активность.

Пример 5. Характеризация *in vivo* активируемых антител против CTLA-4 человека.

Для того чтобы охарактеризовать антитела, раскрытые в настоящем документе, *in vivo*, четыре активируемых антитела против CTLA-4 человека (на основе ипилимумаба) получали с использованием IgG2a мыши. Антитела включают YV04, YV23, YV24 или YV39 в качестве маскирующего фрагмента и 2001 в качестве расщепляемого фрагмента ("Ipi YV04 2001", "Ipi YV23 2001", "Ipi YV24 2001" и "Ipi YV39 2001" соответственно). В качестве контроля использовали ипилимумаб ("Ipi mg2a") и неродственный антидифтерийный токсин человека ("контроль mg2a"). Активность этих активируемых антител против CTLA-4 оценивали с использованием модели опухоли MC38, как описано ниже.

Вкратце в день 0 мышам C57BL/6 с CTLA-4 человека подкожно инъецировали 2×10^6 клеток аденокарциномы толстой кишки MC38 в их левую нижнюю часть живота. Опухоли измеряли штангенциркулем в двух измерениях, а объем опухоли рассчитывали как

$$L \times (W^2/2),$$

L=длина (самое длинное из 2 измерений),

W=ширина.

Затем мышей рандомизировали в разные группы, чтобы иметь одинаковые средние объемы опухолей (например, 37 мм³). Введение антител начинали на 7-й день после имплантации опухоли мышам, получавшим однократную дозу (например, 200 мкг/мышь) соответствующего антитела посредством внутрибрюшинной (i.p.) инъекции. На 12-й день после имплантации опухоли несколько мышей из каждой группы умерщвляли, а опухоли и селезенку собирали для иммуномониторинга, чтобы исследовать влияние антител на популяции Т-клеток. Некоторых или всех оставшихся мышей из разных групп использовали для последующего анализа фармакокинетики (PK) и/или фармакодинамики (PD).

Иммуномониторинг популяций Т-клеток.

Собранную опухоль и селезенку обрабатывали на gentleMACS Octo Dissociator™ (Miltenyi, San Diego, CA). Суспензии отдельных клеток окрашивали следующими Т-клеточными маркерами: CD4, CD8, CD19, ICOS, CD45, FoxP3, CTLA-4, CD3, Ki-67, PD-1, Granzyme B и LIVE/DEAD®.

Анализ PK/PD.

Мышей ежедневно проверяли на постуральные, груминговые и респираторные изменения, а также на летаргию. Опухоли и массы тел группы регистрировали два раза в неделю до смерти, эвтаназии или до конца периода исследования. Ответ на лечение измеряли как функцию ингибирования роста опухоли (TGI), которую рассчитывали следующим образом:

$$\% \text{ TGI} = \{1 - [(T_t - T_o) / (C_t - C_o)]\} \times 100,$$

T_t=объем опухоли группы лечения в данный день,

T_o=начальный объем опухоли,

C_t=объем опухоли контрольной группы в данный день,

C_o=начальный объем опухоли контрольной группы.

Животных умерщвляли, если опухоль достигала объема, превышающего приблизительно 2500 мм³ или казалась изъязвленной.

Статистический анализ.

Для расчета среднего значения стандартного отклонения (SD) и медианных значений объемов опухоли и масс тела использовался Microsoft Excel. Средние и медианные значения были рассчитаны, когда 100% и по меньшей мере 60% исследуемых животных остались в каждой группе лечения соответственно. Для построения графика использовали программное обеспечение GraphPad Prism® v. 4.

Как и ожидалось, у мышей, которые получали неродственное контрольное антитело, не контролировался рост опухоли (фиг. 9A), тогда как у всех мышей, которые получали ипилимумаб, эффективно контролировался рост опухоли (фиг. 9B). У мышей, которые получали различные активируемые антитела против CTLA-4 человека, контролировался рост опухоли сравнимо с ипилимумабом (фиг. 9C-9F). Из активируемых антител Ipi YV39 2001 наиболее близко походил на эффективность ипилимумаба в контролируемом росте опухоли (фиг. 9F).

Что касается частоты регуляторных Т-клеток в опухоли и селезенке обработанных мышей, как наблюдалось ранее с активируемыми антителами против CTLA-4 мыши (см. пример 2), активируемые антитела против CTLA-4 человека (изотип IgG2a мыши) ведут себя аналогично ипилимумабу в опухолях (фиг. 12A и 12B), но в селезенке активируемые антитела были более сопоставимы с неродственными контрольными антителами (фиг. 12C-12F).

Представленные в настоящем документе данные в совокупности демонстрируют, что активируемые антитела против CTLA-4 человека, раскрытые в настоящем документе, могут эффективно контролировать опухоли, подобно традиционному ипилимумабу, в то же время демонстрируя меньший риск нежелательных побочных эффектов.

Пример 6. Характеризация *in vivo* активируемых антител против CTLA-4 человека, содержащих модифицированные расщепляемые фрагменты.

Для адресации возможного сайта дезамидирования в определенных последовательностях расщепляемых фрагментов (см. пример 10) активируемые антитела против CTLA4 человека получали с использованием IgG1 человека и различных последовательностей CM. Активируемые антитела содержат YV39 в качестве маскирующего фрагмента и один из нескольких вариантов расщепляемого фрагмента 2001: WT (2001), ANP (2012), DNP (2011) или Q (2008) ("Ipi YV39 2001", "Ipi YV39 2012", "Ipi YV39 2011" и "Ipi YV39 2008" соответственно). Ипилимумаб и неродственный антидифтерийный токсин человека снова использовались в качестве контролей.

Для измерения активности активируемых антител против CTLA-4 использовали модель опухоли MC38, как описано выше в примере 5. Для исследования титрования дозы (фиг. 11A-11F) мышей лечили ипилимумабом или активируемым антителом, содержащим YV39 в качестве маскирующего фрагмента и 2011 в качестве расщепляемого фрагмента ("Ipi YV39 2011"), в дозах 200, 60 и 20 мкг/доза.

Как показано на фиг. 10A и 10B, у мышей, получавших контрольное антитело, не контролировалась опухоль, тогда как 6 из 10 мышей, получавших ипилимумаб, не имели опухолей в конце эксперимента. У мышей, получавших различные активируемые антитела, опухоль была способна контролироваться, как это наблюдалось с традиционным ипилимумабом (фиг. 10C-10F). См. также фиг. 11B-11G.

Что касается частоты регуляторных Т-клеток в опухоли и селезенке обработанных мышей, как отмечалось ранее, опухолеспецифическая протеаза была необходима для расщепления вариантов расщепляемых фрагмента 2001. В опухолях эти активируемые антитела вели себя подобно ипилимумабу в снижении частоты регуляторных Т-клеток Foxp3+ (фиг. 13A, 13B, 14A и 14B). См. также фиг. 15. В селезенке антитела более близко отражали неродственное контрольное антитело (фиг. 13C-13E, 14D-14G и 16A-16B), демонстрируя, что маскирующий фрагмент остается связанным с активируемым антителом в отсутствие специфических ассоциированных с опухолью протеаз.

Пример 7. Характеризация *in vivo* нефукозилированной версии активируемых антител против CTLA-4 человека.

Как описано выше, отсутствие остатков фукозы в ядре может сильно усиливать ADCC посредством улучшенного связывания IgG с активирующим FcγRIIIa без изменения связывания антигена или CDC. Natsume et al. (2009), Drug Des. Devel. Ther., 3:1. Были подготовлены нефукозилированные формы ипилимумаба ("Ipi NF") и ipi YV39 2011 ("Ipi YV39 2011 NF"). Связывание Ipi и Ipi NF определяли для различных Fc-рецепторов мыши, человека и яванского макака. Результаты представлены на фиг. 19. Как и ожидалось, Ipi NF продемонстрировал резко повышенное сродство (т.е. более низкое K_d) к активирующим рецепторам CD16a (FcγRIIIa) человека, CD16 (FcγRIII) макака и FcγRIV мыши.

Ipi YV39 2011 NF и Ipi-NF были протестированы в различных дозах на модели опухоли MC38, описанной в примере 5. Ипилимумаб и неродственный hIgG1 использовали в качестве контролей. Результаты представлены на фиг. 17A-17D. Ipi NF был несколько более эффективен для ограничения или предотвращения роста опухоли, чем ипилимумаб (сравните фиг. 17B и 17C), и Ipi YV39 2011 NF был эквивалентен Ipi NF (сравните фиг. 17C и 17D). Кроме того, Foxp3+ регуляторные Т-клетки также были истощены в опухолях мышей, получавших антитела Ipi NF и Ipi YV39 2011 (см. фиг. 18). В обоих экспериментах показано, что Ipi YV39 2011 NF полностью активируется в опухоли.

Эти результаты подтверждают, что способы по настоящему изобретению в равной степени применимы к нефукозилированным формам ипилимумаба, включая нефукозилированные активируемые антитела к CTLA-4, такие как YV39 2011 NF.

Пример 8. Характеризация *in vivo* активируемых антител против CTLA-4 человека у яванских макаков.

Для того чтобы оценить антитела против CTLA-4 у приматов, яванским макакам вводили активи-

руемое антитело, содержащее YV39 в качестве маскирующего фрагмента и 2001 в качестве расщепляемого фрагмента. Носитель и ипилимумаб использовали в качестве контроля. Каждая обезьяна получала 10 мг антитела или активируемого антитела против CTLA-4, и кровь собирали в дни 0, 4, 8, 15, 22, 36 и 43 после введения антитела. Как показано на фиг. 20, у обезьян, получавших ипилимумаб, наблюдался всплеск пролиферации CD4+ Т-клеток, измеренный окрашиванием Ki67, примерно на 8-15 день после введения антитела. Напротив, активируемое антитело против CTLA-4 ведет себя аналогично контролю с носителем и не вызывает пролиферации CD4+ Т-клеток у обезьян. Эти данные демонстрируют, что даже у приматов активируемое антитело против CTLA-4 проявляет незначительную активацию, если таковая вообще происходит, что указывает на отсутствие специфических протеаз.

В совокупности данные, представленные на фиг. 1-20, демонстрируют, что активируемые антитела против CTLA-4, описанные в настоящем документе, предлагают улучшение по сравнению с ипилимумабом. Активируемые антитела контролируют рост опухоли так же эффективно, как и ипилимумаб, одновременно снижая риск серьезных нежелательных явлений, часто наблюдаемых при лечении ипилимумабом.

Пример 9. Значения K_{app} и ME для активируемых антител CTLA-4.

В табл. 9 представлены значения K_{app} и эффективности маскирования (ME) для активируемых антител, раскрытых в настоящем документе, которые включают различные маскирующие фрагменты и расщепляемые фрагменты в формате IgG1 человека. Значения, представленные в этой таблице, были рассчитаны на основе данных, изображенных на фигурах. K_{app} иллюстрирует аффинность связывания активируемого антитела в условиях измерения, причем в этом примере связывание посредством ELISA; однако следует понимать, что аффинность связывания также можно измерить по связыванию с CTLA-4, экспрессированному на первичных или трансфицированных клетках, или с помощью других физических способов, таких как, но без ограничения, поверхностный плазмонный резонанс или равновесный диализ. Эффективность маскирования (ME) рассчитывают путем деления K_{app} активируемого антитела на K_D ипилимумаба, измеренную в тех же условиях.

Таблица 9

Значения K_{app} и ME												
	CM 2001		CM 3001		CM 2008		CM 2011		CM 2012		NSUB	
	K_{app} нМ	ME	K_{app} нМ	ME	K_{app} нМ	ME	K_{app} нМ	М Е	K_{app} нМ	ME	K_{app} нМ	ME
YV04-YV1	17,8	57										
YV06-YV1	0,6	2										
YV09-YV1	33,6	112	44,4	126								
YV23-YV1	11,4	38	13,8	39								
YV24-YV1			9,0	29								
YV27-	0,7	2,3	0,8	2,3								

YV1												
YV29-YV1	0,7	2,3	0,8	2,3								
YV32-YV1	0,9	3,0	1,2	3,4								
YV33-YV1	1,3	4,3	1,9	5								
YV35-YV1	3,7	12,3	5,3	15								
YV39-YV1	16,9	56	14,3	41	31,4	135	13,2	57	14,9	64	31,8	137
YV41-YV1	14,4	48	22,6	65								
YV51-YV1	4,4	15	4,9	14								
YV52-YV1	0,8	2,7	0,9	2,6								
YV53-YV1	4,1	14	5,3	15								
YV54-YV1	0,6	2	1,0	2,8								
YV55-YV1	4,8	16	6,0	18								
YV56-YV1	0,4	1,3	0,4	1								
YV57-YV1	0,4	1,3	1,6	4,6								
YV58-YV1	0,3	1	0,4	1								

В табл. 10 представлены значения K_{app} и ME для активируемых антител, раскрытых в настоящем документе, включающих различные маскирующие фрагменты и расщепляемые фрагменты в формате Ig2a YV1 мыши. Представленные значения были рассчитаны на основе данных, изображенных на фигурах.

Таблица 10

Значения K_{app} и ME

	CM 2001		CM 2006		CM 2007		CM 2008		CM 2009	
	K_{app} нМ	ME	K_{app} нМ	ME	K_{app} нМ	ME	K_{app} нМ	ME	K_{app} нМ	ME
YV04-YV1	5,7	16,2	26,4	75	19,3	55	19,1	54	16,4	47
YV23-YV1			12,5	36	7,8	22	2,7	8	9,4	27
YV39-YV1	18,0	51	23,9	68			17,6	50	18,0	51

В табл. 11 представлены значения K_{app} и ME для активируемых антител, включающих маскирующие фрагменты, имеющие более высокие значения ME, и расщепляемый фрагмент 2012 в формате YV1 IgG2a мыши. Представленные значения были рассчитаны на основе данных, изображенных на фигурах.

Таблица 11

Значения K_{app} и ME

	CM 2001		CM 2011		CM 2012		NSUB	
	K_{app} нМ	ME	K_{app} нМ	ME	K_{app} нМ	ME	K_{app} нМ	ME
YV39-YV1	18,0	51	18,0	51	12,9	144	29,8	85
YV61-YV1					17,9	200		
YV62-YV1					15,5	173		
YV63-YV1					104	1170		
YV64-YV1					56,5	631		
YV65-YV1					12,3	156		
YV66-YV1					18,9	242		
YV01-YV1					38,6	493		
YV02-YV1					14,8	189		

Пример 10. Оценка дезамидирования, изомеризации и стабилизации для активируемых CTLA-4 антител.

Как предложено в примере 6, для адресации возможного сайта дезамидирования в определенных

последовательностях расщепляемого фрагмента (CM) в определенных активируемых антителах человека против CTLA-4 такие активируемые антитела получали с использованием различных последовательностей CM (т.е. 2001, 2011, 2012 и 2008). В расщепляемых фрагментах 2011, 2012 и 2008 последовательность DNH, обнаруженная в расщепляемом фрагменте 2001, была заменена DNP, ANP и DQH соответственно.

Эти активируемые антитела CTLA-4 были получены путем транзientной трансфекции соответствующих конструкций в клетках HEK 293 и подвергнуты жидкостной хроматографии с пептидным картированием - масс-спектроскопии (LC-MS) для обнаружения потенциальных продуктов распада. Расщепляемый фрагмент 2001 (DNH), который первоначально был выбран для использования в активируемых антителах против CTLA-4 по настоящему изобретению, показал дезамидирование остатка аспарагина (N) (6,4%) после 7 дней в PBS при 4°C. Исследования стабильности методом ускоренного старения показали увеличение дезамидирования с 18,5 до 32,8% при хранении при 25°C в течение 4 недель и до 36,5 и 66,6% при хранении при 40°C в течение одной недели и четырех недель соответственно.

Расщепляемые фрагменты 2008, 2011 и 2012 были выбраны для того, чтобы попытаться преодолеть проблему дезамидирования с 2001 в этих активируемых антителах CTLA-4. Все они имели 0,1% или менее дезамидирования при хранении при 40°C в течение одной недели в PBS, по сравнению с 6,4% дезамидирования в 2001. Однако дальнейший анализ стабильности (также с помощью LC-MS) показал, что хотя эти активируемые антитела против CTLA-4, содержащие расщепляемый фрагмент 2008 (DQH), демонстрировали минимальное дезамидирование, он показал значительную изомеризацию аспартата в остатке аспартата при различных условиях (см. табл. 12). Напротив, 2011 (DNP) показал минимальную изомеризацию аспартата. Изомеризация аспартата не была актуальна для 2012 (ANP), в котором остаток аспартата заменен аланином.

Таблица 12

Значения изомеризации				
Температура	Время	Расщепляемый Фрагмент – Значения Изомеризации		
		2011 (DNP)	2012 (ANP)	2008 (DQH)
-80°C	0 дней (T ₀)	0,1%	N/A	1,8%
4°C	0 дней (T ₀)	0,1%	N/A	2,4%
25°C	3 месяца	0,2%	N/A	8,2%
40°C	3 месяца	0,2%	N/A	34,5%

Тем не менее исследования стабильности *in vitro* на сыворотке мышей, крыс и яванских макак показали существенное расщепление между остатками аспарагина и пролина в 2012 (ANP) (см. табл. 13) в этих активируемых антителах против CTLA-4. 2011 (DNP) оставался расщепляемым фрагментом с приемлемо низкими уровнями дезамидирования, изомеризации аспартата и усечения легкой цепи.

Таблица 13

Степень усечения между остатками аспарагина и пролина		
Сыворотка	Расщепляемый Фрагмент – Усечение Между Остатками Аспарагина и Пролина	
	2011 (DNP)	2012 (ANP)
Мышь	-	++
Макак	+/-	+++

Все публикации, патенты, патентные заявки, интернет-сайты и номера доступа/базы последовательностей (включая как полинуклеотидные, так и полипептидные последовательности), процитированные в настоящем документе, настоящим включаются посредством ссылки в полном объеме для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, патентная заявка, интернет-сайт или номер доступа/базы последовательностей были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- Активируемое антитело против CTLA-4 человека, содержащее
 - тяжелую цепь, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий CDRH1: SYTMH (SEQ ID NO: 557); CDRH2: FISYDGNNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 558); и CDRH3: TGWLGPFYD (SEQ ID NO: 559); и
 - легкую цепь, содержащую
 - вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий CDRL1: RASQSVGSSYLA (SEQ ID NO: 560); CDRL2: GAFSRAT (SEQ ID NO: 561); и CDRL3: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 562);
 - расщепляемый фрагмент (CM); и

(с) маскирующий фрагмент (ММ), в котором ММ выбран из группы, состоящей из YV01 (SEQ ID NO: 1), YV02 (SEQ ID NO: 2), YV03 (SEQ ID NO: 3), YV04 (SEQ ID NO: 4), YV09 (SEQ ID NO: 9), YV23 (SEQ ID NO: 23), YV24 (SEQ ID NO: 24), YV35 (SEQ ID NO: 35), YV39 (SEQ ID NO: 39), YV51 (SEQ ID NO: 51), YV61 (SEQ ID NO: 60), YV62 (SEQ ID NO: 61), YV63 (SEQ ID NO: 62), YV64 (SEQ ID NO: 63), YV65 (SEQ ID NO: 64) и YV66 (SEQ ID NO: 65),

где легкая цепь имеет структурное расположение от N-конца до С-конца следующим образом: MM-CM-VL.

2. Активируемое антитело против CTLA-4 человека по п.1, в котором CM представляет собой субстрат для протеазы, выбранный из группы, состоящей из MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP11, MMP13, MMP14, MMP17, лугумаина, матриптазы и uPA.

3. Активируемое антитело против CTLA-4 человека по п.2, в котором CM выбран из группы, состоящей из 2001 (SEQ ID NO: 297), 2003 (SEQ ID NO: 298), 2005 (SEQ ID NO: 299), 2006 (SEQ ID NO: 300), 2007 (SEQ ID NO: 301), 2008 (SEQ ID NO: 302), 2009 (SEQ ID NO: 303), 2011 (SEQ ID NO: 304), 2012 (SEQ ID NO: 305), 3001 (SEQ ID NO: 306), 3006 (SEQ ID NO: 307), 3007 (SEQ ID NO: 308), 3008 (SEQ ID NO: 309), 3009 (SEQ ID NO: 310), 3011 (SEQ ID NO: 311) и 3012 (SEQ ID NO: 312).

4. Активируемое антитело против CTLA-4 человека по п.3, в котором ММ представляет собой YV04 (SEQ ID NO: 4), YV23 (SEQ ID NO: 23), YV24 (SEQ ID NO: 24), YV39 (SEQ ID NO: 39), YV61 (SEQ ID NO: 60), YV62 (SEQ ID NO: 61), YV63 (SEQ ID NO: 62) или YV64 (SEQ ID NO: 63).

5. Активируемое антитело против CTLA-4 человека по п.4, в котором ММ представляет собой YV39 (SEQ ID NO: 39).

6. Активируемое антитело против CTLA-4 человека по п.5, в котором CM представляет собой 2001 (SEQ ID NO: 297), 2011 (SEQ ID NO: 304) или 2012 (SEQ ID NO: 305).

7. Активируемое антитело против CTLA-4 человека по п.6, в котором CM представляет собой 2011 (SEQ ID NO: 304).

8. Активируемое антитело против CTLA-4 человека по п.1, содержащее

(i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 345; и

(ii) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 563, 564 и 565.

9. Активируемое антитело против CTLA-4 человека по п.8, содержащее

(i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 345; и

(ii) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 564.

10. Активируемое антитело против CTLA-4 человека по п.9, в котором

(i) тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 350 константного домена IgG1 человека; и

(ii) легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 346 константного каппа домена легкой цепи человека.

11. Активируемое антитело против CTLA-4 человека по п.1, дополнительно содержащее первый линкерный пептид (LP1) между ММ и CM или между CM и VL.

12. Активируемое антитело против CTLA-4 человека по п.11, дополнительно содержащее второй линкерный пептид (LP2), где активируемое антитело против CTLA-4 человека имеет структурное расположение от N-конца к С-концу MM-LP1-CM-LP2-VL или MM-LP2-CM-LP1-VL.

13. Активируемое антитело против CTLA-4 человека по п.12, в котором LP1 и LP2 не идентичны друг другу.

14. Активируемое антитело против CTLA-4 человека по любому одному из пп.1-13, дополнительно содержащее спейсер и имеющее структурное расположение от N-конца к С-концу, спейсер-MM-CM-VL.

15. Активируемое антитело против CTLA-4 человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 353; и

легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 448.

16. Активируемое антитело против CTLA-4 человека, конъюгированное с токсическим агентом, причем активируемое антитело против CTLA-4 человека содержит

(i) тяжелую цепь, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий

CDRH1: SYTMH (SEQ ID NO: 557);

CDRH2: FISYDGNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 558); и

CDRH3: TGWLGPFDDY (SEQ ID NO: 559); и

(ii) легкую цепь, содержащую

(a) вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий

CDRL1: RASQSVGSSYLA (SEQ ID NO: 560);

CDRL2: GAFSRAT (SEQ ID NO: 561); и

CDRL3: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 562);

(b) расщепляемый фрагмент (CM); и

(с) маскирующий фрагмент (ММ), в котором ММ выбран из группы, состоящей из YV01

(SEQ ID NO: 1), YV02 (SEQ ID NO: 2), YV03 (SEQ ID NO: 3), YV04 (SEQ ID NO: 4), YV09 (SEQ ID NO: 9), YV23 (SEQ ID NO: 23), YV24 (SEQ ID NO: 24), YV35 (SEQ ID NO: 35), YV39 (SEQ ID NO: 39), YV51 (SEQ ID NO: 51), YV61 (SEQ ID NO: 60), YV62 (SEQ ID NO: 61), YV63 (SEQ ID NO: 62), YV64 (SEQ ID NO: 63), YV65 (SEQ ID NO: 64) и YV66 (SEQ ID NO: 65),

где легкая цепь имеет структурное расположение от N-конца до C-конца следующим образом: MM-CM-VL.

17. Активируемое антитело против CTLA-4 человека по п.16, в котором токсический агент конъюгирован с активируемым антителом через расщепляемый линкер.

18. Активируемое антитело против CTLA-4 человека по любому одному из пп.1-17, дополнительно содержащее детектируемый фрагмент.

19. Активируемое антитело против CTLA-4 человека по п.18, в котором детектируемый фрагмент представляет собой диагностический агент.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая активируемое антитело против CTLA-4 человека по любому одному из пп.1-19 и носитель.

21. Фармацевтическая композиция по п.20, содержащая дополнительный терапевтический агент.

22. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь и легкую цепь активируемого антитела против CTLA-4 человека по любому одному из пп.1-15.

23. Вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п.22.

24. Способ получения активируемого антитела против CTLA-4 человека, включающий

(i) культивирование клетки, содержащей (a) вектор по п.23 или (b) вектор, содержащий изолированную нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь активированного антитела против CTLA-4 по любому одному из пп.1-15, и отдельный вектор, содержащий изолированную нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь активированного антитела против CTLA-4 по любому одному из пп.1-15, в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела; и

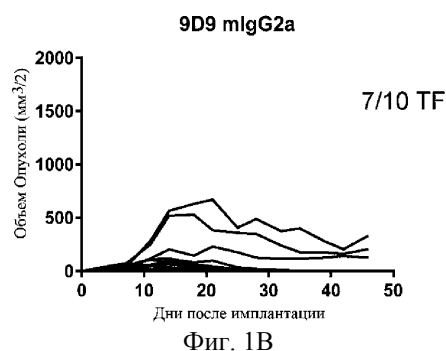
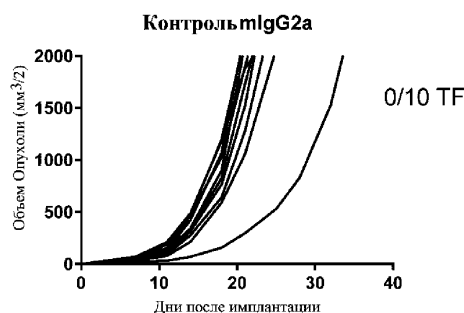
(ii) выделение активируемого антитела.

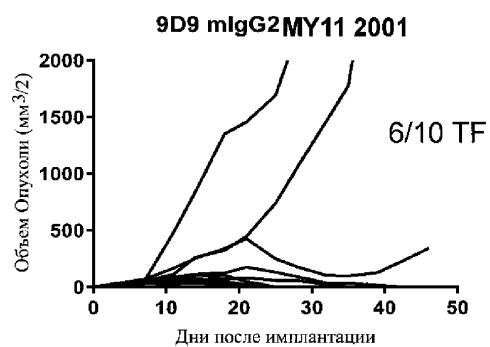
25. Способ снижения активности CTLA-4 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по п.20 или 21.

26. Способ лечения, ослабления симптома или задержки прогрессирования солидной опухоли у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.20 или 21.

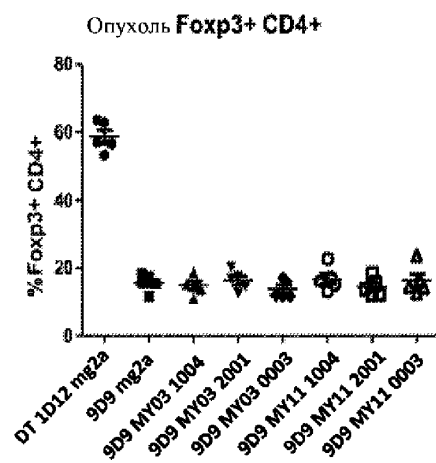
27. Способ по п.26, в котором солидная опухоль представляет собой рак мочевого пузыря, рак кости, рак молочной железы, карцином, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак эндометрия, глиому, рак головы и шеи, рак печени, рак легкого, лимфому, меланому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, саркому, рак кожи, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак мочеполовой системы или рак уротелия.

28. Способ по п.27, в котором солидная опухоль представляет собой меланому.

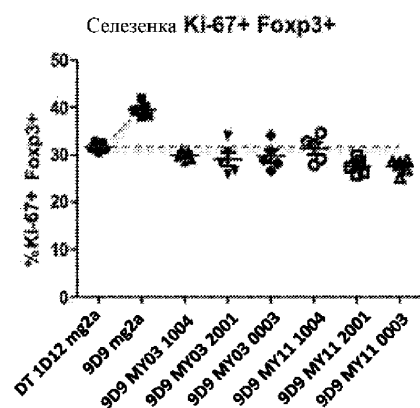




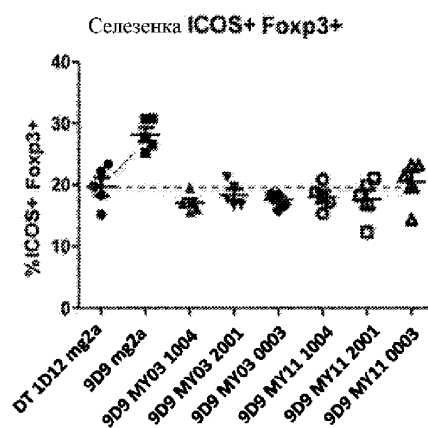
Фиг. 1С



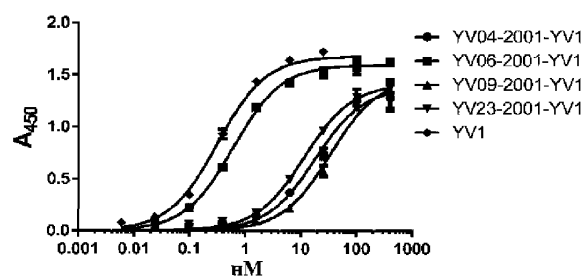
Фиг. 2А



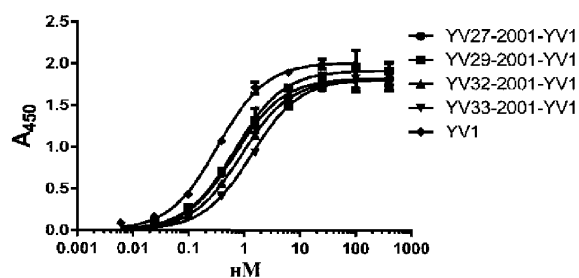
Фиг. 2В



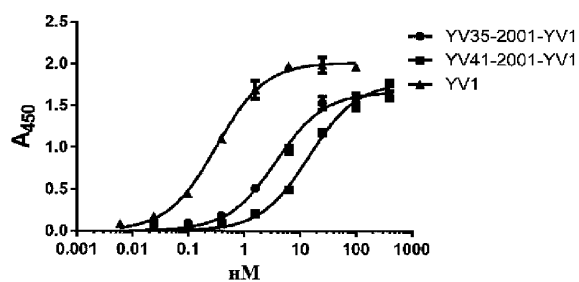
Фиг. 2С



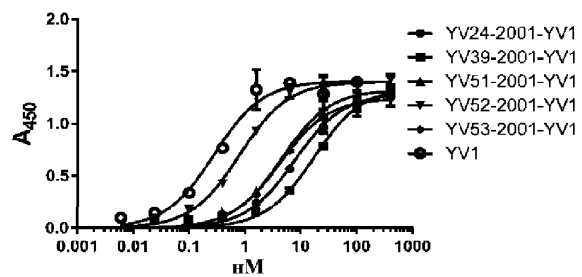
Фиг. 3А



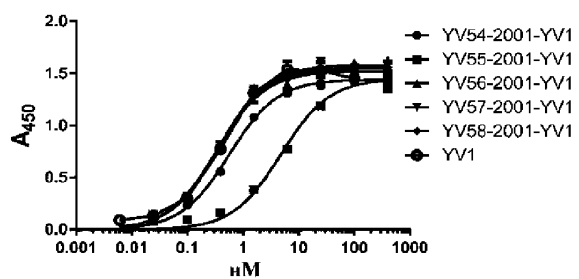
Фиг. 3В



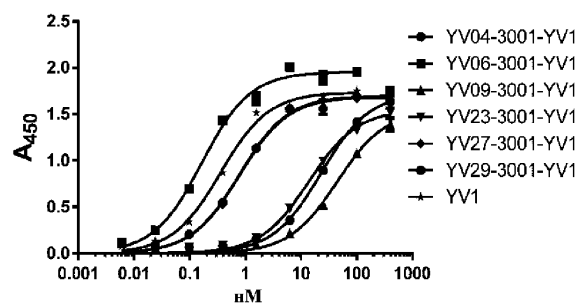
Фиг. 3С



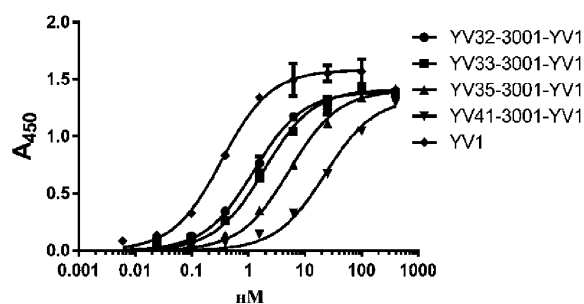
Фиг. 3D



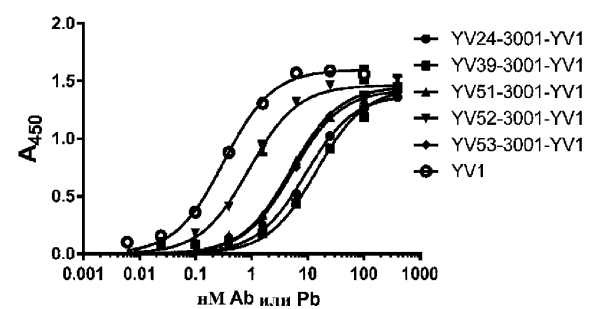
Фиг. 3Е



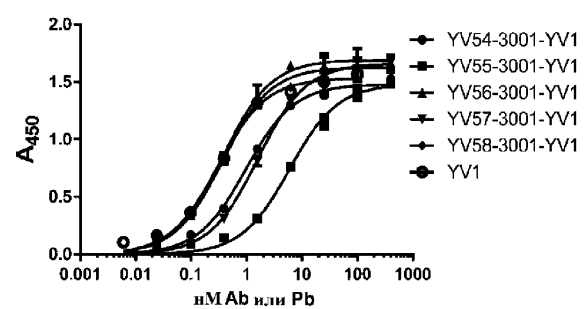
Фиг. 4А



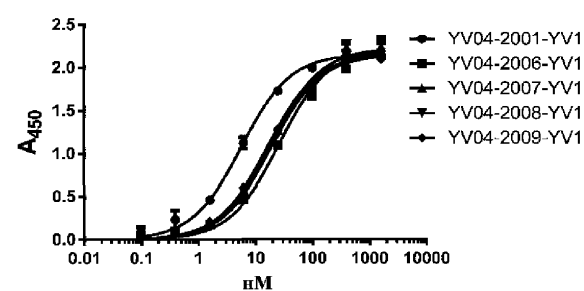
Фиг. 4В



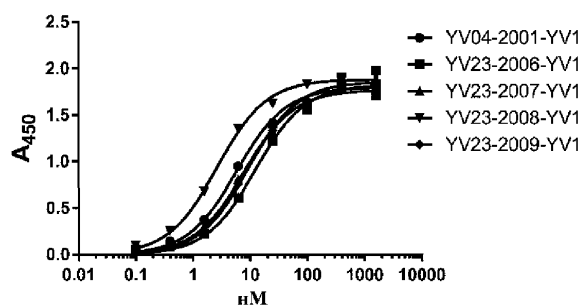
Фиг. 4С



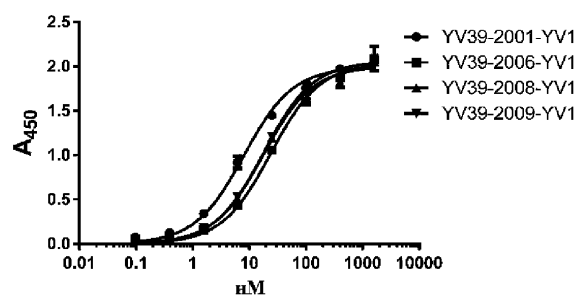
Фиг. 4D



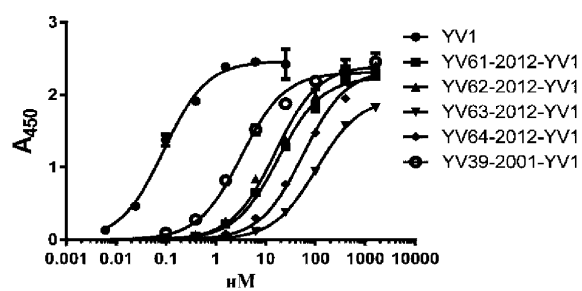
Фиг. 5А



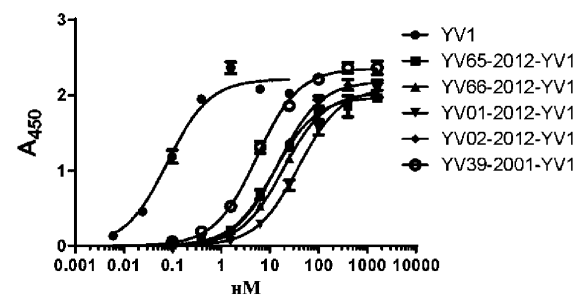
Фиг. 5В



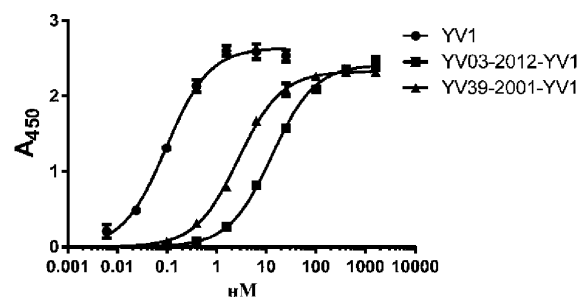
Фиг. 5С



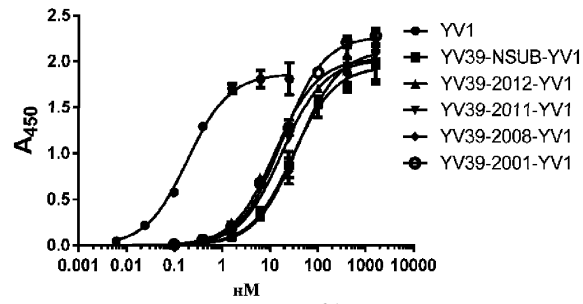
Фиг. 5D



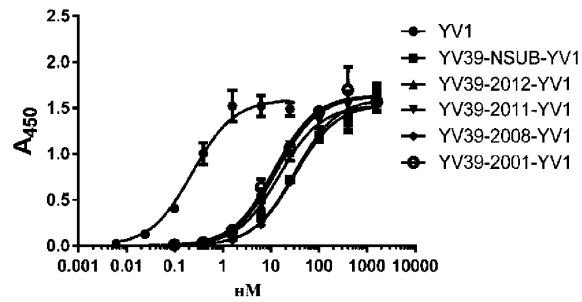
Фиг. 5Е



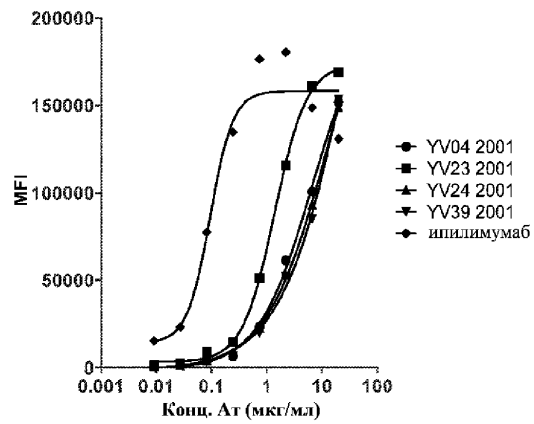
Фиг. 5F



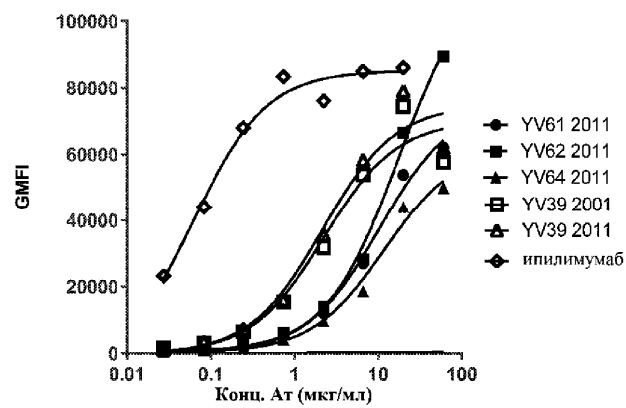
Фиг. 6А



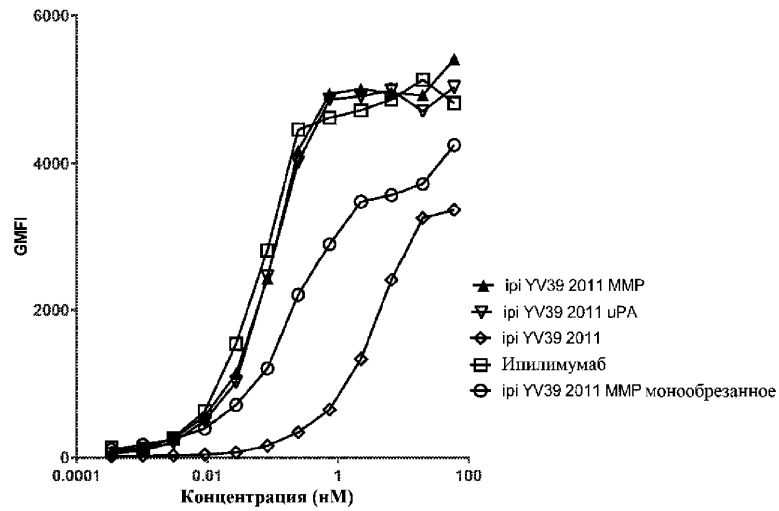
Фиг. 6В



Фиг. 7А



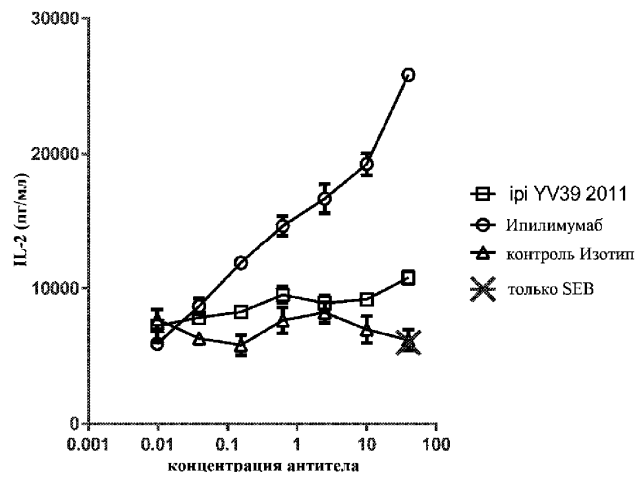
Фиг. 7В



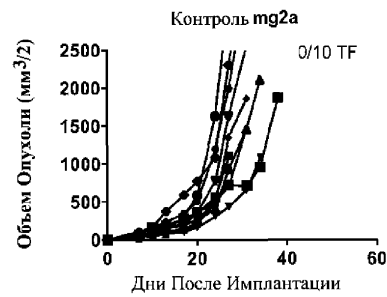
Фиг. 7С

Образец	EC50 (нМ)
ipi YV39 2011	22
Ипилимумаб	0.54
ipi YV39 2011 MMP монообрезанное	2.8
ipi YV39 2011 MMP обрезанное	0.65
ipi YV39 2011 uPA обрезанное	0.76

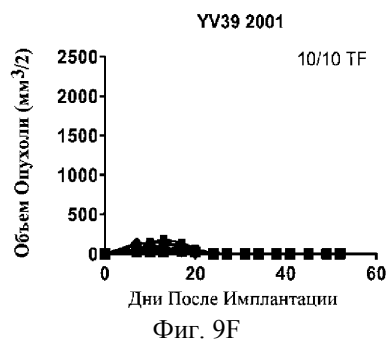
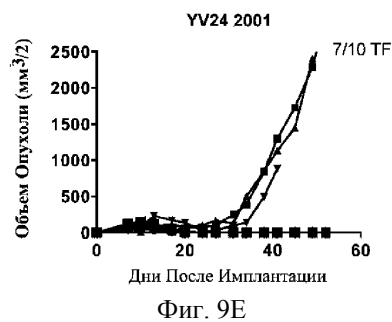
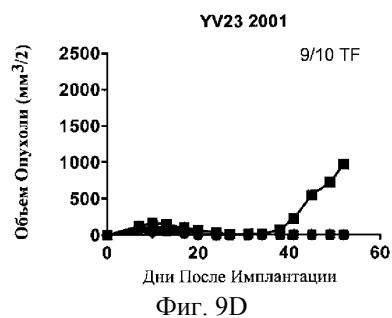
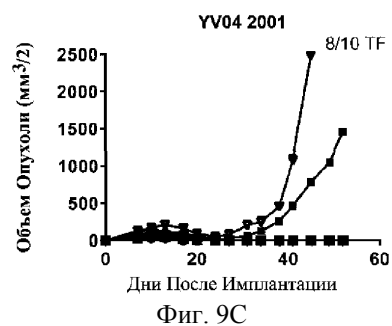
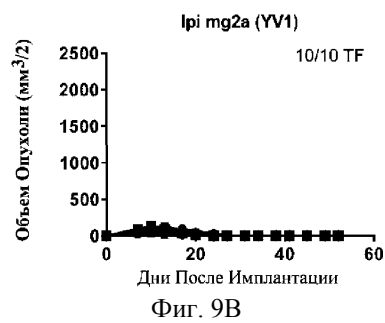
Фиг. 7D

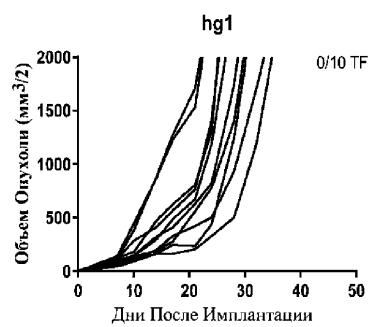


Фиг. 8

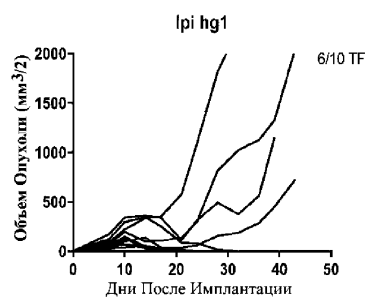


Фиг. 9А

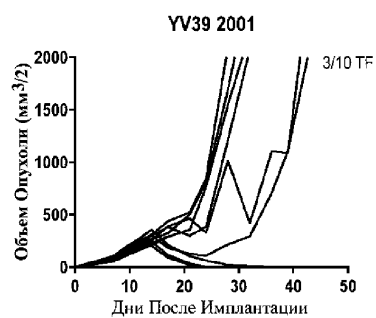




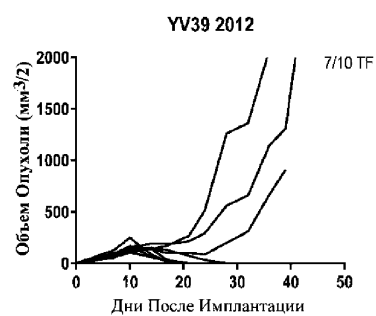
Фиг. 10А



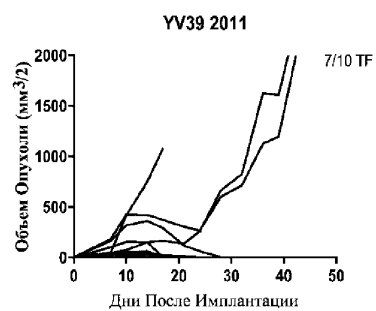
Фиг. 10В



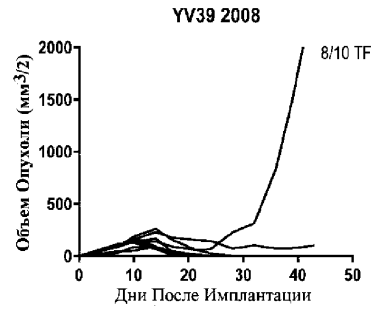
Фиг. 10С



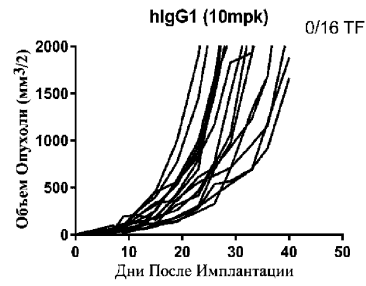
Фиг. 10D



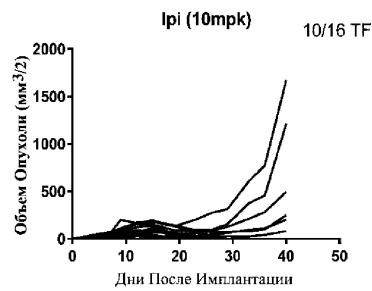
Фиг. 10Е



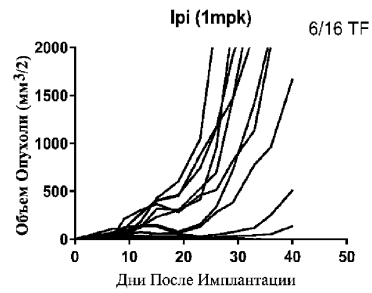
Фиг. 10F



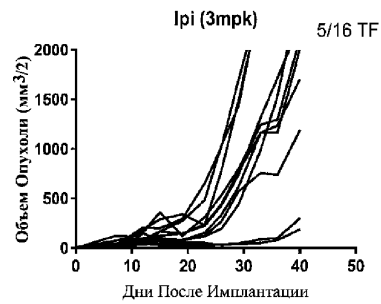
Фиг. 11A



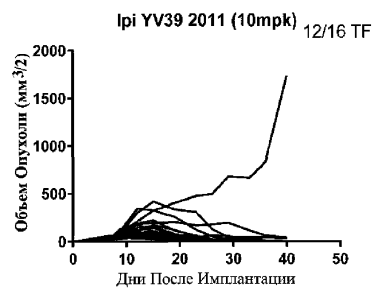
Фиг. 11B



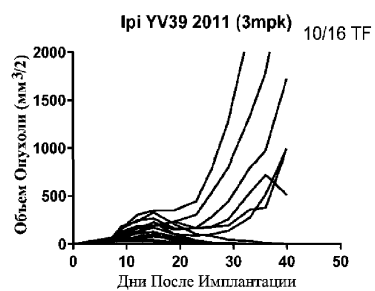
Фиг. 11C



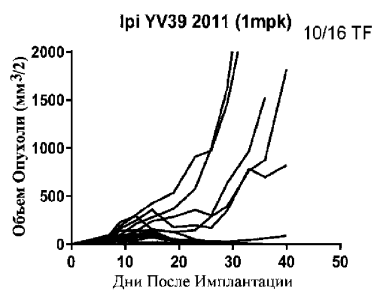
Фиг. 11D



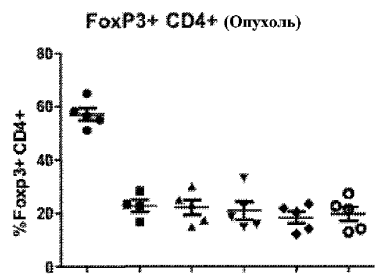
Фиг. 11Е



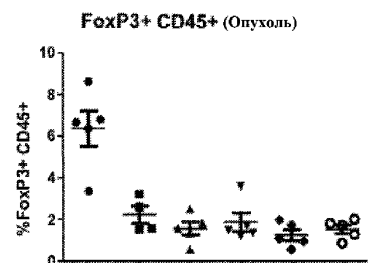
Фиг. 11F



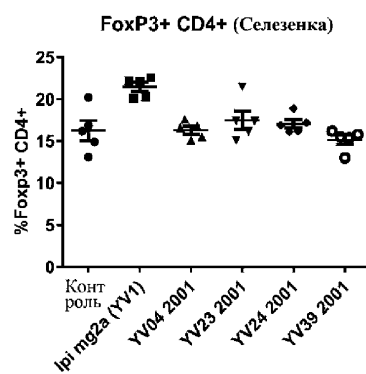
Фиг. 11G



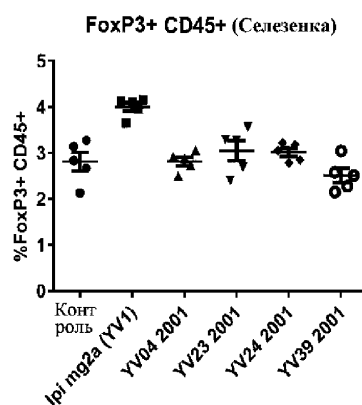
Фиг. 12А



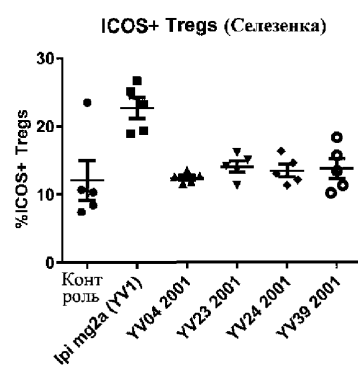
Фиг. 12В



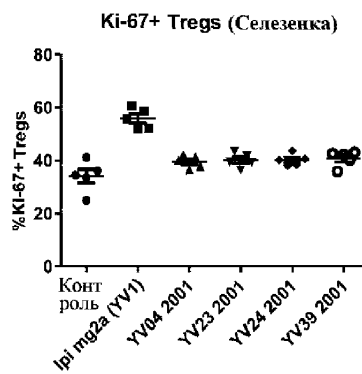
Фиг. 12С



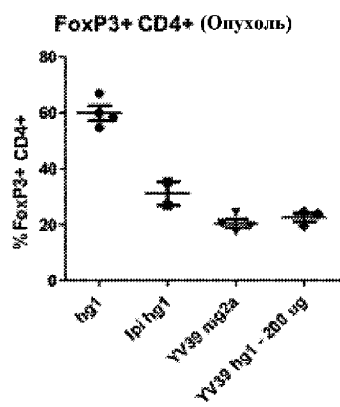
Фиг. 12D



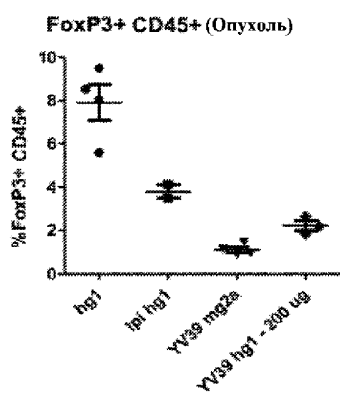
Фиг. 12Е



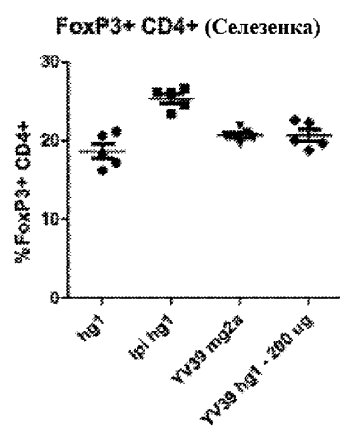
Фиг. 12F



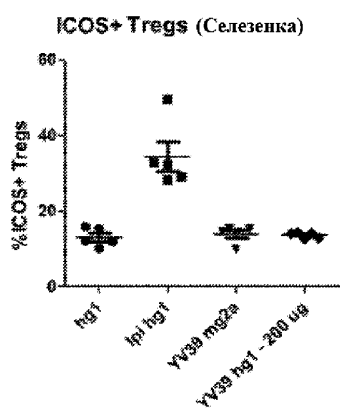
Фиг. 13А



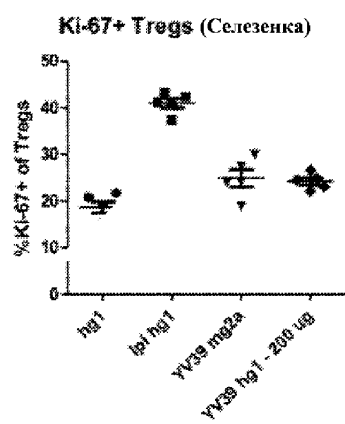
Фиг. 13В



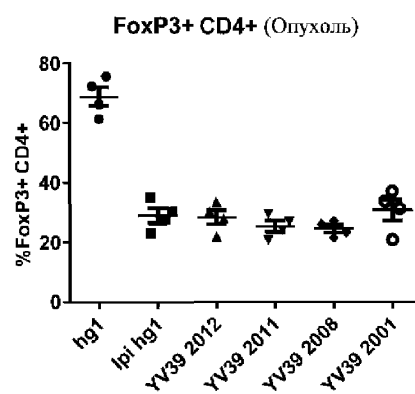
Фиг. 13С



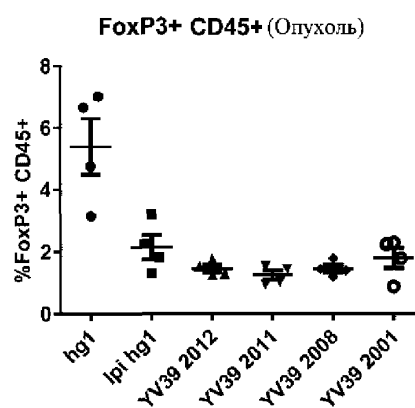
Фиг. 13D



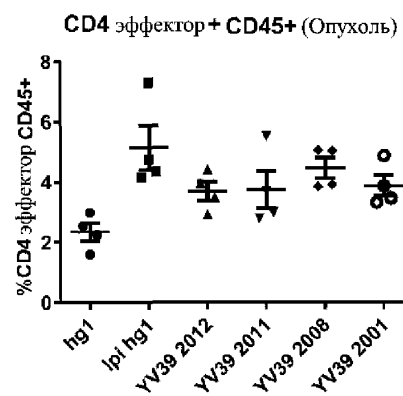
Фиг. 13Е



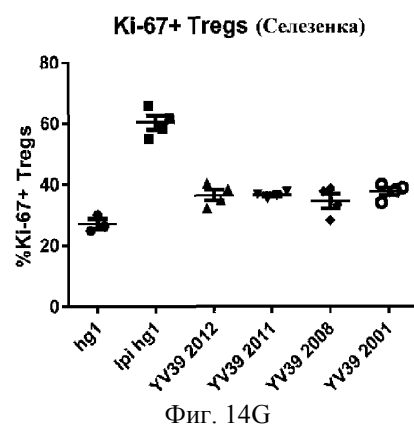
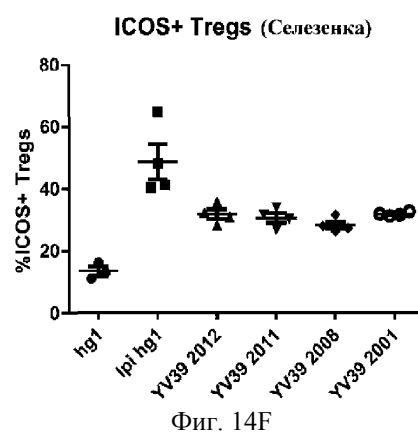
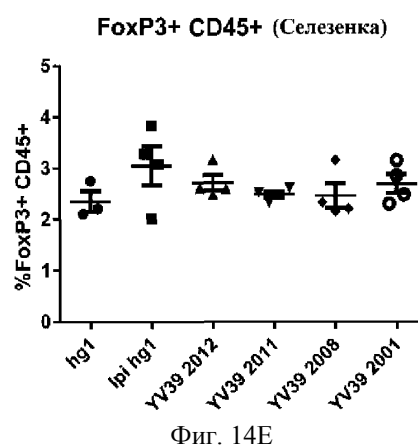
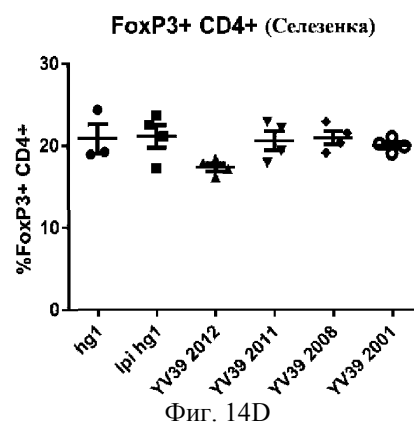
Фиг. 14А



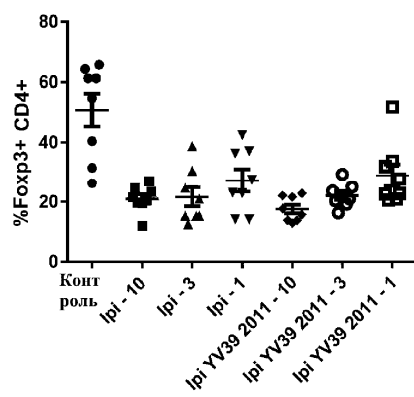
Фиг. 14В



Фиг. 14С

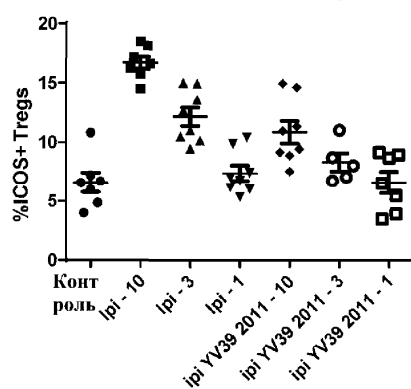


Treg Опухоли



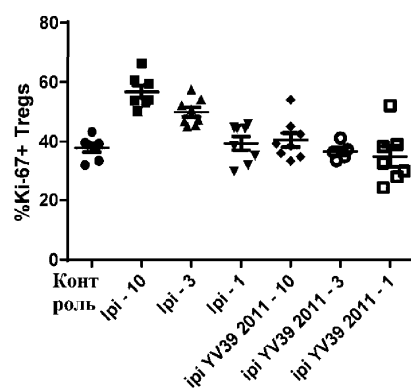
Фиг. 15

Селезенка-ICOS на Tregs

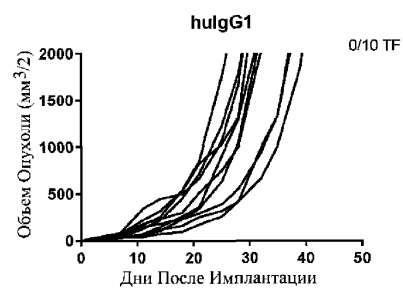


Фиг. 16А

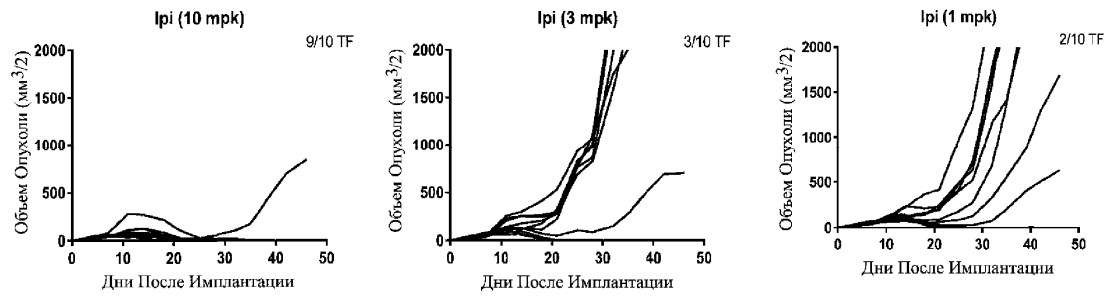
Селезенка-Ki-67 на Tregs



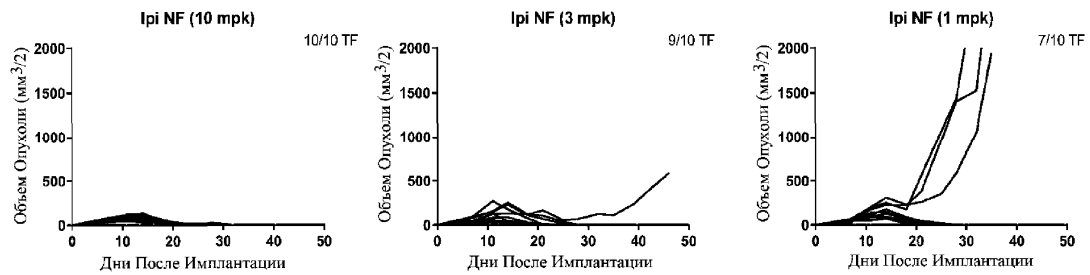
Фиг. 16В



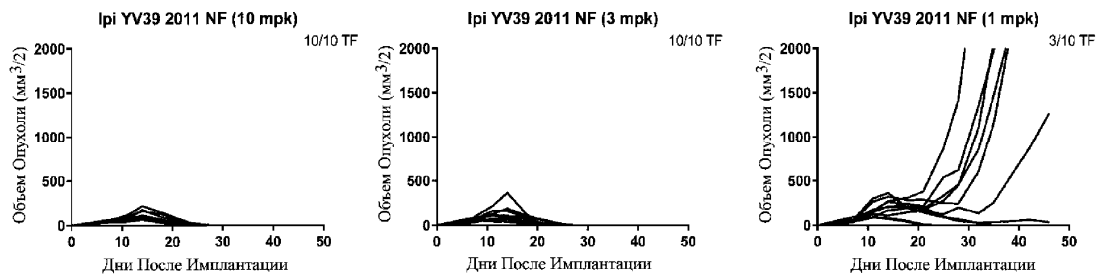
Фиг. 17А



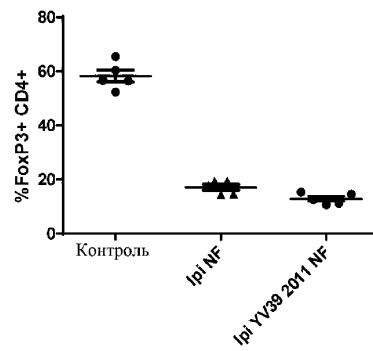
Фиг. 17B



Фиг. 17C



Фиг. 17D

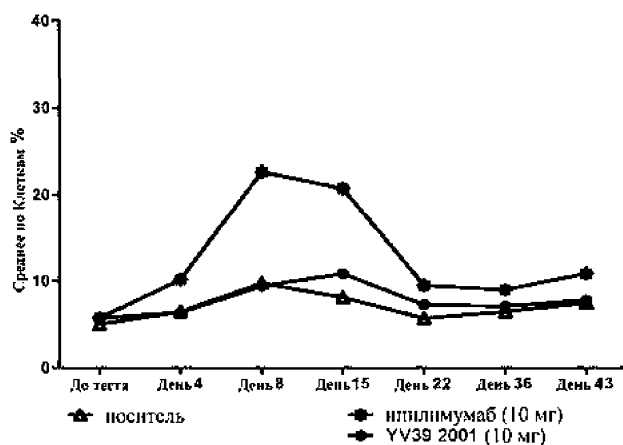


Фиг. 18

	FcR	IgG1	NF
		I _p i (нМ)	I _p i NF (нМ)
FcR человека	hCD64	0.2	0.18
	hCD32a-H131	920	900
	hCD32a-R131	1100	730
	hCD32b	>5000	4200
	hCD16a-V158	310	9.5
	hCD16a-F158	4600	190
	hCD16b-NA1	>5000	1800
	hCD16b-NA2	4200	110
FcR макака	cyCD64	11	5.6
	cyCD32a	2700	2300
	cyCD32b	1900	2000
	cyCD16	370	7.5
FcR мыши	mCD64	62	69
	mCD32	1300	1100
	mCD16	3100	2700
	mFcγRIV	29	6.3

Фиг. 19

Ki67 на CD4+ Т-клеток



Фиг. 20



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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