

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202191785 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.29

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.12.26

(54) АНТИТЕЛА К СТЛА4 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/785,111

(32) 2018.12.26

(33) US

(86) PCT/US2019/068548

(87) WO 2020/139926 2020.07.02

(88) 2020.08.06

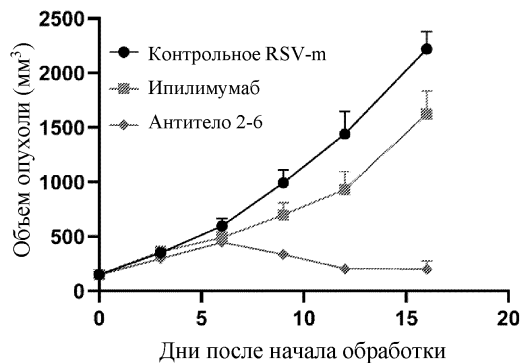
(71) Заявитель:
КСИЛИО ДИВЕЛОПМЕНТ, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Кароу Маргарет (US)

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

(57) В настоящем изобретении предусмотрены связывающие белки к СТЛА4 (например, антитела, биспецифические антитела и химерные рецепторы) и их применение в лечении и предупреждении рака, а также композиции и наборы, содержащие связывающие белки к СТЛА4.

Доза 0,3 мг/кг



A1

202191785

202191785

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-569394EA/032

АНТИТЕЛА К СТЛА4 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Эта заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США 62/785111, поданной 26 декабря 2018 г., содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ВИДЕ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛА ASCII

[2] Содержание нижеследующего представленного текстового файла в формате ASCII включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте: машиночитаемая форма (CRF) перечня последовательностей (название файла: 737762002540.txt, дата создания: 23 декабря 2019 года, размер: 39,5 КБ).

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[3] Настоящее изобретение относится к связывающим белкам к ассоциированному с цитотоксическими Т-лимфоцитами белку 4 (CTLA4) (например, антитела к CTLA4) и способам, связанным с их применением.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[4] Рак является второй по значимости причиной смерти в Соединенных Штатах, на него приходится больше смертей, чем от следующих пяти основных причин (хронические респираторные заболевания, инсульт, несчастные случаи, болезнь Альцгеймера и диабет). Несмотря на то, что были достигнуты большие успехи, особенно в области видов направленной терапии, в этой области еще предстоит проделать большую работу. Иммуноterapia и раздел этой области, иммуноонкология, создают жизнеспособные и впечатляющие терапевтические возможности для лечения злокачественных новообразований. В частности, в настоящее время признано, что одним из отличительных признаков рака является уклонение от иммунного надзора, и значительные усилия позволили выявить мишени и разработать методы лечения, направленные на эти мишени, чтобы реактивировать иммунную систему для распознавания и лечения рака. Фактически, антитело к ассоциированному с цитотоксическими Т-лимфоцитами белку 4 (CTLA4), ипилимумаб, обеспечило долгосрочное выживание пациентов, страдающих злокачественной меланомой III/IV стадии. Ипилимумаб представляет собой антагонист иммунных контрольных точек, который прерывает ингибирование Т-клеток путем блокирования CTLA4 и может привести к истощению регуляторных Т-клеток (Treg). (Korman, A., et al., 2005. Tumor immunotherapy: preclinical and clinical activity of anti-CTLA4 antibodies. *Current Opinion in Investigational Drugs* 6:582-591; Quezada et al., *J. Exp. Med.*, 206(8):1717-1725, 2009; Selby et al. *Cancer Immunol Res.*, 1(1):32-42, 2013. К сожалению, ипилимумаб вызывает генерализованную (не опухолеспецифичную) активацию Т-клеточно-зависимых иммунных ответов, что приводит к иммуноопосредованным побочным эффектам, которые

могут быть опасными для жизни и часто ограничивают дозу и продолжительность лечения (Weber, J.S., et al., 2008. Phase I/II study of ipilimumab for patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 26:5950-5956). К ним относятся энтероколит, дерматит, гипофизит, увеит, гепатит, нефрит и смерть. Энтероколит является наиболее частым серьезным токсическим явлением (поражает приблизительно 20% пациентов). Серьезные риски безопасности, связанные с иммуноопосредованными побочными реакциями, побудили FDA одобрить ипилимумаб с Программой по оценке и снижению риска (REMS). Недавно было показано, что совместное введение ипилимумаба и второго модулятора иммунных контрольных точек, нацеленного на PD1 (например, ниволумаба), значительно повышает эффективность иммунотерапии меланомы по сравнению с ипилимумабом отдельно. Однако это улучшение было ассоциировано с увеличением частоты побочных эффектов 3/4 степени, которые затронули более 50% пациентов, получавших комбинированное лечение (Wolchok, J.D., et al. 2013. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*).

[5] Эти результаты иллюстрируют необходимость разработки терапевтических средств на основе белка к CTLA4, которые эффективно воздействуют на опухоли без побочных эффектов, ассоциированных с определенными антителами к CTLA4, например, ипилимумабом. В данном документе предусмотрены связывающие белки к CTLA, их композиции и способы их применения для удовлетворения этой потребности.

[6] Все цитируемые в данном документе ссылки, включая заявки на патенты, патентные публикации и научную литературу, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, как если бы каждая отдельная ссылка была специально и индивидуально указана для включения посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[7] В данном документе предусмотрены связывающие белки к ассоциированному с цитотоксическими Т-лимфоцитами белку 4 (CTLA4), композиции, содержащие их, и способы их применения.

[8] В данном документе предусмотрены антитела к CTLA4 или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен тяжелой цепи (VH) где: VL-домен содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3; и/или VH-домен содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5 и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; или VL-домен содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15; и/или VH-домен содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID

содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12.

[12] В данном документе предусмотрены антитела к CTLA4 или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен тяжелой цепи (VH), где VL-домен содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21; и/или VH-домен содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

[13] В некоторых из предусмотренных вариантов осуществления VL-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 25, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26; или VL-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 30, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 31.

[14] В некоторых из предусмотренных вариантов осуществления VL-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 25, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26. В некоторых из предусмотренных вариантов осуществления VL-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 30, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 31.

[15] В некоторых из предусмотренных вариантов осуществления VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26; или VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

[16] В данном документе предусмотрены антитела к CTLA4 или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен тяжелой цепи (VH), где VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25 и/или VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26; или VL-домен содержит аминокислотную

последовательность под SEQ ID NO: 30 и/или VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

[17] В некоторых из предусмотренных вариантов осуществления VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25, а VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26. В некоторых из предусмотренных вариантов осуществления VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30, а VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

[18] В некоторых из предусмотренных вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константный домен тяжелой цепи (CH). В некоторых из предусмотренных вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность CH, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35-38. В некоторых из любых предусмотренных вариантов осуществления CH содержит аминокислотные замены S239D или I332E или обе, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом согласно Kabat. В некоторых из предусмотренных вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность CH под SEQ ID NO: 38.

[19] В некоторых из любых вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константный домен легкой цепи (CL). В некоторых из любых вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность CL под SEQ ID NO: 39.

[20] В некоторых из любых вариантов осуществления легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27, а тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29; или легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, а тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

[21] В данном документе предусмотрены антитела к CTLA4 или их антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29.

[22] В данном документе предусмотрены антитела к CTLA4 или их антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

[23] В некоторых из любых вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются афукозилированными или дефицитными по фукозе.

[24] В некоторых из любых вариантов осуществления антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы со средством. В некоторых из любых вариантов осуществления средство является ингибитором полимеризации тубулина,

повреждающим ДНК средством или ингибитором синтеза ДНК. В некоторых из любых вариантов осуществления средство представляет собой майтанзиноид, ауристатин, димер пирролобензодиазепина (PBD), калихеамицин, дуокармицин, димер индолинобензодиазепина или производное экзатекана Dxd.

[25] В данном документе предусмотрены биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь первой пары, которая специфически связывается с CTLA4; легкую цепь и тяжелую цепь второй пары, которая специфически связывается с антигеном; где легкая цепь первой пары содержит VL-домен, а тяжелая цепь первой пары содержит VH-домен, и где VL-домен содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3; и/или VH-домен содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; или VL-домен содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15; и/или VH-домен содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18; или VL-домен содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9; и/или VH-домен содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12; или VL-домен содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21; и/или VH-домен содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

[26] В данном документе предусмотрены биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь первой пары, которая специфически связывается с CTLA4; легкую цепь и тяжелую цепь второй пары, которая специфически связывается с антигеном; где легкая цепь первой пары содержит VL-домен, а тяжелая цепь первой пары содержит VH-домен, и где VL-домен содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, CDR-L2,

содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и/или VH-домен содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6.

[27] В данном документе предусмотрены биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь первой пары, которая специфически связывается с CTLA4; легкую цепь и тяжелую цепь второй пары, которая специфически связывается с антигеном; где легкая цепь первой пары содержит VL-домен, а тяжелая цепь первой пары содержит VH-домен, и где VL-домен содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; и/или VH-домен содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

[28] В данном документе предусмотрены биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь первой пары, которая специфически связывается с CTLA4; легкую цепь и тяжелую цепь второй пары, которая специфически связывается с антигеном; где легкая цепь первой пары содержит VL-домен, а тяжелая цепь первой пары содержит VH-домен, и где VL-домен содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9; и/или VH-домен содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12.

[29] В данном документе предусмотрены биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь первой пары, которая специфически связывается с CTLA4; легкую цепь и тяжелую цепь второй пары, которая специфически связывается с антигеном; где легкая цепь первой пары содержит VL-домен, а тяжелая цепь первой пары содержит VH-домен, и где VL-домен содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; и/или VH-домен содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

[30] В некоторых из любых вариантов осуществления VL-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере

приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 25, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26; или VL-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 30, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 31.

[31] В данном документе предусмотрены биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь первой пары, которая специфически связывается с CTLA4; легкую цепь и тяжелую цепь второй пары, которая специфически связывается с антигеном; где легкая цепь первой пары содержит VL-домен, а тяжелая цепь первой пары содержит VH-домен, и где VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25 и/или VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26; или VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30 и/или VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

[32] В некоторых из любых вариантов осуществления VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26; или VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

[33] В некоторых из любых вариантов осуществления биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константный домен тяжелой цепи (CH). В некоторых из любых вариантов осуществления биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность CH, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35-38. В некоторых из любых вариантов осуществления CH содержит аминокислотные замены S239D или I332E или обе, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом согласно Kabat. В некоторых из любых вариантов осуществления биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность CH под SEQ ID NO: 38.

[34] В некоторых из любых вариантов осуществления биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константный домен легкой цепи (CL). В некоторых из любых вариантов осуществления биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность CL под SEQ ID NO:39.

[35] В некоторых из любых вариантов осуществления легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:27, а тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:29; или легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:32, а тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

[36] В данном документе предусмотрены биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь первой пары, которая специфически связывается с CTLA4; легкую цепь и тяжелую цепь второй пары, которая специфически связывается с антигеном; где первая пара содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29.

[37] В данном документе предусмотрены биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь первой пары, которая специфически связывается с CTLA4; легкую цепь и тяжелую цепь второй пары, которая специфически связывается с антигеном; где первая пара содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

[38] В некоторых из любых вариантов осуществления биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются афукозилированными или дефицитными по фукозе.

[39] В некоторых из любых вариантов осуществления биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы со средством. В некоторых из любых вариантов осуществления средство является ингибитором полимеризации тубулина, повреждающим ДНК средством или ингибитором синтеза ДНК. В некоторых из любых вариантов осуществления средство представляет собой майтанзиноид, ауристин, димер пирролобензодиазепина (PBD), калихеамицин, дуокармицин, димер индолинобензодиазепина или производное экзатекана Dxd.

[40] В данном документе также предусмотрены нуклеиновые кислоты, кодирующие любое из предусмотренных антител к CTLA4 или его антигенсвязывающих фрагментов, или любое из указанных биспецифических антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

[41] Также предусмотрены векторы, содержащие любую из нуклеиновых кислот, предусмотренных в данном документе.

[42] Также предусмотрены клетки-хозяева, содержащие любое из предусмотренных антител к CTLA4 или их антигенсвязывающих фрагментов, любое из предусмотренных биспецифических антител или их антигенсвязывающих фрагментов или любую из нуклеиновых кислот, предусмотренных в данном документе.

[43] В некоторых из любых таких вариантов осуществления клетка-хозяин способна продуцировать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые являются афукозилированными или дефицитными по фукозе. В некоторых из любых таких вариантов осуществления клетка-хозяин имеет нокаут альфа-1,6-фукозилтрансферазы (Fut8). В некоторых из любых таких вариантов осуществления клетка-хозяин избыточно экспрессирует β 1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnT-III). В некоторых из любых таких вариантов осуществления клетка-хозяин избыточно экспрессирует μ -маннозидазу I (ManII) аппарата Гольджи.

[44] Также предусмотрены способы получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые включают культивирование любой из предусмотренных клеток-хозяев в условиях, которые обеспечивают получение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[45] Также предусмотрены способы получения афукозилированного или дефицитного по фукозе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые включают культивирование любой из предусмотренных клеток-хозяев в условиях, которые обеспечивают получение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[46] В некоторых из любых таких вариантов осуществления способы также включают выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, продуцируемых клеткой-хозяином.

[47] Также предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, полученные с помощью любого из способов получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, предусмотренных в данном документе.

[48] Также предусмотрены композиции, содержащие любое из предусмотренных антител к CTLA4 или их антигенсвязывающих фрагментов, любое из предусмотренных биспецифических антител или их антигенсвязывающих фрагментов или любое из предусмотренных антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

[49] Также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие любое из предусмотренных антител к CTLA4 или их антигенсвязывающих фрагментов, любое из предусмотренных биспецифических антител или их антигенсвязывающих фрагментов или любое из предусмотренных антител или их антигенсвязывающих фрагментов и фармацевтически приемлемый носитель.

[50] Также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие любое из предусмотренных антител к CTLA4 или их антигенсвязывающих фрагментов, любое из предусмотренных биспецифических антител или их антигенсвязывающих фрагментов или любое из предусмотренных антител или их антигенсвязывающих фрагментов и фармацевтически приемлемый носитель для применения в лечении и предупреждении неопластического заболевания у субъекта.

[51] Также предусмотрены пути применения фармацевтической композиции, содержащей любое из предусмотренных антител к CTLA4 или их антигенсвязывающих фрагментов, любое из предусмотренных биспецифических антител или их антигенсвязывающих фрагментов, или любого из предусмотренных антител или их антигенсвязывающих фрагментов и фармацевтически приемлемый носитель, в изготовлении лекарственного препарата для лечения или предупреждения неопластического заболевания у субъекта.

[52] Также предусмотрены наборы, содержащие любое из предусмотренных антител к CTLA4 или их антигенсвязывающих фрагментов, любое из предусмотренных биспецифических антител или их антигенсвязывающих фрагментов или любое из предусмотренных антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

[53] Также предусмотрен способ лечения или предупреждения неопластического заболевания у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества любого из предусмотренных антител к CTLA4 или их антигенсвязывающих фрагментов, любого из предусмотренных биспецифических антител или их антигенсвязывающих фрагментов, любого из предусмотренных антител или их антигенсвязывающих фрагментов или любой из предусмотренных композиций.

[54] Следует понимать, что одно, некоторые или все свойства различных вариантов осуществления, описанных в данном документе, можно комбинировать с образованием других вариантов осуществления по настоящему изобретению. Эти и другие аспекты настоящего изобретения станут очевидны специалисту в данной области. Эти и другие варианты осуществления настоящего изобретения дополнительно описаны в нижеследующем подробном описании.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[55] На **фиг. 1А-1В** представлены графики, показывающие связывание антител к CTLA4 с человеческим CTLA4-Fc в диапазоне концентраций антител. На **фиг. 1А** показано связывание форм антитела 1 (антитело 1-1 и антитело 1-2) с человеческим CTLA4-Fc в диапазоне концентраций антител, при которых было продемонстрировано аналогичное связывание у показанных антител. На **фиг. 1В** показано связывание форм антитела 2 (антитело 2-1, антитело 2-2, антитело 2-3, антитело 2-4 и антитело 2-5) с человеческим CTLA4-Fc в диапазоне концентраций антител, при которых было продемонстрировано аналогичное связывание у показанных антител. На **фиг. 1С-1Е** показано связывание человеческого CTLA-Fc и гуманизированных антител к CTLA4 и вариантов (например, содержащих мутации в Fc-области или афукозилированные версии) антитела 1 (**фиг. 1С**), антитела 2 (**фиг. 1D**) или ипилимумаба (**фиг. 1Е**), по оценкам посредством ELISA. Как показано, варианты каждого антитела связывались с человеческим CTLA4-Fc сходным образом.

[56] На **фиг. 2А** показаны результаты анализа SPR, демонстрирующие связывание между антителом 2-6 (версия антитела 2, имеющая мутацию S239D, мутацию I332E в Fc-области) или ипилимумабом и человеческим CTLA4 (huCTLA4) при 32 нМ, 16 нМ, 8 нМ, 4 нМ и 2 нМ. На **фиг. 2В** представлена константа скорости ассоциации (k_a), константа скорости диссоциации (k_d) и константа равновесной диссоциации (K_D), а также кратность различия между антителом 2-6 и ипилимумабом для результатов, показанных на **фиг. 2А**. На **фиг. 2С** показаны результаты анализа SPR, демонстрирующие связывание между Fab ипилимумаба (ипилимумаб-Fab) или Fab антитела 2 (антитело 2-Fab) и rhCTLA4-Fc при 32 нМ, 16 нМ, 8 нМ, 4 нМ и 2 нМ. На **фиг. 2D** показана константа скорости ассоциации (k_a), константа скорости диссоциации (k_d), константа равновесной диссоциации (K_D) и значение Chi^2 для результатов, показанных на **фиг. 2С**. На **фиг. 2Е** показаны результаты анализа SPR, демонстрирующие связывание между Fab ипилимумаба (ипилимумаб-Fab) или Fab антитела 2 (антитело 2-Fab) и CTLA4-Fc яванского макака при 32 нМ, 16 нМ, 8 нМ, 4 нМ и 2 нМ. На **фиг. 2F** показана константа скорости ассоциации (k_a), константа

скорости диссоциации (kd), константа равновесной диссоциации (K_D) и значение Chi^2 для результатов, показанных на **фиг. 2Е**.

[57] На **фиг. 3** показаны результаты анализа SPR, демонстрирующие связывание между антителом 2-1 (версия антитела 2, имеющая Fc-область дикого типа), антителом 2-6 (версия антитела 2, имеющая мутацию S239D, мутацию I332E в Fc-области) или ипилимумабом и человеческим Fc γ RIIIa (CD16a) в различных концентрациях.

[58] На **фиг. 4А-4D** показаны графики, изображающие уровни IL-2 (пг/мл) (**фиг. 4А и 4С**) или кратные изменения уровней IL-2 (**фиг. 4В и 4D**), определяемые с помощью анализа на основе стафилококкового энтеротоксина В (SEB), для антитела 1 и антитела 2. Антитело 1 (антитело 1-1 и 1-2) (**фиг. 4А и 4В**) и антитело 2 (антитело 2-1, антитело 2-2, антитело 2-3, антитело 2-4 и антитело 2-5) (**фиг. 4С и 4D**) испытывали на их способность стимулировать выработку IL-2 периферическими мононуклеарными клетками с использованием анализа с SEB. Все протестированные формы антитела 1 и антитела 2 продемонстрировали способность повышать уровни IL-2 по сравнению с контролем без антител (**фиг. 4А и 4С**). На **фиг. 4Е** показаны результаты анализа SEB с различными версиями антитела 1 к CTLA4 [имеющего Fc-область дикого типа (антитело 1-1), имеющего мутацию S239D и мутацию I332E в Fc-области (антитело 1-2) и афукозилированной версией антитела 1 (антитело 1-aFuc)], антитела 2 [имеющего Fc-область дикого типа (антитело 2-1), имеющего мутацию S239D и I332E-мутацию в Fc-области (антитело 2-6), и афукозилированной версией антитела 2 (антитело 2-aFuc)] или ипилимумабом [имеющий Fc дикого типа (ипилимумаб), имеющий мутацию S239D и мутацию I332E в Fc-области (ипилимумаб-т) и афукозилированной версией ипилимумаба (ипилимумаб-aFuc)].

[59] На **фиг. 5А-5D** показаны кривая активации репортера и значения EC_{50} из репортерного биоанализа ADCC γ Fc RIIIa для вариантов антитела 1 (**фиг. 5А**), вариантов антитела 2 (**фиг. 5В**), вариантов ипилимумаба (**фиг. 5С**) и афукозилированных вариантов всех 3 антител (**фиг. 5D**).

[60] На **фиг. 6А-6D** представлены результаты исследований иммунофенотипирования, в которых оценивали долю клеток CD45+, экспрессирующих маркеры, включая следующие: CD3+/ICOS+, Т-клетки CD3+, CD4+/Ki67+, CD3+/Ki67+, CD4+/ICOS+, Т-клетки CD4+, CD8+/ICOS+, Т-клетки CD8+, Treg+/ICOS+, CD8+/Ki67+, Treg, Treg+/Ki67+. Тестируемые антитела: Группа 1: IgG, группа 2: Антитело 2-1; группа 4: ипилимумаб; группа 5: ипилимумаб-aFuc.

[61] На **фиг. 7А-7D** представлены графики, показывающие объем опухоли с течением времени после введения однократной инъекции, составляющей 20 мкг, 7 мкг или 2 мкг, тестируемого антитела, следующим образом: на **фиг. 7А** (среднее по группе) и **фиг. 7В** (отдельные мыши) показаны объемы опухоли (мм^3) с течением времени для мышей, которым вводили антитело 2-6, ипилимумаб или афукозилированную форму ипилимумаба (ипилимумаб-aFuc); на **фиг. 7С** (20 мкг), **фиг. 7D** (7 мкг) и **фиг. 7Е** (2 мкг) показано сравнение объема опухоли (мм^3) с течением времени для каждой дозы

различных антител.

[62] На **фиг. 8А** представлены графики с результатами исследования эффективности на основе процентного содержания клеток CD4+Ki67+ (слева) и клеток CD4+ICOS+ (справа) в периферической крови в 5 день после введения, что представляет уровень активации Т-клеток. На **фиг. 8В** изображены графики, показывающие вес опухоли (слева) и соотношения CD8/Treg (справа) как оценивали в день 7 у мышей, которых обрабатывали с помощью 10 мг/кг (контрольное RSV-m) или 3 мг/кг (ипилимумаб или антитело 2-6). На **фиг. 8С** изображены графики, показывающие регуляторные Т-клетки в микроокружении опухоли (слева) и CD8+ Т-клетки в микроокружении опухоли (справа) после введения контрольного RSV-m, ипилимумаба или антитела 2-6 у мышей. На **фиг. 8D** изображены графики, показывающие объем опухоли (мм³) у мышей с течением времени после введения 0,3 мг/кг антител, включая контрольное RSV-m, ипилимумаб или антитело 2-6.

[63] На **фиг. 9** изображен график, показывающий результаты двух серий экспериментов (эксперимент 1 и эксперимент 2), в которых оценивали фармакодинамические эффекты у яванских макак путем оценки процента клеток Ki67+ от общего количества клеток CD4+ после введения антитела 2-6, ипилимумаба или изотипического контроля.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[64] Терапевтические средства, такие как ингибиторы контрольных точек, демонстрируют беспрецедентные ответы при раке, но их применение ограничено иммунными побочными эффектами (irAE) и другими токсическими реакциями (например, гипопизитом). В данном документе предусмотрены белковые терапевтические средства, которые связывают CTLA4, например, в микроокружении опухоли, для достижения повышенных показателей продолжительного ответа и улучшенных профилей безопасности. Улучшенная аффинность связывания, повышенная функциональная активность, например ADCC, и другие преимущества, описанные в данном документе, предусмотренных CTLA4-связывающих белков, таких как антитела, биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, могут привести к улучшенному ответу на терапию и улучшенным профилям безопасности, например, уменьшению или минимизации нежелательных явлений, которые могут быть ассоциированы с определенными видами иммунотерапии.

Определения.

[65] Перед подробным описанием настоящего изобретения необходимо понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными композициями или биологическими системами, которые, конечно, могут варьировать. Также следует понимать, что применяемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения. Используемые в данном описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают формы множественного числа, если содержание явно не

указывает иное. Таким образом, например, обозначение «антитело» необязательно включает комбинацию двух или более таких антител и т.п.

[66] Используемый в данном документе термин «приблизительно» относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, хорошо известному специалисту в данной области техники. Обозначение «приблизительно» в отношении значения или параметра в данном документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на данное значение или параметр *per se*.

[67] Понятно, что аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в данном документе, включают «содержащие», «состоящие из» и «состоящие по сути из» аспекты и варианты осуществления.

[68] Термин «антитело» включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (включая полноразмерные антитела, которые имеют Fc-область иммуноглобулина), композиции на основе антител с полиэпитопной специфичностью, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, диатела и одноцепочечные молекулы, а также фрагменты антител (например, Fab, F(ab')₂ и Fv). Термин «иммуноглобулин» (Ig) используется в данном документе взаимозаменяемо с «антителом».

[69] Основная 4-цепочечная единица антитела представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Антитело IgM состоит из 5 основных гетеротетрамерных единиц вместе с дополнительным полипептидом, называемым J-цепью, и содержит 10 антигенсвязывающих участков, в то время как антитела IgA содержат от 2 до 5 основных 4-цепочечных единиц, которые могут полимеризоваться с образованием поливалентных комплексов в комбинации с J-цепью. В случае IgG размер 4-цепочечной единицы обычно составляет приблизительно 150000 дальтон. Каждая L-цепь связана с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, в то время как две H-цепи связаны друг с другом одной или несколькими дисульфидными связями в зависимости от изоформа H-цепи. Каждая H- и L-цепь также имеет регулярно расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая H-цепь имеет на N-конце переменный домен (VH), за которым следуют три константных домена (CH) для каждой из цепей α и γ и четыре домена CH для изоформ μ и ϵ . Каждая L-цепь имеет на N-конце переменный домен (VL), за которым следует константный домен на другом конце. VL выровнен с VH, а CL выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи (CH1). Считается, что определенные аминокислотные остатки образуют поверхность раздела между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи. При спаривании VH и VL друг с другом образуется один антигенсвязывающий участок. О структуре и свойствах различных классов антител см., например, *Basic and Clinical Immunology*, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6.

[70] L-цепь любого вида позвоночных может быть отнесена к одному из двух четко

различающихся типов, называемых каппа и лямбда, на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей (СН) иммуноглобулины можно отнести к разным классам или изотипам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM с тяжелыми цепями, обозначенными α , δ , ϵ , γ и μ соответственно. Классы γ и α дополнительно делятся на подклассы на основе относительно незначительных различий в последовательности и функции СН, например, у людей экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Антитела IgG1 могут существовать во множестве полиморфных вариантов, называемых аллотипами (см. обзор Jefferis and Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Issue 4 1-7), любой из которых подходит для применения в настоящем изобретении. Общие аллотипические варианты в человеческих популяциях обозначаются буквами a, f, n, z.

[71] «Выделенное» антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано, отделено и/или извлечено из компонента среды, в которой происходит продуцирование (например, естественным или рекомбинантным путем). В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид не связан со всеми другими компонентами из среды, в которой происходит продуцирование. Загрязняющими компонентами из среды, в которой происходит продуцирование, например, полученными из рекомбинантных трансфицированных клеток, являются материалы, которые обычно мешают исследованию, диагностическому или терапевтическому применению антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В некоторых вариантах осуществления полипептид очищен (1) до более чем 95 мас.% антитела, как определено, например, по способу Лоури, а в некоторых вариантах осуществления до более чем 99 мас.%; (1) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности согласно SDS-PAGE при невозстанавливающих или восстанавливающих условиях с использованием окрашивания кумасси синим или серебром. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент природного окружения антитела не будет присутствовать. Обычно, однако, выделенный полипептид или антитело получают с помощью по меньшей мере одной стадии очистки.

[72] Термин «моноклональное антитело», используемый в данном документе, относится к антителу, полученному из популяции практически гомогенных антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в незначительных количествах. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела имеют расщепление на С-конце тяжелой цепи и/или легкой цепи. Например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков отщепляются на С-конце тяжелой цепи и/или легкой цепи. В

некоторых вариантах осуществления С-концевое расщепление удаляет С-концевой лизин из тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела имеют N-концевое расщепление в тяжелой цепи и/или легкой цепи. Например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков отщепляются на N-конце тяжелой цепи и/или легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления усеченные формы моноклональных антител могут быть получены рекомбинантными методиками. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела являются высокоспецифичными, направленными в отношении одного антигенного участка. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела являются высокоспецифичными, направленными в отношении нескольких антигенных участков (такими как биспецифическое антитело или полиспецифическое антитело). Модификатор «моноклональное» указывает на характер антитела, которое получают из практически гомогенной популяции антител, и его нельзя истолковывать как требующий выработки антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, которые будут использоваться в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены различными методиками, включая, например, способ гибридомы, способы рекомбинантной ДНК, технологии фагового дисплея и технологии для получения человеческого или антитела, подобные человеческим антителам, у животных, которые имеют части или все локусы иммуноглобулина человека или гены, кодирующие последовательности иммуноглобулина человека.

[73] Термин «голое антитело» относится к антителу, которое не конъюгировано с цитотоксическим фрагментом или радиоактивной меткой.

[74] Термин «родительское антитело» относится к антителу до модификации.

[75] Термин «конъюгат антитела и лекарственного средства» или «ADC» относится к антителу, конъюгированному с одной или несколькими гетерологичными молекулами, включая без ограничения цитотоксическое средство.

[76] Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» или «целое антитело» используются взаимозаменяемо для обозначения антитела в его практически интактной форме, в отличие от фрагмента антитела. В частности, полные антитела включают антитела с тяжелой и легкой цепями, включая Fc-область. Константные домены могут быть константными доменами нативной последовательности (например, константными доменами нативной последовательности человека) или их вариантами аминокислотной последовательности. В некоторых случаях интактное антитело может выполнять одну или несколько эффекторных функций.

[77] «Фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, антигенсвязывающую и/или переменную область интактного антитела. Примеры антигенсвязывающих фрагментов антител включают доменные антитела (dAb), фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела (см. патент США № 5641870, пример 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); одноцепочечные молекулы антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Антитела с одной тяжелой цепью или антитела с одной легкой цепью можно сконструировать или, в случае тяжелой цепи, можно выделить из верблюдовых, акул, библиотек или мышей, сконструированных для получения молекул с одной тяжелой цепью.

[78] Расщепление антител папаином дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых «Fab»-фрагментами, и остаточный «Fc»-фрагмент, обозначение, отражающее способность легко кристаллизоваться. Fab-фрагмент состоит из полной L-цепи вместе с доменом вариабельной области H-цепи (VH) и первым константным доменом одной тяжелой цепи (CH1). Каждый Fab-фрагмент является моновалентным в том, что касается связывания антигена, т. е. он имеет один антигенсвязывающий участок. Обработка антитела пепсином дает один большой фрагмент F(ab')₂, который приблизительно соответствует двум дисульфидно связанным Fab-фрагментам, имеющим разную антигенсвязывающую активность и все еще способным к перекрестному связыванию антигена. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов наличием нескольких дополнительных остатков на карбокси-конце домена CH1, включая один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH представляет собой обозначение в данном документе для Fab', в котором остаток (остатки) цистеина константных доменов несет (несут) свободную тиольную группу. Фрагменты антитела F(ab')₂ первоначально получали как пары Fab'-фрагментов, между которыми расположены цистеины шарнира. Также известны другие химические соединения фрагментов антител.

[79] Fc-фрагмент включает карбокси-концевые части обеих H-цепей, удерживаемые вместе дисульфидами. Эффекторные функции антител определяются последовательностями и гликаном в Fc-области, области, которая также распознается Fc-рецепторами (FcR), обнаруженными на определенных типах клеток.

[80] Fv представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный участок распознавания и связывающий участок. Этот фрагмент состоит из димера домена вариабельной области одной тяжелой и одной легкой цепи в тесной нековалентной связи. В результате фолдинга этих двух доменов образуются шесть гипервариабельных петель (по 3 петли каждой из цепей H и L), которые вносят аминокислотные остатки для связывания антигена и придают антителу специфичность связывания антигена. Однако даже один вариабельный домен (или половина Fv, содержащая только три HVR, специфичных для антигена) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем полный сайт связывания.

[81] «Одноцепочечный Fv», также сокращенно обозначаемый «sFv» или «scFv», представляет собой фрагменты антител, которые содержат домены VH и VL антитела, соединенные в единую полипептидную цепь. В некоторых вариантах осуществления полипептид sFv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет sFv формировать требуемую структуру для связывания антигена. Для обзора sFv см. Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

[82] «Функциональные фрагменты» антител по настоящему изобретению включают часть интактного антитела, обычно включающую антигенсвязывающую или переменную область интактного антитела, или Fv-область антитела, которая сохраняет или имеет модифицированную способность связывания FcR. Примеры фрагментов антител включают линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[83] Моноклональные антитела в данном документе, в частности, включают «химерные» антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от определенного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи(цепей) идентична(идентичны) или гомологична(гомологичны) соответствующим последовательностям в антителах, полученных от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, если они проявляют требуемую биологическую активность (патент США № 4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Химерные антитела, представляющие интерес в данном документе, включают антитела PRIMATIZED®, в которых антигенсвязывающая область антитела получена из антитела, вырабатываемого, например, при иммунизации макака представляющим интерес антигеном. Используемое в данном документе выражение «гуманизованное антитело» используется в качестве подмножества «химерных антител».

[84] «Гуманизованные» формы не являющихся человеческими (например, мышинных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из отличного от человеческого иммуноглобулина. В одном варианте осуществления гуманизованное антитело представляет собой иммуноглобулин человека (реципиентное антитело), в котором остатки из HVR реципиента заменяют остатками из HVR вида, отличного от человека (донорское антитело), такого как мышь, крыса, кролик или отличный от человека примат, обладающими требуемыми специфичностью, аффинностью и/или активностью. В некоторых случаях остатки FR иммуноглобулина человека заменяют соответствующими остатками, отличными от человеческих. Кроме того, гуманизованные антитела могут содержать остатки, которые не обнаружены ни в реципиентном антителе, ни в донорском антителе. Эти модификации могут быть сделаны для дополнительного улучшения характеристик антитела, таких как аффинность связывания. В целом, гуманизованное антитело будет содержать практически все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или практически все гиперпеременные петли соответствуют петлям из последовательности иммуноглобулина, не являющегося человеческим, и все или практически все FR-области представляют собой области из последовательности иммуноглобулина человека, хотя FR-области могут включать одну или несколько индивидуальных замен остатков FR, которые улучшают характеристики

антитела, такие как аффинность связывания, изомеризация, иммуногенность и т.д. В некоторых вариантах осуществления количество этих аминокислотных замен в FR составляет не более 6 в Н-цепи и не более 3 в L-цепи. Гуманизованное антитело необязательно также будет содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, константной области иммуноглобулина человека. Для получения дополнительной информации см., например, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). См. также, например, Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); и патенты США №№ 6982321 и 7087409. В некоторых вариантах осуществления гуманизованные антитела направлены в отношении одного антигенного участка. В некоторых вариантах осуществления гуманизованные антитела направлены в отношении нескольких антигенных участков. Альтернативный способ гуманизации описан в патенте США № 7981843 и в публикации заявки на патент США № 2006/0134098.

[85] «Вариабельная область» или «вариабельный домен» антитела относятся к аминоконцевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Соответственно, используемые в данном документе термины «вариабельная область» и «вариабельный домен» могут использоваться взаимозаменяемо. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи можно обозначать как «VH» и «VL» соответственно. Эти домены обычно являются наиболее вариабельными частями антитела (по сравнению с другими антителами того же класса) и содержат антигенсвязывающие участки. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи могут быть определены с использованием любого доступного способа или схемы нумерации и могут включать вариабельные домены, как описано, например, в WO 2018/207701, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен тяжелой цепи и/или легкой цепи может не иметь одного или нескольких аминокислотных остатков на карбоксильном конце вариабельного домена (т. е. на карбоксильном конце четвертого каркасного домена), которые в противном случае могут быть включены в описание вариабельного домена на основе определенных схем нумерации. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен тяжелой цепи и/или легкой цепи может включать один или несколько аминокислотных остатков на карбоксильном конце вариабельного домена (т. е. на карбоксильном конце четвертого каркасного домена), которые в противном случае могут быть не включены в описание вариабельного домена на основе определенных схем нумерации.

[86] Термин «гипервариабельная область», «HVR» или «HV» при использовании в данном документе относится к областям вариабельного домена антитела, которые являются гипервариабельными по последовательности и/или образуют структурно определенные петли. Обычно антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). В нативных антителах H3 и L3 демонстрируют наибольшее

разнообразии из шести HVR, и, как полагают, в частности, H3 играет уникальную роль в придании высокой специфичности антителам. См., например, Xu et al. *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson and Wu in *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)). Действительно, встречающиеся в природе антитела верблюдовых, состоящие только из тяжелой цепи, функциональны и стабильны в отсутствие легкой цепи. См., например, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993) и Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

[87] Применяют ряд обозначений HVR, которые охватываются в данном документе. HVR, которые являются областями, определяющими комплементарность (CDR) согласно Kabat, основаны на вариабельности последовательностей и являются наиболее часто используемыми (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). В отличие от этого HVR согласно Chothia относятся к местоположению структурных петель (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.*

196:901-917 (1987)). «Контактные» HVR основаны на анализе доступных кристаллических структур комплекса. Остатки каждой из этих HVR указаны ниже.

	<u>Петля Kabat</u>	<u>Chothia</u>	<u>Контакт</u>
L1	L24-L34	L26-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H32	H30-H35B (нумерация согласно Kabat)
H1	H31-H35	H26-H32	H30-H35 (нумерация согласно Chothia)
H2	H50-H65	H53-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H93-H101

[88] Если не указано иное, остатки вариабельного домена (остатки HVR и остатки каркасной области) пронумерованы согласно Kabat et al. выше.

[89] «Каркасные» остатки или остатки «FR» представляют собой остатки вариабельного домена, отличные от остатков HVR, как определено в данном документе.

[90] Выражение «нумерация остатков вариабельных доменов согласно Kabat» или «нумерация аминокислотных положений согласно Kabat» и их варианты относятся к системе нумерации, используемой для вариабельных доменов тяжелой цепи или вариабельных доменов легкой цепи собраний антител в Kabat et al. выше. При применении этой системы нумерации фактическая линейная аминокислотная последовательность пептида может содержать меньшее количество или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению или вставке в FR или HVR вариабельного домена. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может включать аминокислотные вставки (остаток 52a в соответствии с Kabat) после остатка 52 из H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.д. в соответствии с Kabat) после остатка 82 из FR тяжелой цепи. Нумерацию остатков по Kabat можно определить для данного антитела путем выравнивания по областям гомологии последовательности антитела со

«стандартной» последовательностью, пронумерованной по Kabat.

[91] «Акцепторный каркас человека» для целей данного документа представляет собой каркас, содержащий аминокислотную последовательность каркаса VL или VH, полученную из каркаса иммуноглобулина человека или каркаса консенсусной последовательности человека. Акцепторный каркас человека, «полученный из» каркаса иммуноглобулина человека или каркаса консенсусной последовательности человека, может содержать такую же аминокислотную последовательность, или может содержать ранее существующие изменения аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления количество ранее существовавших аминокислотных замен составляет 10 или меньше, 9 или меньше, 8 или меньше, 7 или меньше, 6 или меньше, 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше или 2 или меньше.

[92] Выражение «процент (%) идентичности аминокислотных последовательностей» относительно эталонной полипептидной последовательности определяется как процентная доля аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в эталонной полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и, при необходимости, введения гэпов для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и не учитывая любые консервативные замены как часть идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, которые входят в компетенцию специалистов в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Например, % идентичности аминокислотной последовательности данной аминокислотной последовательности А относительно, по сравнению с или против данной аминокислотной последовательности В (что альтернативно может быть перефразировано как данная аминокислотная последовательность А, которая характеризуется или содержит определенный % идентичности аминокислотной последовательности относительно, по сравнению с или против данной аминокислотной последовательности В) рассчитывается следующим образом:

$100 \text{ умножить на частное } X/Y,$

где X является количеством аминокислотных остатков, оцененных как идентичные совпадения по последовательности в этой программе при выравнивании А и В, и где Y является общим количеством аминокислотных остатков в В. Следует понимать, что если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, % идентичности аминокислотной последовательности А относительно В не будет равняться % идентичности аминокислотной последовательности

В относительно А.

[93] Антитело, которое «связывается с», «специфически связывается с» или «специфично для» конкретного полипептида или эпитопа на конкретном полипептиде, представляет собой антитело, которое связывается с этим конкретным полипептидом или эпитопом на конкретном полипептиде практически без связывания с любым другим полипептидом или эпитопом полипептида. В некоторых вариантах осуществления связывание CTLA4-связывающего белка, описанного в данном документе (например, антитела к CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента) с неродственным полипептидом, отличным от CTLA4, составляет менее чем приблизительно 10% связывания антитела с CTLA4, как измерено способами, известными в данной области техники (например, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA)). В некоторых вариантах осуществления связывающий белок (например, антитело), который связывается с CTLA4 (например, мышинным CTLA4 и/или человеческим CTLA4), имеет равновесную константу диссоциации (K_D), которая составляет ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 2 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,7$ нМ, $\leq 0,6$ нМ, $\leq 0,5$ нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-8} М или меньше, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М).

[94] Термин «CTLA4» или «белок CTLA4», предусмотренный в данном документе, включает любую из рекомбинантных или встречающихся в природе форм ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами белка 4 (CTLA4) или его вариантов или гомологов, которые сохраняют активность белка CTLA4 (например, в пределах по меньшей мере 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% активности по сравнению с CTLA4). В некоторых аспектах варианты или гомологи на по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны аминокислотной последовательности по всей последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислотных остатков) по сравнению с встречающимся в природе полипептидом CTLA4. В некоторых вариантах осуществления CTLA4 представляет собой белок, идентифицированный ссылкой на последовательность NCBI GI:83700231, его гомолог или функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления CTLA4 представляет собой CTLA4 человека. В некоторых вариантах осуществления CTLA4 представляет собой CTLA4 мыши.

[95] «Эффекторные функции» антитела относятся к тем видам биологической активности, которые присущи Fc-области (Fc-области с нативной последовательностью или Fc-области с вариантами аминокислотной последовательности) антитела и варьируют в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антител включают связывание C1q и комплемент-зависимую цитотоксичность; связывание с Fc-рецептором; антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; подавление рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточных рецепторов) и активацию В-клеток.

[96] «Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или «ADCC» относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig связывается

с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (например, природных киллерах (NK), нейтрофилах и макрофагах), позволяя этим цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с несущими антиген клетками-мишенями и практически уничтожать клетку-мишень цитотоксинами. Антитела «вооружают» цитотоксические клетки и необходимы для уничтожения клетки-мишени с помощью этого механизма. Основные клетки, опосредующие ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия Fc на гемопоэтических клетках приведена в таблице 3 на странице 464 в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к CTLA4, описанный в данном документе (например, антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент), сконструирован или экспрессируется в клетках, которые не обладают способностью фукозилировать Fc-гликан для усиления ADCC. Чтобы оценить активность ADCC представляющей интерес молекулы можно проводить анализ ADCC *in vitro*, такой как описанный в патентах США № 5500362 или 5821337. Применимые эффекторные клетки для таких анализов включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) и природные киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно активность ADCC представляющей интерес молекулы можно оценить *in vivo*, например, на животной модели, такой как модель, раскрытая в Clynes et al., *PNAS USA* 95:652-656 (1998). Другие варианты Fc, которые изменяют активность ADCC и другие свойства антител, включают варианты, раскрытые в Ghetie et al., *Nat Biotech.* 15:637-40, 1997; Duncan et al., *Nature* 332:563-564, 1988; Lund et al., *J. Immunol.* 147:2657-2662, 1991; Lund et al., *Mol. Immunol.* 29:53-59, 1992; Alegre et al., *Transplantation* 57:1537-1543, 1994; Hutchins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11980-11984, 1995; Jefferis et al., *Immunol. Lett.* 44:111-117, 1995; Lund et al., *FASEB J* 9:115-119, 1995; Jefferis et al., *Immunol. Lett.* 54:101-104, 1996; Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-4969, 1996; Armour et al., *Eur. J. Immunol.* 29:2613-2624, 1999; Idusogie et al., *J. Immunol.* 164:4178-4184, 2000; Reddy et al., *J. Immunol.* 164:1925-1933, 2000; Xu et al., *Cell Immunol.* 200:16-26, 2000; Idusogie et al., *J. Immunol.* 166:2571-2575, 2001; Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604, 2001; Jefferis et al., *Immunol. Lett.* 82:57-65, 2002; Presta et al., *Biochem. Soc. Trans.* 30:487-490, 2002; Lazar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4005-4010, 2006; патентах США №№ 5624821; 5885573; 5677425; 6165745; 6277375; 5869046; 6121022; 5624821; 5648260; 6194551; 6737056; 6821505; 6277375; 7335742 и 7317091.

[97] Термин «Fc-область» в данном документе используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая Fc-области с нативной последовательностью и варианты Fc-области. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, Fc-область тяжелой цепи IgG человека обычно определяется как простирающаяся от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до ее карбоксильного конца. Подходящие Fc-области с нативной последовательностью для применения в антителах по настоящему изобретению включают IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека.

[98] Используемый в данном документе термин «аффинность связывания» относится к силе нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). В некоторых вариантах осуществления аффинность связывающего белка (например, антитела) к CTLA4 обычно может быть представлена равновесной константой диссоциации (K_D). Аффинность можно измерить обычными способами, известными в данной области техники, включая способы, описанные в данном документе.

[99] Используемый в данном документе термин «авидность связывания» относится к силе связывания множества сайтов связывания молекулы (например, антитела) и ее партнера по связыванию (например, антигена).

[100] «Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая указанные в данном документе антитела, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена от по меньшей мере одной загрязняющей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в среде, в которой происходит ее продуцирование. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота не связана со всеми компонентами, связанными со средой, в которой происходит продуцирование. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды и антитела, указанные в данном документе, находятся в форме, отличной от той формы или условий, в которых они встречаются в природе. Таким образом, выделенные молекулы нуклеиновой кислоты отличаются от нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды и антитела, указанные в данном документе, естественным образом присутствующие в клетках.

[101] Термин «фармацевтический состав» относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы обеспечивать эффективность биологической активности активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будут вводить состав. Такие составы являются стерильными.

[102] Используемый в данном документе термин «носители» включает фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы, которые нетоксичны для клетки или млекопитающего, подвергающегося их воздействию, в используемых дозировках и концентрациях. Часто физиологически приемлемый носитель представляет собой водный pH-буферный раствор. Примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; полипептид с низкой молекулярной массой (менее чем приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие средства, такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или

неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (PEG) и PLURONICS™.

[103] Используемый в данном документе термин «лечение» относится к клиническому вмешательству, предназначенному для изменения естественного поведения индивидуума или клетки, подвергающейся лечению в ходе клинической патологии. Требуемые эффекты лечения включают снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или ослабление болезненного состояния, ремиссию или улучшение прогноза. Индивидуума успешно «лечат», например, если ослаблены или устранены один или несколько симптомов, связанных с нарушением (например, неопластическим заболеванием). Например, индивидуума успешно «лечат», если лечение приводит к повышению качества жизни тех, кто страдает заболеванием, уменьшению дозы других лекарственных препаратов, необходимых для лечения заболевания, уменьшению частоты рецидивов заболевания, уменьшению тяжести заболевания, задержке развития или прогрессирования заболевания и/или продлению выживаемости индивидуумов.

[104] Используемые в данном документе термины «в сочетании с» или «в комбинации с» относятся к введению одного способа лечения в дополнение к другому способу лечения. Таким образом, «в сочетании с» или «в комбинации с» относится к введению одного способа лечения до введения другого способа лечения индивидууму, во время или после него.

[105] Используемый в данном документе термин «предупреждение» включает обеспечение профилактики возникновения или рецидива заболевания у индивидуума. Индивидуум может быть предрасположен к нарушению, быть восприимчивым к нему или подвергаться риску развития нарушения, но у него еще не было диагностировано данное нарушение. В некоторых вариантах осуществления связывающие белки к CTLA4 (например, антитела к CTLA4), описанные в данном документе, используют для задержки развития нарушения.

[106] Как используется в данном документе, индивидуум, «подверженный риску» развития нарушения, может иметь или не иметь выявляемое заболевание или симптомы заболевания, и может проявлять или не проявлять выявляемое заболевание или симптомы заболевания до применения способов лечения, описанных в данном документе. «Подвергаться риску» означает, что у индивидуума имеется один или несколько факторов риска, которые являются измеряемыми параметрами, коррелирующими с развитием заболевания, как известно в данной области техники. Индивидуум, имеющий один или несколько из этих факторов риска, имеет более высокую вероятность развития нарушения, чем индивидуум без одного или нескольких из этих факторов риска.

[107] «Эффективное количество» относится по меньшей мере к количеству, эффективному в дозировках и в течение периода времени, необходимых для достижения требуемого или указанного эффекта, включая терапевтический или профилактический результат. Эффективное количество можно предоставлять за одно или несколько

введений. «Терапевтически эффективное количество» представляет собой по меньшей мере минимальную концентрацию, необходимую для достижения измеримого улучшения конкретного нарушения. В данном документе терапевтически эффективное количество может варьировать в зависимости от таких факторов, как течение заболевания, возраст, пол и вес пациента, а также способность антитела вызывать требуемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также может быть таким, при котором любые токсические или вредные эффекты антитела перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами. «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, которое при дозировках и в течение необходимых периодов времени эффективно в достижении требуемого профилактического результата. Как правило, но не обязательно, поскольку профилактическая доза используется у субъектов на более ранней стадии заболевания или до него, профилактически эффективное количество может быть меньше терапевтически эффективного количества.

[108] «Хроническое» введение относится к введению лекарственного(лекарственных) препарата(препаратов) в непрерывном, а не в остром режиме, чтобы поддерживать начальный терапевтический эффект (активность) в течение продолжительного периода времени. «Прерывистое» введение представляет собой лечение, которое не проводится последовательно без перерывов, а скорее носит циклический характер.

[109] Используемое в данном документе выражение «индивидуум» или «субъект» означает млекопитающее. «Млекопитающее» для целей лечения включает людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных из зоопарков, спортивных или домашних питомцев, таких как собаки, лошади, кролики, крупный рогатый скот, свиньи, хомяки, песчанки, мыши, хорьки, крысы, кошки и т. д. В некоторых вариантах осуществления индивидуум или субъект является человеком.

Связывающие белки к CTLA4

[110] В данном документе предусмотрены белки, которые связывают ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами белок 4 (CTLA4). В некоторых вариантах осуществления предусмотренный CTLA4-связывающий белок представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или представляет собой белок, который содержит CTLA4-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления CTLA4-связывающий белок представляет собой антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления CTLA4-связывающий белок представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CTLA4. Например, биспецифическое антитело, которое содержит CTLA-связывающий домен. В одном аспекте представлен CTLA4-связывающий белок, содержащий CTLA4-связывающий домен, например, слитый белок, который содержит CTLA4-связывающий домен, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления CTLA4-связывающий белок представляет собой химерный рецептор, который связывается с

CTLA4, например, посредством антигенсвязывающего домена, который может связываться с CTLA4.

[111] Предусмотренные в данном документе CTLA4-связывающие белки могут связываться с CTLA4 различных видов, например, некоторые связываются с CTLA4 человека и/или CTLA4 мыши или CTLA4 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к CTLA4, описанный в данном документе, имеет одну или несколько из следующих характеристик: (1) связывает CTLA4 (например, CTLA4 человека); и (2) связывает CTLA4 *in vivo* в очаге опухоли.

[112] В одном аспекте в данном документе предусмотрены CTLA4-связывающие белки, применимые, среди прочего, для лечения неопластического заболевания, при котором играет роль CTLA4. CTLA4-связывающий белок, как предусмотрено в данном документе, включает связывающий домен, способный взаимодействовать (например, связываться) с белком CTLA4, экспрессируемым на поверхности клетки (например, раковой клетки или Т-клетки).

[113] Также в данном документе в некоторых вариантах осуществления предусмотрен CTLA4-связывающий белок (например, антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент), предусматривающий CTLA4-связывающий белок (например, антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие первую цепь и вторую цепь). В некоторых вариантах осуществления CTLA4-связывающий белок представляет собой димер. В некоторых вариантах осуществления CTLA4-связывающий белок представляет собой гомодимер. В некоторых вариантах осуществления CTLA4-связывающий белок представляет собой гетеродимер. В некоторых вариантах осуществления CTLA4-связывающий белок представляет собой гетеродимер, содержащий первую цепь и вторую цепь, например, гетеродимер, содержащий тяжелую цепь и легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления CTLA4-связывающий белок представляет собой антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий первую цепь и вторую цепь. В некоторых вариантах осуществления первая цепь представляет собой или содержит тяжелую цепь, а вторая цепь представляет собой или содержит легкую цепь; или первая цепь представляет собой или содержит легкую цепь, а вторая цепь представляет собой или содержит тяжелую цепь. В некоторых вариантах осуществления первая цепь представляет собой или содержит переменную область тяжелой цепи, а вторая цепь представляет собой или содержит переменную область легкой цепи; или первая цепь представляет собой или содержит переменную область легкой цепи, а вторая цепь представляет собой или содержит переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления CTLA4-связывающий белок представляет собой одноцепочечный белок, например, одноцепочечный белок, который содержит как тяжелую цепь, так и легкую цепь.

[114] Также предусмотрена нуклеиновая кислота, кодирующая антитела, биспецифические антитела или любые их антигенсвязывающие фрагменты, или химерный рецептор по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления. Также предусмотрен

вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по вышеупомянутым вариантам осуществления. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии. Также предусмотрена клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по вышеупомянутым вариантам осуществления.

[115] Также предусмотрен способ получения антитела, биспецифического антитела или любого его антигенсвязывающего фрагмента или химерного рецептора, предусматривающий культивирование вышеупомянутых клеток-хозяев в условиях, которые обеспечивают получение антитела, биспецифического антитела или химерного рецептора. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин имеет нокаут альфа-1,6-фукозилтрансферазы (Fut8). В некоторых вариантах осуществления, где клетка-хозяин избыточно экспрессирует β 1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnT-III). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин дополнительно избыточно экспрессирует μ -маннозидазу II (ManII) аппарата Гольджи. Некоторые из таких вариантов осуществления дополнительно включают выделение антитела, биспецифического антитела или любых его антигенсвязывающих фрагментов или химерного рецептора, продуцируемых клеткой-хозяином. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело или химерный рецептор получают вышеупомянутыми способами.

[116] Также предусмотрена композиция, содержащая антитело, биспецифическое антитело или любые его антигенсвязывающие фрагменты, или химерный рецептор по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления. Некоторые варианты осуществления охватывают композицию, содержащую антитело, биспецифическое антитело или любые его антигенсвязывающие фрагменты или химерный рецептор по вышеупомянутым вариантам осуществления. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

[117] Также предусмотрен набор, содержащий антитело, биспецифическое антитело или любые его антигенсвязывающие фрагменты, химерный рецептор или композицию по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления.

[118] Также предусмотрен способ лечения или предупреждения неопластического заболевания у субъекта, при этом способ предусматривает введение субъекту эффективного количества антитела, биспецифического антитела или любых его антигенсвязывающих фрагментов, химерного рецептора или композиции по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления. В одном варианте осуществления неопластическое заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лейкоз, лимфому, рак головы и шеи, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, меланому, рак молочной железы, нейробластому, рак легкого, рак яичника, остеосаркому, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак печени, рак почки, рак кожи или рак яичка.

CTLA4-связывающий белок

[119] Термин «CTLA4-связывающий белок», предусмотренный в данном

документе, относится к полипептиду, содержащему CTLA4-связывающий домен, который способен связываться с белком CTLA4 или иным образом проявлять сродство к нему. В некоторых вариантах осуществления CTLA4-связывающий белок представляет собой антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент, одноцепочечное антитело и т. д. В некоторых вариантах осуществления CTLA4-связывающий белок представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CTLA4. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CTLA4, представляет собой антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления CTLA4-связывающий белок представляет собой антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления CTLA4-связывающий белок является компонентом химерного рецептора антигена, который связывает CTLA4.

[120] Термин «CTLA4-связывающий домен» относится к рекомбинантно экспрессируемому полипептидному домену, способному связываться или иным образом проявлять сродство к белку CTLA4, встречающемуся в клетке или на ней. Способы определения степени связывания CTLA4-связывающего домена с CTLA4 хорошо известны в данной области техники.

[121] В некоторых вариантах осуществления CTLA4-связывающий домен, предусмотренный в данном документе, представляет собой антитело, способное связываться с CTLA4. В некоторых вариантах осуществления CTLA4 представляет собой CTLA4 человека. В некоторых вариантах осуществления CTLA4 представляет собой CTLA4 мыши. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой мышьеантитело.

[122] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизованное антитело, химерное антитело или человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент антитела (включая антигенсвязывающий фрагмент), например, фрагмент dAb, Fab, Fab'-SH, Fv, scFv или (Fab')₂. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой димер. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гомодимер. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гетеродимер. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гетеродимер, содержащий первую цепь и вторую цепь, такой как гетеродимер, содержащий тяжелую цепь и легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит первую цепь и вторую цепь. В некоторых вариантах осуществления первая цепь

представляет собой или содержит тяжелую цепь, а вторая цепь представляет собой или содержит легкую цепь; или первая цепь представляет собой или содержит легкую цепь, а вторая цепь представляет собой или содержит тяжелую цепь. В некоторых вариантах осуществления первая цепь представляет собой или содержит переменную область тяжелой цепи, а вторая цепь представляет собой или содержит переменную область легкой цепи; или первая цепь представляет собой или содержит переменную область легкой цепи, а вторая цепь представляет собой или содержит переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат первую цепь и вторую цепь (например, легкую цепь и тяжелую цепь). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат две первые цепи и две вторые цепи (например, две легкие цепи и две тяжелые цепи). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, где переменная область легкой цепи содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или 13, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 или 14, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или 15; и/или где переменная область тяжелой цепи содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или 16, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5 или 17, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или 18.

[123] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, где переменная область легкой цепи содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3; и/или где переменная область тяжелой цепи содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, где переменная область легкой цепи содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3; и переменная область тяжелой цепи содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6.

цепи, где переменная область легкой цепи содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21; и/или где переменная область тяжелой цепи содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, где переменная область легкой цепи содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21; и переменная область тяжелой цепи содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

[127] В некоторых вариантах осуществления VL-домен содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 25, а VH-домен содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления VL-домен содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 30, а VH-домен содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 31.

[128] В некоторых вариантах осуществления первая цепь представляет собой легкую цепь, а вторая цепь представляет собой тяжелую цепь. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат две первые цепи и две вторые цепи. В некоторых вариантах осуществления первая цепь представляет собой переменный домен легкой цепи, а вторая цепь представляет собой переменный домен тяжелой цепи. В некоторых из любых таких вариантов осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент dAb, Fab, Fab'-SH, Fv, scFv или (Fab')₂.

[129] В некоторых из любых таких вариантов осуществления антитело представляет собой мышиное антитело.

[130] В некоторых из любых таких вариантов осуществления антитело представляет собой гуманизованное антитело, химерное антитело или человеческое антитело. В некоторых из любых таких вариантов осуществления антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых из любых таких вариантов осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены S298A, E333A и K334A; S239D и I332E; S239D, A330L и I332E; P247I и A339D или A339Q; D280H, K290S с S298D или

S298V или без них; F243L, R292P, и Y300L; F243L, R292P, Y300L и P396L; F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L; G236A, S239D и I332E; K326A и E333A; K326W и E333S; или K290E, или K290N, S298G, T299A, и/или K326E; где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом согласно Kabat.

[131] В некоторых из любых таких вариантов осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:25 или 30; и/или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:26 или 31.

[132] В некоторых из любых вариантов осуществления VL-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 25, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26. В некоторых из любых таких вариантов осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:25 и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:26.

[133] В некоторых из любых вариантов осуществления VL-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 30, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 31. В некоторых из любых таких вариантов осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:30 и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:31.

[134] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, гомологичную на или на приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 27; и/или содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, гомологичную на или на приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, гомологичную на или на приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 27; и содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, гомологичную на или на

[139] В некоторых из любых таких вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27, и/или тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:28. В некоторых из любых таких вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27, и/или тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:29. В некоторых из любых таких вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:28. В некоторых из любых таких вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:27, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:29.

[140] В некоторых из любых таких вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, и/или тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:33. В некоторых из любых таких вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, и/или тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:34. В некоторых из любых таких вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:32, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:33. В некоторых из любых таких вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:32, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:34.

[141] В данном документе также предусмотрено биспецифическое антитело, содержащее легкую цепь и тяжелую цепь первой пары, которая специфически связывается с CTLA4, а также легкую цепь и тяжелую цепь второй пары, которая специфически связывается с антигеном, например, антигеном, который является опухолевым антигеном.

[142] В некоторых из любых таких вариантов осуществления биспецифическое антитело представляет собой мышинное антитело.

[143] В некоторых из любых таких вариантов осуществления биспецифическое антитело представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или человеческое антитело. В некоторых из любых таких вариантов осуществления биспецифическое антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых из любых таких вариантов осуществления IgG1 содержит такие аминокислотные замены, как S298A, E333A и K334A; S239D и I332E; S239D, A330L и I332E; P247I и A339D или

A339Q; D280H, K290S с S298D или S298V или без них; F243L, R292P, и Y300L; F243L, R292P, Y300L и P396L; F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L; G236A, S239D и I332E; K326A и E333A; K326W и E333S; или K290E, или K290N, S298G, T299A и/или K326E; где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом согласно Kabat.

[144] В некоторых из любых таких вариантов осуществления первая пара содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, где переменная область легкой цепи содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:1 или 13, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:2 или 14, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:3 или 15; и/или где переменная область тяжелой цепи содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:4 или 16, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:5 или 17, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:6 или 18.

[145] В некоторых из любых таких вариантов осуществления первая пара содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:25 или 30; и/или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:26 или 31.

[146] В некоторых из любых таких вариантов осуществления первая пара содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 25, и VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26. В некоторых из любых таких вариантов осуществления первая пара содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25; и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26.

[147] В некоторых из любых таких вариантов осуществления первая пара содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 30, и VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 31. В некоторых из любых таких вариантов осуществления первая пара содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30; и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

[148] В некоторых из таких вариантов осуществления первая пара содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:27 и 32; и/или тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28, 29, 33 и 34.

[149] В некоторых из любых таких вариантов осуществления первая пара содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:27; и/или тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:28. В некоторых из любых таких вариантов осуществления первая пара содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:27; и/или тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:29. В некоторых из любых таких вариантов осуществления первая пара содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:27, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:28. В некоторых из любых таких вариантов осуществления первая пара содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:27, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:29.

[150] В некоторых из любых таких вариантов осуществления первая пара содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:32; и/или тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:33. В некоторых из любых таких вариантов осуществления первая пара содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:32; и/или тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:34. В некоторых из любых таких вариантов осуществления первая пара содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:32, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:33. В некоторых из любых таких вариантов осуществления первая пара содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:32, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:34.

[151] В некоторых из любых таких вариантов осуществления биспецифическое антитело содержит первую цепь или вторую цепь, где первая цепь содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:1 или 13, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:2 или 14, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:3 или 15; и/или где вторая цепь содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:4 или 16, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:5 или 17, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:6 или 18.

[152] В некоторых из любых таких вариантов осуществления первая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:25 или 30; и/или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:26 или 31.

[153] В некоторых из любых таких вариантов осуществления первая цепь содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:

25, и VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26. В некоторых из любых таких вариантов осуществления первая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:25; и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:26.

[154] В некоторых из любых таких вариантов осуществления первая цепь содержит VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 30, и VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 31. В некоторых из любых таких вариантов осуществления первая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:30; и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:31.

[155] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:25 или 30; и/или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:26 или 31. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, гомологичную на или на приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 25; и/или содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, гомологичную на или на приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, гомологичную на или на приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 25; и содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, гомологичную на или на приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, гомологичную на или на приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 30; и/или содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность,

гомологичную на или на приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, гомологичную на или на приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 30; и содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, гомологичную на или на приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30; и/или содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30; и содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

[156] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относятся к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относятся к изотипу IgG1, содержащему аминокислотные замены, которые усиливают эффекторную функцию, как описано в данном документе.

[157] В некоторых вариантах осуществления CTLA4-связывающий домен содержит легкую цепь и тяжелую цепь антигенсвязывающего плеча биспецифического антитела. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела легкая цепь содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или 13, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 или 14, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или 15; и/или где тяжелая цепь содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или 16, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5 или 17, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или 18. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела легкая цепь содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3; и тяжелая цепь содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6. В

некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела легкая цепь содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9; и тяжелая цепь содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела легкая цепь содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15; и тяжелая цепь содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела легкая цепь содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21; и тяжелая цепь содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

[158] В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела VL-домен содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 25, а VH-домен содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела VL-домен содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 30, а VH-домен содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 31.

[159] В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, гомологичную на или на приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 25; и/или тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, гомологичную на или на приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, гомологичную на или на приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%

аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 30; и/или тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, гомологичную на или на приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 31.

[160] В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:25 или 30; и/или переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:26 или 31.

[161] В некоторых из любых вариантов осуществления биспецифического антитела VL-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 25, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26. В некоторых из любых таких вариантов осуществления биспецифического антитела антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:25 и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:26.

[162] В некоторых из любых вариантов осуществления биспецифического антитела VL-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 30, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 31. В некоторых из любых таких вариантов осуществления биспецифического антитела антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:30 и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:31.

[163] В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, гомологичную на или на приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 и 32; и/или тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, гомологичную на или на приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 29, 33 и 34. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 27 и 32; и/или тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28, 29, 33 и 34.

[164] В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела легкая

представляет собой CTLA4 человека. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела CTLA4 представляет собой CTLA4 мыши. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело представляет собой мышинное антитело.

[169] В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело относится к изотипу IgG1, содержащему аминокислотные замены, которые усиливают эффекторную функцию, как описано в данном документе.

[170] В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой димер. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гомодимер. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гетеродимер. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гетеродимер, содержащий первую цепь и вторую цепь, такой как гетеродимер, содержащий тяжелую цепь и легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат первую цепь и вторую цепь. В некоторых вариантах осуществления первая цепь представляет собой или содержит тяжелую цепь, а вторая цепь представляет собой или содержит легкую цепь; или первая цепь представляет собой или содержит легкую цепь, а вторая цепь представляет собой или содержит тяжелую цепь. В некоторых вариантах осуществления первая цепь представляет собой или содержит переменную область тяжелой цепи, а вторая цепь представляет собой или содержит переменную область легкой цепи; или первая цепь представляет собой или содержит переменную область легкой цепи, а вторая цепь представляет собой или содержит переменную область тяжелой цепи.

[171] В некоторых вариантах осуществления CTLA4-связывающий домен содержит первую цепь и вторую цепь, которые связываются с CTLA4, например, как часть лиганд-связывающего домена для применения в химерном рецепторе. В некоторых вариантах осуществления химерного рецептора первая цепь представляет собой переменный домен легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления вторая цепь представляет собой переменный домен тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления химерного рецептора первая цепь содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или 13, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 или 14, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или 15; и/или где вторая цепь содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или 16, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под

осуществления химерного рецептора первая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30, а вторая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

[173] CTLA4-связывающий белок можно конъюгировать с дополнительной молекулой посредством множества способов, хорошо известных в данной области техники. Термины «конъюгат» и «химические реакции конъюгирования» относятся к реакциям с известными реакционноспособными группами, которые протекают в относительно мягких условиях. Они включают без ограничения нуклеофильные замещения (например, реакции аминов и спиртов с ацилгалогенидами, активными сложными эфирами), электрофильные замещения (например, реакции енаминов) и присоединения к кратным связям углерод-углерод и углерод-гетероатом (например, реакция Михаэля, присоединение Дильса-Альдера). Эти и другие применимые реакции обсуждаются, например, в March, *Advanced Organic Chemistry*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, 1996; и Feeney et al., *Modification of Proteins; Advances in Chemistry Series*, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

[174] Применимые реакционноспособные функциональные группы, используемые в данном документе для химических реакций конъюгирования, включают, например, (a) карбоксильные группы и их различные производные, включая без ограничения сложные эфиры N-гидроксисукцинимиды, сложные эфиры N-гидроксибензотриазола, галогенангидриды, ацилимидазолы, сложные тиоэфиры, сложные п-нитрофениловые эфиры, алкиловые, алкениловые, алкиниловые и ароматические сложные эфиры; (b) гидроксильные группы, которые могут быть преобразованы в сложные эфиры, эфиры, альдегиды и т. д.; (c) галогеналкильные группы, где галогенид может быть позже замещен нуклеофильной группой, такой как, например, амин, карбоксилатный анион, тиоловый анион, карбанион или алкоксид-ион, что приводит к ковалентному присоединению новой группы в месте расположения атома галогена; (d) диенофильные группы, которые способны участвовать в реакциях Дильса-Альдера, такие как, например, малеимидные группы; (e) альдегидные или кетонные группы, так что последующая дериватизация возможна через образование карбонильных производных, таких как, например, имины, гидразоны, семикарбазоны или оксимы, или через такие механизмы, как присоединение Гриньяра или присоединение алкиллития; (f) сульфониалогенидные группы для последующей реакции с аминами, например, с образованием сульфонамидов; (g) тиоловые группы, которые можно превратить в дисульфиды, подвергнуть реакции с ацилгалогенидами или связать с металлами, такими как золото; (h) амино- или сульфгидрильные группы, которые могут быть, например, ацилированными, алкилированными или окисленными; (i) алкены, которые могут подвергаться, например, циклоприсоединению, ацилированию, присоединению по Михаэлю и т. д.; (j) эпоксиды, которые могут вступать в реакцию, например, с аминами и гидроксильными соединениями; (k) фосфорамидиты и другие стандартные функциональные группы,

применимые для синтеза нуклеиновых кислот; (i) связывание с металлическим оксидом кремния; и (l) связывание металла с реакционноспособными фосфорными группами (например, фосфинами) с образованием, например, фосфатных диэфирных связей.

[175] Реакционноспособные функциональные группы могут быть выбраны так, чтобы они не участвовали в химической стабильности композиций, описанных в данном документе, или не влияли на нее. Альтернативно, реакционноспособная функциональная группа может быть защищена от участия в реакции сшивания за счет присутствия защитной группы.

[176] В некоторых вариантах осуществления линкеры могут быть сконструированы для слияния с дополнительной молекулой и/или CTLA4-связывающим белком различными способами, хорошо известными в данной области техники. Например, нуклеиновая кислота может быть сконструирована для кодирования линкера с дополнительной молекулой и/или CTLA4-связывающим белком для получения слитого белка при рекомбинантной экспрессии из клетки-хозяина.

Иллюстративные CTLA4-связывающие белки

[177] Ниже описаны определенные иллюстративные варианты осуществления CTLA4-связывающих белков, имеющих определенные характеристики, описанные выше. Эти варианты осуществления являются просто иллюстративными и не должны рассматриваться как ограничивающие.

[178] В некоторых вариантах осуществления предусмотрено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CTLA4 (например, CTLA4 человека), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат первую цепь и вторую цепь. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CTLA4, представляют собой любое антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат две первые цепи и две вторые цепи. В некоторых вариантах осуществления первая цепь представляет собой легкую цепь, а вторая цепь представляет собой тяжелую цепь. В некоторых вариантах осуществления первая цепь представляет собой переменный домен легкой цепи, а вторая цепь представляет собой переменный домен тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления а) первая цепь антитела представляет собой легкую цепь, а вторая цепь антитела представляет собой легкую цепь; б) первая цепь антитела представляет собой тяжелую цепь, а вторая цепь антитела представляет собой тяжелую цепь; или с) первая цепь антитела представляет собой легкую цепь, а вторая цепь антитела представляет собой тяжелую цепь.

[179] Также в данном документе в некоторых вариантах осуществления предусмотрено антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:19, CDR-L2, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:20, и CDR-L3, которая содержит

аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:21; и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:22, CDR-H2, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:23, и CDR-H3, которая содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:24.

[180] В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30, а переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32.

[181] В одном аспекте в данном документе предусмотрено антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:25 или 30, и/или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:26 или 31. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрено антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

[182] В дополнительном аспекте в данном документе предусмотрено антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:27 и 32, и/или содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:28, 29, 33 и 34. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрено антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрено антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрено антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрено антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, и тяжелую цепь, содержащую

аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

[183] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрено антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична на меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO:26 и 31. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрено антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:26. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрено антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:31. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность, которая идентична на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности, содержит замены, вставки или делеции по сравнению с эталонной последовательностью, но антитело, содержащее эту аминокислотную последовательность, сохраняет способность к связыванию с CTLA4 (например, CTLA4 человека). В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) происходят в областях за пределами HVR (т. е. в FR). В некоторых вариантах осуществления антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:26 или 31. В некоторых вариантах осуществления антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:26. В некоторых вариантах осуществления антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:31.

[184] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрено антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:25 или 30. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрено антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:25. В некоторых вариантах осуществления в данном

документе предусмотрено антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:30. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность, которая идентична на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности, содержит замены, вставки или делеции по сравнению с эталонной последовательностью, но антитело, содержащее эту аминокислотную последовательность, сохраняет способность к связыванию с CTLA4 (например, CTLA4 человека). В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) происходят в областях за пределами HVR (т. е. в FR). В некоторых вариантах осуществления антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:25 или 30. В некоторых вариантах осуществления антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:25. В некоторых вариантах осуществления антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:30.

[185] Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM с тяжелыми цепями обозначенными α , δ , ϵ , γ и μ соответственно. Классы γ и α дополнительно делятся на подклассы, например, у людей экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Антитела IgG1 могут существовать во множестве полиморфных вариантов, называемых аллотипами (см. обзор Jefferis and Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Issue 4 1-7), любой из которых подходит для применения в некоторых из вариантов осуществления в данном документе. Общие аллотипические варианты в человеческих популяциях обозначаются буквами a, f, n, z или их комбинациями. В некоторых из вариантов осуществления в данном документе антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, относятся к изотипу IgG1 (например, изотипу IgG1 человека). В некоторых вариантах осуществления предусмотренное в данном документе антитело содержит константный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления предусмотренное в данном документе антитело содержит константный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38.

[186] В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие антитела к CTLA4 или их антигенсвязывающие фрагменты. В определенных вариантах осуществления предусмотрены векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие антитела к CTLA4 или их антигенсвязывающие фрагменты. В определенных

вариантах осуществления предусмотрены клетки-хозяева, содержащие такие векторы. В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены композиции, содержащие антитела к CTLA4, описанные в данном документе, или полинуклеотиды, кодирующие антитела к CTLA4, описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению представляет собой фармацевтический состав для лечения неопластического заболевания, в котором играет роль CTLA4, такого заболевания, как перечислены в данном документе.

[187] В некоторых вариантах осуществления CTLA4-связывающий белок, предусмотренный в данном документе, представляет собой биспецифическое антитело, способное связываться с CTLA4. Биспецифические антитела представляют собой моноклональные антитела, которые обладают специфичностью связывания по меньшей мере с двумя различными антигенами. В некоторых вариантах осуществления одна из специфичностей связывания относится к CTLA4, а другая - к любому другому антигену. В определенных вариантах осуществления биспецифические антитела могут связываться с двумя разными эпитопами CTLA4.

[188] В некоторых аспектах в данном документе также предусмотрено биспецифическое антитело, содержащее а) легкую цепь и тяжелую цепь первой пары, которая специфически связывается с CTLA4, а также б) легкую цепь и тяжелую цепь второй пары, которая специфически связывается с антигеном. В некоторых аспектах в данном документе также предусмотрено биспецифическое антитело, содержащее а) легкую цепь и тяжелую цепь первой пары, которая специфически связывается с CTLA4, а также б) легкую цепь и тяжелую цепь второй пары, которая специфически связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой антиген, отличный от CTLA4. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь первой пары или второй пары представляет собой любую легкую цепь, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь первой пары или второй пары представляет собой любую легкую цепь, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь первой пары содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21; и тяжелая цепь первой пары содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь второй пары содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21; и тяжелая цепь второй пары содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID

NO: 23, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления антиген относится к другому эпитопу CTLA4.

[189] Рассматриваемые в данном документе биспецифические антитела для применения в качестве биспецифических антител включают биспецифические антитела мыши, гуманизированные биспецифические антитела, химерные биспецифические антитела и биспецифические антитела человека. В некоторых из вариантов осуществления в данном документе биспецифическое антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело, предусмотренное в данном документе, относится к изотипу IgG1 (например, изотипу IgG1 человека). В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изотипу IgG1, содержащему аминокислотные замены, или экспрессируется клетками, которые обладают сниженной способностью или не способны к фукозилированию Fc-гликана, что усиливает эффекторную функцию, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления предусмотренное в данном документе биспецифическое антитело содержит константный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:35. В некоторых вариантах осуществления предусмотренное в данном документе биспецифическое антитело содержит константный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:38.

[190] В одном аспекте в данном документе предусмотрено биспецифическое антитело к CTLA4, которое содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:25 и 30, и/или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:26 и 31. В дополнительном аспекте в данном документе предусмотрено биспецифическое антитело к CTLA4, содержащее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:27 и 32, и/или содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:28, 29, 33 и 34. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрено биспецифическое антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрено биспецифическое антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрено биспецифическое антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах

осуществления в данном документе предусмотрено биспецифическое антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

[191] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрено биспецифическое антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична на меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO:26 и 31. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрено биспецифическое антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:26. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрено биспецифическое антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:31. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность, которая идентична на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности, содержит замены, вставки или делеции по сравнению с эталонной последовательностью, но антитело, содержащее эту аминокислотную последовательность, сохраняет способность к связыванию с CTLA4 (например, CTLA4 человека). В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) происходят в областях за пределами HVR (т. е. в FR). В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:26 и 31. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:26. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:31.

[192] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрено биспецифическое антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична на меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID

NO:25 и 30. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрено биспецифическое антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:25. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрено биспецифическое антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:30. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность, которая идентична на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности, содержит замены, вставки или делеции по сравнению с эталонной последовательностью, но антитело, содержащее эту аминокислотную последовательность, сохраняет способность к связыванию с CTLA4 (например, CTLA4 человека). В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) происходят в областях за пределами HVR (т. е. в FR). В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:25 и 30. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:25. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:30.

[193] В некоторых вариантах осуществления CTLA4-связывающий белок, предусмотренный в данном документе, представляет собой химерный рецептор (например, химерный антигенный рецептор (CAR)), способный связываться с CTLA4. CAR представляют собой молекулы, которые сочетают основанную на антителах специфичность к требуемому антигену (например, CTLA4) с внутриклеточным доменом, активирующим Т-клеточный рецептор, с образованием химерного белка, который проявляет специфическую противоопухолевую клеточную активность. В одном варианте осуществления в данном документе предусмотрен химерный рецептор, сконструированный так, чтобы содержать внеклеточный домен, имеющий CTLA4-связывающий домен, описанный в данном документе, слитый с внутриклеточным сигнальным доменом дзета-цепи комплекса Т-клеточного антигенного рецептора (например, CD3-дзета). Предусмотренный в данном документе химерный рецептор при экспрессии в Т-клетке способен перенаправлять распознавание антигена на основе специфичности связывания антигена за счет внеклеточного домена. В некоторых

вариантах осуществления CTLA4-связывающий домен предпочтительно слит с внутриклеточным доменом из одной или нескольких костимулирующих молекул и дзета-цепи. В некоторых вариантах осуществления CTLA4-связывающий домен слит с одним или несколькими внутриклеточными доменами, выбранными из группы, состоящей из сигнального домена CD137 (4-1BB), сигнального домена CD28, сигнального домена CD3-дзета и любой их комбинации.

[194] В некоторых аспектах в данном документе предусмотрен химерный рецептор, содержащий а) лиганд-связывающий домен, содержащий первую цепь и вторую цепь, которые связываются с CTLA4; б) трансмембранный домен; и с) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления первая цепь представляет собой вариабельный домен легкой цепи, а вторая цепь представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления первая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:25 и 30; и/или вторая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:26 и 31.

[195] В некоторых аспектах в данном документе предусмотрен химерный рецептор, содержащий а) лиганд-связывающий домен, содержащий первую цепь и вторую цепь, которые связываются с CTLA4; б) трансмембранный домен; и d) внутриклеточный сигнальный домен, предусматривающий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления первая цепь представляет собой вариабельный домен легкой цепи, а вторая цепь представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления первая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:25 и 30; и/или вторая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:26 и 31.

[196] В некоторых аспектах в данном документе предусмотрен химерный рецептор, содержащий 1) лиганд-связывающий домен, содержащий VL-домен и VH-домен, которые связываются с CTLA4, где: а) VL-домен содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 25, и VH-домен содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26; или б) VL-домен содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 30, а VH-домен содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 31; 2) трансмембранный домен; и 3) внутриклеточный сигнальный домен, предусматривающий сигнальный домен.

[197] В некоторых аспектах в данном документе предусмотрен химерный рецептор, содержащий 1) лиганд-связывающий домен, содержащий VL-домен и VH-домен, которые связываются с CTLA4, где: а) VL-домен содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3; и/или VH-домен

содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и (iii) а CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; или б) VL-домен содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, и (iii) а CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15; и/или VH-домен содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18; или с) VL-домен содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9; и/или VH-домен содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12; или d) VL-домен содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21; и/или VH-домен содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24; 2) трансмембранный домен; и 3) внутриклеточный сигнальный домен, предусматривающий сигнальный домен.

[198] В некоторых аспектах в любом из предусмотренных химерных рецепторов а) VL-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 25, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26; или б) VL-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 30, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 31.

[199] В некоторых аспектах в любом из предусмотренных химерных рецепторов а) VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26; или б) VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

1. Аффинность связывания

[200] Сила или аффинность взаимодействий иммунологического связывания, например, между антителом и антигеном, для которого данное антитело является специфическим, могут быть выражены исходя из равновесной константы диссоциации (K_D) взаимодействия, где меньшая K_D представляет большую аффинность. Иммунологические связывающие свойства белков можно количественно оценить с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. Например, один способ включает измерение значений скоростей образования и диссоциации комплекса антигенсвязывающий белок (например, антитело)/антиген, где эти значения скорости зависят от концентраций партнеров по комплексу, аффинности взаимодействия и геометрических параметров, которые в равной степени влияют на скорость в обоих направлениях. Как «константу скорости ассоциации» (K_{on}), так и «константу скорости диссоциации» (K_{off}) можно определить путем расчета концентраций и фактических скоростей ассоциации и диссоциации. Отношение K_{off}/K_{on} позволяет исключить все параметры, не связанные с аффинностью, и оно равняется равновесной константе диссоциации K_D . См. Davies et al., *Annual Rev Biochem.* 59:439-473, (1990).

[201] В некоторых аспектах связывающий белок к CTLA4 (например, антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент), описанные в данном документе, связываются с CTLA4 приблизительно с такой же или более высокой аффинностью по сравнению с другим связывающим белком к CTLA4. В определенных вариантах осуществления связывающий белок к CTLA4, предусмотренный в данном документе, имеет равновесную константу диссоциации (K_D), которая составляет ≤ 1 мкМ, ≤ 150 нМ, ≤ 100 нМ, ≤ 50 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-8} М или меньше, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М). В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к CTLA4 (например, маскированное антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент), предусмотренный в данном документе, связывается с целевым белком (например, белком CTLA4) с равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей от приблизительно 50 пМ до приблизительно 5 нМ. Анализы для оценки аффинности связывания хорошо известны в данной области техники, например такие, как в анализах, описанных в примере 1 в данном документе.

2. Анализы биологической активности

[202] В некоторых аспектах связывающий белок к CTLA4, описанный в данном документе, уменьшает объем опухоли в мышечной модели опухоли *in vivo*. Анализы для оценки снижения объема опухоли хорошо известны в данной области техники, например такие, как в анализе, описанном в примере 1 в данном документе.

Получение связывающего белка к CTLA4

[203] Описанные в данном документе связывающие белки к CTLA4 получают с использованием методик, доступных в данной области техники, иллюстративные способы которых описаны более подробно в следующих разделах.

1. Связывающий белок к CTLA4. Фрагменты антител

[204] Настоящее изобретение охватывает фрагменты антител в виде связывающих белков к CTLA4. Фрагменты антител могут быть получены традиционными способами, такими как ферментативное расщепление, или рекомбинантными методами. В определенных обстоятельствах существуют преимущества применения фрагментов антител, а не целых антител. Для обзора определенных фрагментов антител см. Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

[205] Были разработаны различные методы получения фрагментов антител. Традиционно эти фрагменты получали с помощью протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); и Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). Однако теперь эти фрагменты можно получать непосредственно с помощью рекомбинантных клеток-хозяев. Все из Fab-, Fv- и ScFv-фрагментов антител можно экспрессировать и секретировать из *E. coli* и клеток других типов, что обеспечивает легкое получение больших количеств этих фрагментов. Альтернативно, фрагменты Fab'-SH можно непосредственно извлекать из культуральной среды и химически связывать с образованием F(ab')₂-фрагментов (Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). Согласно другому подходу, F(ab')₂-фрагменты можно выделять непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Fab- и F(ab')₂-фрагменты с увеличенным периодом полужизни *in vivo*, содержащие остатки эпитопа связывания FcRN/рецептора реутилизации, описаны в патенте США № 5869046. Другие методики получения фрагментов антител будут очевидны квалифицированному практикующему специалисту. В определенных вариантах осуществления антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). См. WO 93/16185; патенты США №№ 5571894 и 5587458. Fv и scFv являются единственными видами с интактными активными центрами, лишенными константных областей; таким образом, они могут подходить для снижения уровня неспецифического связывания при применении *in vivo*. Слитые белки scFv можно сконструировать так, чтобы обеспечить слияние эффекторного белка либо на amino-, либо на карбокси-конце scFv. См. *Antibody Engineering*, ed. Vorebaeck, выше. Кроме того, би-scFv, содержащий два scFv, связанных полипептидным линкером, можно использовать в качестве биспецифического антитела. Альтернативно, поли-scFv, содержащий три или более scFv, можно использовать в качестве полиспецифического антитела.

[206] Настоящее изобретение включает линейное антитело (например, как описано в патенте США № 5641870) или одноцепочечный иммуноглобулин, содержащий последовательности тяжелой и легкой цепей антитела, связанные с помощью соответствующего линкера. Такие линейные антитела или иммуноглобулины могут быть моноспецифическими или биспецифическими. Такой одноцепочечный иммуноглобулин можно димеризовать, чтобы тем самым сохранить структуру и активность, аналогичные таковым у антитела, которое изначально является тетрамером. Также антитело по настоящему изобретению может быть антителом, которое содержит одну переменную область тяжелой цепи и не содержит последовательности легкой цепи. Такое антитело

называется однодоменным антителом (sdAb) или нанотелом. Эти антитела также охватываются значением функционального фрагмента антитела согласно настоящему изобретению.

2. Связывающий белок к CTLA4. Гуманизированные антитела

[207] Настоящее изобретение охватывает гуманизированные антитела. Гуманизированные антитела получают в соответствии с приведенными в данном документе рекомендациями. В данной области техники известны различные способы гуманизирования антител, отличных от человеческих. Например, гуманизированное антитело может иметь один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из источника, не являющегося человеческим. Такие аминокислотные остатки, отличные от человеческих остатков, часто называют «импортированными» остатками, которые в типичном случае взяты из «импортированного» варибельного домена. Гуманизацию по существу можно проводить в соответствии со способом Winter (Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) *Science* 239:1534-1536) путем замены последовательностей гиперварибельной области на соответствующие последовательности человеческого антитела. Соответственно, такие «гуманизированные» антитела представляют собой химерные антитела (патент США № 4816567), в которых существенно меньшая часть, чем интактный человеческий варибельный домен, была заменена соответствующей последовательностью из вида, отличного от человека. На практике гуманизированные антитела в типичном случае представляют собой человеческие антитела, в которых некоторые остатки гиперварибельных областей и, возможно, некоторые FR-остатки заменены остатками из аналогичных участков антител грызунов.

3. Связывающий белок к CTLA4. Человеческие антитела

[208] Человеческие антитела к CTLA4 по настоящему изобретению можно сконструировать путем комбинирования последовательности (последовательностей) варибельного домена клона Fv, выбранной (выбранных) из полученных от человека библиотек фагового дисплея, с известной (известными) последовательностью (последовательностями) константного домена человека. Альтернативно, человеческие моноклональные антитела к CTLA4 по настоящему изобретению можно получить посредством способа с использованием гибридомы. Клеточные линии миеломы человека и гетеромиеломы мыши и человека для получения человеческих моноклональных антител были описаны, например, Kozbor J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); и Voerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991). Антитела человека получают в соответствии с приведенными в данном документе рекомендациями.

4. Связывающий белок к CTLA4. Биспецифические антитела

[209] Биспецифические антитела представляют собой моноклональные антитела, которые обладают специфичностью связывания по меньшей мере с двумя различными антигенами. В определенных вариантах осуществления биспецифические антитела

представляют собой человеческие или гуманизированные антитела. В определенных вариантах осуществления одна из специфичностей связывания относится к CTLA4, а другая - к любому другому антигену. В определенных вариантах осуществления биспецифические антитела могут связываться с двумя разными эпитопами CTLA4. Биспецифические антитела также можно использовать для локализации цитотоксических средств в клетках, экспрессирующих CTLA4. Биспецифические антитела можно получить в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифических антител F(ab')₂). Биспецифические антитела получают в соответствии с приведенными в данном документе рекомендациями.

[210] Способы получения биспецифических антител известны в данной области техники. См. Milstein and Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983), WO 93/08829 опубликованную 13 мая 1993 года, Traunecker et al., *EMBO J.*, 10: 3655 (1991); Kontermann and Brinkmann, *Drug Discovery Today*, 20(7):838- 847. Для получения дополнительных сведений о создании биспецифических антител см., например, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986). Биспецифические антитела включают сшитые или «гетероконъюгированные» антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть соединено с авидином, а другое - с биотином. Гетероконъюгированные антитела могут быть получены с использованием любого подходящего способа сшивания. Подходящие средства сшивания хорошо известны из уровня техники и раскрыты в патенте США № 4676980 вместе с рядом методик сшивания.

5. Связывающий белок к CTLA4. Однодоменные антитела

[211] В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело получают в соответствии с приведенными в данном документе рекомендациями. Однодоменное антитело представляет собой одиночную полипептидную цепь, содержащую весь переменный домен тяжелой цепи антитела или его часть, или весь переменный домен легкой цепи антитела или его часть. В определенных вариантах осуществления однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело (Domantis, Inc., Waltham, Mass.; см., например, патент США № 6248516 B1). В одном варианте осуществления однодоменное антитело состоит из всего переменного домена тяжелой цепи антитела или его части.

6. Связывающий белок к CTLA4. Варианты антитела

[212] В некоторых вариантах осуществления предусмотрена (предусмотрены) модификация (модификации) аминокислотной последовательности антител, описанных в данном документе. Например, может быть необходимо улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела можно получить путем введения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции, и/или вставки, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Любая комбинация делеции, вставки и замены может быть сделана для получения итоговой

конструкции при условии, что итоговая конструкция обладает требуемыми характеристиками. Аминокислотные изменения могут быть внесены в аминокислотную последовательность рассматриваемого антитела во время создания последовательности.

[213] Применимый способ идентификации определенных остатков или областей антитела, которые являются предпочтительными местами для мутагенеза, называется «аланиновый сканирующий мутагенез», как описано Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Здесь идентифицируют остаток или группу целевых остатков (например, заряженные остатки, такие как Arg, Asp, His, Lys и Glu) и заменяют нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или полиаланином), чтобы повлиять на взаимодействие аминокислот с антигеном. Те положения аминокислот, которые демонстрируют функциональную чувствительность к заменам, затем уточняют путем введения дополнительных или других вариантов в сайты замены или вместо них. Таким образом, хотя сайт для введения вариации аминокислотной последовательности определяют заранее, природа мутации *per se* необязательно должна быть предопределена. Например, для анализа эффективности мутации в данном сайте проводят сканирование Ala или случайный мутагенез в целевом кодоне или области, и экспрессированные иммуноглобулины проверяют на требуемую активность.

[214] Вставки аминокислотной последовательности включают амино- и/или карбокси-концевые слияния длиной от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки внутрь последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым метионильным остатком. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом или полипептидом, который увеличивает период полужизни антитела в сыворотке крови.

[215] В некоторых вариантах осуществления мутации FcRn, улучшающие фармакокинетические параметры, включают без ограничения M428L, T250Q/M428L, M252Y/S254T/T256E, P257I/N434H, D376V/N434H, P257I/Q3111, N434A, N434W, M428L/N434S, V259I/V308F, M252Y/S254T/T256E, V259I/V308F/M428L, T307Q/N434A, T307Q/N434S, T307Q/E380A/N434A, V308P/N434A, N434H, V308P. В некоторых вариантах осуществления такие мутации усиливают связывание антитела с FcRn при низком pH, но не изменяют аффинность антитела при нейтральном pH.

[216] В определенных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению изменяют для увеличения или уменьшения степени гликозилирования антитела. Гликозилирование полипептидов обычно является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту кроме пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает

потенциальный сайт гликозилирования. О-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксиаминокислоте, чаще всего к серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксиллизин.

[217] Добавление или делецию сайтов гликозилирования антитела обычно осуществляют путем изменения аминокислотной последовательности, так что создается или удаляется одна или несколько из описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Изменение также может быть выполнено путем добавления, делеции или замены одного или нескольких остатков серина или треонина в последовательности исходного антитела (для сайтов О-связанного гликозилирования).

[218] Когда антитело содержит Fc-область, присоединенный к ней углевод можно изменить. Например, антитела со зрелой углеводной структурой, в которой отсутствует фукоза, присоединенная к Fc-области антитела, описаны в заявке на патент США № US 2003/0157108 (Presta, L.). См. также US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Антитела с N-ацетилглюкозамином (GlcNAc) в точках ветвления в углеводе, присоединенном к Fc-области антитела, упоминаются WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. и в патенте США № 6602684, Umana et al. Антитела, содержащие по меньшей мере один остаток галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc-области антитела, описаны в WO 1997/30087, Patel et al. См. также WO 1998/58964 (Raju, S.) и WO 1999/22764 (Raju, S.) относительно антител с измененным углеводом, присоединенным к их Fc-области. См. также US 2005/0123546 (Umana et al.) в отношении антигенсвязывающих молекул с модифицированным гликозилированием.

[219] В определенных вариантах осуществления вариант гликозилирования включает Fc-область, где углеводная структура, присоединенная к Fc-области, не содержит фукозы или имеет пониженное содержание фукозы. В таких вариантах улучшена функция ADCC. Необязательно, Fc-область дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые дополнительно улучшают ADCC, например, замены в положениях 298, 333 и/или 334 Fc-области (нумерация остатков согласно EU). Примеры публикаций, относящихся к «афукозилированным», «дефукозилированным» или «дефицитным по фукозе» антителам, включают: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Примеры клеточных линий, продуцирующих дефукозилированные антитела, включают клетки Lec13 CHO, дефицитные по фукозилированию белка (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); заявка на патент США № US 2003/0157108 A1, Presta, L; и WO 2004/056312 A1, Adams et al., особенно в примере 11), и линии клеток с нокаутом, например, по гену альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8, нокаутные клетки CHO (Yamane-Ohnuki et al.

Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)) и клетки, избыточно экспрессирующие β 1,4-N-ацетилгликозилтрансферазу III (GnT-III) и μ -маннозидазу II аппарата Гольджи (ManII).

[220] В любом из вариантов осуществления в данном документе связывающие белки к CTLA4 можно сконструировать для повышения активности антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к CTLA4 может продуцироваться в клеточной линии, имеющей нокаут альфа-1,6-фукозилтрансферазы (Fut8). В некоторых дополнительных вариантах осуществления связывающий белок к CTLA4 может продуцироваться в клеточной линии, избыточно экспрессирующей β 1,4-N-ацетилгликозилтрансферазу III (GnT-III). В дополнительных вариантах осуществления клеточная линия дополнительно избыточно экспрессирует μ -маннозидазу II аппарата Гольджи (ManII). В некоторых из вариантов осуществления в данном документе связывающий белок к CTLA4 может содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая улучшает активность ADCC.

[221] В одном варианте осуществления антитело изменяют для увеличения его периода полужизни в сыворотке крови. Для увеличения периода полужизни антитела в сыворотке крови можно включить эпитоп связывания FcRN/рецептора реутилизации в антитело (особенно во фрагмент антитела), как описано в патенте США № 5739277, к примеру. Используемый в данном документе термин «эпитоп связывания рецептора реутилизации» относится к эпитопу Fc-области молекулы IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), который отвечает за увеличение периода полужизни молекулы IgG in vivo в сыворотке крови (US 2003/0190311, патент США № 6821505; патент США № 6165745; патент США № 5624821; патент США № 5648260; патент США № 6165745; патент США № 5834597).

[222] Вариант другого типа представляет собой вариант с аминокислотной заменой. В этих вариантах по меньшей мере один аминокислотный остаток в молекуле антитела заменен другим остатком. Сайты, представляющие интерес для замещающего мутагенеза, включают гипервариабельные области, но также рассматриваются изменения в FR. Консервативные замены показаны в **таблице 1** под заголовком «предпочтительные замены». Если такие замены приводят к необходимому изменению биологической активности, тогда можно внести более существенные изменения, обозначенные как «иллюстративные замены» в **таблице 1** или как дополнительно описано ниже со ссылкой на классы аминокислот, и продукты подвергнуть проверке.

Таблица 1.

Исходный остаток	Иллюстративные замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln

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

[223] Существенные модификации биологических свойств антитела достигаются путем выбора замен, которые значительно различаются по своему влиянию на поддержание (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, в виде листовой или спиральной конформации, (б) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте или (с) объема боковой цепи. Аминокислоты можно сгруппировать по сходству свойств их боковых цепей (в A. L. Lehninger, in *Biochemistry*, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

- (1) неполярные: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) незаряженные полярные: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) кислые: Asp (D), Glu (E)
- (4) основные: Lys (K), Arg (R), His (H)

[224] Альтернативно, встречающиеся в природе остатки можно разделить на группы на основе общих свойств боковой цепи:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислые: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;

(5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;

(6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

[225] Неконсервативные замены повлекут за собой замену члена одного из этих классов на другой класс. Такие замещенные остатки также могут быть введены в сайты консервативных замен или в оставшиеся (неконсервативные) сайты.

[226] Один тип варианта с заменой включает замену одного или нескольких остатков гипервариабельной области исходного антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела). Как правило, полученный(полученные) вариант(варианты), выбранный(выбранные) для дальнейшей разработки, будет(будут) иметь модифицированные (например, улучшенные) биологические свойства по сравнению с исходным антителом, из которого они получены. Удобный способ создания таких вариантов замены включает созревание аффинности с использованием фагового дисплея. Вкратце, несколько сайтов гипервариабельной области (например, 6-7 сайтов) подвергаются мутации для получения всех возможных аминокислотных замен в каждом сайте. Образованные таким образом антитела выставляют на частицах нитчатого фага в виде слияния по меньшей мере с частью белка оболочки фага (например, продукта гена III M13), упакованного в каждой частице. Затем отображаемые на фаге варианты подвергаются проверке на их биологическую активность (например, аффинность связывания). Чтобы идентифицировать сайты-кандидаты гипервариабельной области для модификации, можно провести сканирующий мутагенез (например, аланиновое сканирование) для идентификации остатков гипервариабельной области, вносящих значительный вклад в связывание антигена. Альтернативно или дополнительно может быть полезно проанализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами на замену согласно методикам, известным в данной области техники, включая разработанные в данном документе. После создания таких вариантов панель вариантов подвергают скринингу с использованием известных в данной области техники методик, включая описанные в данном документе, и антитела с превосходными свойствами в одном или нескольких соответствующих анализах могут отбирать для дальнейшей разработки.

[227] Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислотной последовательности антитела, получают различными способами, известными в данной области техники. Эти способы включают без ограничения выделение из природного источника (в случае встречающихся в природе вариантов аминокислотной последовательности) или получение с помощью олигонуклеотид-опосредованного (или сайт-направленного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза ранее полученного варианта или не являющейся вариантом версии антитела.

[228] Может быть необходимо ввести одну или несколько аминокислотных модификаций в Fc-область антител по настоящему изобретению, тем самым создавая вариант Fc-области. Вариант Fc-области может содержать последовательность Fc-области

человека (например, Fc-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или нескольких аминокислотных положениях, включая положение шарнирного цистеина.

[229] В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к CTLA4 (например, антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент или биспецифическое антитело к CTLA4), предусмотренный в данном документе, относится к изотипу IgG1 с усиленной эффекторной функцией. В некоторых вариантах осуществления антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент являются афукозилированными. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к CTLA4 является афукозилированным. В некоторых вариантах осуществления антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент имеют повышенные уровни фрагментов маннозы. В некоторых вариантах осуществления антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент имеют повышенные уровни фрагментов гликана в точках ветвления. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к CTLA4 имеет повышенные уровни фрагментов маннозы. В некоторых вариантах осуществления IgG1 содержит аминокислотные мутации.

[230] В некоторых вариантах осуществления антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент или биспецифическое антитело к CTLA4, предусмотренные в данном документе, относятся к изотипу IgG1 (например, к изотипу IgG1 человека). В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены S298A, E333A и K334A, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом согласно Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены S239D и I332E, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом согласно Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены S239D, A330L и I332E, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом согласно Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены P247I и A339D или A339Q, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом согласно Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены D280H, K290S с S298D или S298V, или без них, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом согласно Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены F243L, R292P и Y300L, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом согласно Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены F243L, R292P, Y300L и P396L, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом согласно Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом согласно Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены G236A, S239D и I332E, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом согласно Kabat. В одном варианте

осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены K326A и E333A, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом согласно Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены K326W и E333S, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом согласно Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены K290E или K290N, S298G, T299A и/или K326E, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом согласно Kabat. В некоторых аспектах иллюстративная константная область тяжелой цепи, содержащаяся в предусмотренных CTLA4-связывающих белках, таких как антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, включает последовательность константной области тяжелой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 35-38. В некоторых аспектах иллюстративная константная область легкой цепи, содержащаяся в предусмотренных CTLA4-связывающих белках, таких как антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, включает последовательность константной области легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 39.

[231] В некоторых аспектах предусмотренные CTLA4-связывающие белки, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, включают константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, изложенную под SEQ ID NO:38. В некоторых аспектах предусмотренные CTLA4-связывающие белки, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, включают константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, изложенную под SEQ ID NO:35. В некоторых аспектах предусмотренные CTLA4-связывающие белки, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, включают константную область легкой цепи, содержащую последовательность, изложенную под SEQ ID NO:39.

[232] В некоторых аспектах предусмотренные CTLA4-связывающие белки, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, включают константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, изложенную под SEQ ID NO:38 и константную область легкой цепи, содержащую последовательность, изложенную под SEQ ID NO:39. В некоторых аспектах предусмотренные CTLA4-связывающие белки, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, включают константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, изложенную под SEQ ID NO:35 и константную область легкой цепи, содержащую последовательность, изложенную под SEQ ID NO:39.

[233] В соответствии с этим описанием и идеями в данной области техники предполагается, что в некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению может предусматривать одно или несколько изменений по сравнению с аналогичным антителом дикого типа, например, в Fc-области. Эти антитела, тем не менее, сохраняют практически те же характеристики, необходимые для терапевтического применения, по сравнению с их аналогами дикого типа. Например, считается, что в Fc-области могут быть внесены определенные изменения, которые приведут к изменению (т. е. либо к улучшению, либо к уменьшению) связывания C1q и/или комплемент-зависимой

цитотоксичности (CDC), например, как описано в WO99/51642. См. также Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821 и WO94/29351 относительно других примеров вариантов Fc-области. В WO00/42072 (Presta) и WO 2004/056312 (Lowman) описываются варианты антител с улучшенным или пониженным связыванием с FcR. Содержание этих патентных публикаций специально включено в данный документ посредством ссылки. См. также Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Антитела с увеличенным периодом полужизни и улучшенным связыванием с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который отвечает за передачу материнских IgG плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) и Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), описаны в US 2005/0014934A1 (Hinton et al.). Эти антитела содержат Fc-область с одной или несколькими заменами в ней, которые улучшают связывание Fc-области с FcRn. Варианты полипептида с измененными аминокислотными последовательностями Fc-области и повышенной или пониженной способностью связывания C1q описаны в патенте США № 6194551B1, WO99/51642. Содержание этих патентных публикаций специально включено в данный документ посредством ссылки. См. также Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

[0100] 7. Конъюгаты антитела и лекарственного средства

[234] Настоящее изобретение также предусматривает конъюгаты антитела и лекарственного средства (ADC), содержащие связывающий белок к CTLA4, предусмотренный в данном документе, конъюгированный с одним или несколькими цитотоксическими средствами, такими как химиотерапевтические средства или лекарственные средства, средства, подавляющие рост, токсины (например, белковые токсины, ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, или их фрагменты) или радиоактивные изотопы.

[235] В одном варианте осуществления одно или несколько лекарственных средств, конъюгированных в конъюгат антитела и лекарственного средства, включают без ограничения майтанзиноид (см. патенты США №№ 5208020, 5416064 и Европейский патент EP 0 425 235 B1); ауристатин, такой как монометилауристатиновые лекарственные фрагменты DE и DF (ММАЕ и ММАF) (см. патенты США №№ 5635483, 5780588 и 7498298); доластатин; калихеамицин или его производное (см. патенты США №№ 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001 и 5877296; Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993); и Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)); антрациклин, такой как дауномицин или доксорубин (см. Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006); Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005); Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002); King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002); и патент США № 6630579); метотрексат; виндезин; таксан, такой как доцетаксел, паклитаксел, ларотаксел, тезетаксел и ортатаксел; трихотецен и CC1065.

[236] В другом варианте осуществления одно или несколько лекарственных

средств, конъюгированных в конъюгат антитела и лекарственного средства, включают без ограничения ингибитор полимеризации тубулина (например, майтанзиноиды и ауристатины), повреждающие ДНК средства (например, димеры пирролобензодиазепина (PBD), калихеамицины, дуокармицины и димеры индолинобензодиазепина) и ингибиторы синтеза ДНК (например, производное экзатекана Dxd).

[237] В другом варианте осуществления конъюгат антитела и лекарственного средства содержит антитело, как описано в данном документе, конъюгированное с ферментативно активным токсином или его фрагментом, включая без ограничения А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены.

[238] В другом варианте осуществления конъюгат антитела и лекарственного средства содержит антитело, как описано в данном документе, конъюгированное с радиоактивным атомом с образованием радиоконъюгата. Для получения радиоконъюгатов доступны различные радиоактивные изотопы. Примеры включают At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} и радиоактивные изотопы Lu. Когда радиоконъюгат используется для обнаружения, он может содержать радиоактивный атом для сцинтиграфических исследований, например tc^{99m} или I^{123} , или спиновую метку для ядерной магнитно-резонансной (NMR) томографии (также известной как магнитно-резонансная томография, MRI), например, опять таки йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

[239] Конъюгаты связывающего белка к CTLA4 (например, антитела к CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента) и цитотоксического средства можно получить с использованием множества бифункциональных связывающих белки средств, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), имиотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицина можно получить, как описано в Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). Меченная углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) представляет собой иллюстративное хелатирующее средство для конъюгирования радионуклеотида с антителом. См. WO94/11026. Линкер может быть «расщепляемым линкером», который облегчает высвобождение цитотоксического лекарственного средства

в клетке. Например, можно использовать кислотолабильный линкер, пептидазочувствительный линкер, фотолабильный линкер, диметиловый линкер и дисульфидсодержащий линкер (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); патент США № 5208020).

[240] В данном документе ADC прямо предполагают без ограничения такие конъюгаты, полученные с помощью сшивающих реагентов, включая без ограничения BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), которые являются коммерчески доступными (например, от Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Иллинойс, США).

8. Векторы, клетки-хозяева и рекомбинантные способы

[241] Для рекомбинантного получения связывающих белков к CTLA4 по настоящему изобретению нуклеиновую кислоту, кодирующую его, выделяют и вставляют в реплицируемый вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии. ДНК, кодирующую антитело, легко выделить и секвенировать с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела). Доступно множество векторов. Выбор вектора частично зависит от используемой клетки-хозяина. Обычно клетки-хозяева имеют прокариотическое или эукариотическое (как правило, от млекопитающих) происхождение. Следует понимать, что для данной цели можно использовать константные области любого изотипа, включая константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области могут быть получены от любого вида животного или человека.

9. Получение связывающих белков с применением прокариотических клеток-хозяев

Конструирование вектора

[242] Полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептидные компоненты связывающих белков к CTLA4 по настоящему изобретению, можно получить с использованием стандартных рекомбинантных методик. Требуемые полинуклеотидные последовательности можно выделить и секвенировать из клеток, продуцирующих антитела, таких как клетки гибридомы. В качестве альтернативы полинуклеотиды можно синтезировать с использованием синтезатора нуклеотидов или методик ПЦР. После получения последовательности, кодирующие полипептиды, вставляют в рекомбинантный вектор, способный реплицироваться и экспрессировать гетерологичные полинуклеотиды в прокариотических хозяевах. Множество векторов, которые доступны и известны из уровня техники, можно использовать для целей настоящего изобретения. Выбор подходящего вектора будет зависеть, главным образом, от размера нуклеиновых кислот, которые нужно вставить в вектор, и конкретной клетки-хозяина, подлежащей трансформации данным вектором. Каждый вектор содержит различные компоненты, в

зависимости от его функции (амплификация или экспрессия гетерологичного полинуклеотида, или обе) и его совместимости с конкретной клеткой-хозяином, в которой он находится. Компоненты вектора обычно включают без ограничения точку начала репликации, ген маркера отбора, промотор, сайт связывания рибосомы (RBS), сигнальную последовательность, вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты и последовательность терминации транскрипции.

[243] Как правило, плазмидные векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, полученные от видов, совместимых с клеткой-хозяином, используют в связи с этими хозяевами. Вектор обычно несет сайт репликации, а также маркирующие последовательности, которые способны обеспечивать фенотипический отбор в трансформированных клетках. Например, *E. coli* обычно трансформируют с использованием pBR322, плазмиды, полученной из видов *E. coli*. pBR322 содержит гены, кодирующие устойчивость к ампициллину (Amp) и тетрациклину (Tet), и, таким образом, предоставляет простые средства для идентификации трансформированных клеток. pBR322, ее производные или другие микробные плазмиды или бактериофаги также могут содержать промоторы, которые могут быть использованы микробным организмом для экспрессии эндогенных белков, или могут быть модифицированы таким образом, чтобы содержать их. Примеры производных pBR322, используемых для экспрессии конкретных антител, подробно описаны в Carter et al., патент США № 5648237.

[244] Кроме того, фаговые векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, которые совместимы с микроорганизмом-хозяином, можно использовать в качестве трансформирующих векторов в связи с этими хозяевами. Например, бактериофаг, такой как λ GEM.TM.-11, можно использовать для создания рекомбинантного вектора, который можно использовать для трансформации чувствительных клеток-хозяев, таких как *E. coli* LE392.

[245] Вектор экспрессии по настоящему изобретению может содержать две или более пары промотор-цистрон, кодирующих каждый из полипептидных компонентов. Промотор представляет собой нетранслируемую регуляторную последовательность, расположенную выше (5' от) цистрона, которая модулирует его экспрессию. Прокариотические промоторы обычно делятся на два класса: индуцируемые и конститутивные. Индуцируемый промотор представляет собой промотор, который инициирует повышение уровней транскрипции цистрона, находящегося под его контролем, в ответ на изменения в условиях культивирования, например, присутствие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры.

[246] Хорошо известно большое количество промоторов, распознаваемых множеством потенциальных клеток-хозяев. Выбранный промотор может быть функционально связан с цистронной ДНК, кодирующей легкую или тяжелую цепь, путем удаления промотора из исходной ДНК посредством расщепления с помощью рестрикционного фермента и вставки выделенной промоторной последовательности в вектор по настоящему изобретению. Как нативную промоторную последовательность, так

и многие гетерологичные промоторы можно использовать для управления амплификацией и/или экспрессией целевых генов. В некоторых вариантах осуществления используют гетерологичные промоторы, поскольку они обычно обеспечивают более высокий уровень транскрипции и более высокие значения выхода экспрессируемого целевого гена по сравнению с нативным промотором целевого полипептида.

[247] Промоторы, подходящие для применения с прокариотическими хозяевами, включают промотор PhoA, промоторные системы β -галактамазы и лактозы, промоторную систему триптофана (*trp*) и гибридные промоторы, такие как промотор *tac* или *trc*. Однако другие промоторы, которые являются функциональными в бактериях (такие как другие известные бактериальные или фаговые промоторы), также являются подходящими. Их нуклеотидные последовательности были опубликованы, что позволяет квалифицированному специалисту функционально лигировать их с цистронами, кодирующими целевую легкую и тяжелую цепи (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269), используя линкеры или адаптеры для обеспечения любых необходимых сайтов рестрикции.

[248] В одном аспекте настоящего изобретения каждый цистрон в рекомбинантном векторе содержит компонент последовательности сигнала секреции, который направляет транслокацию экспрессируемых полипептидов через мембрану. В целом, сигнальная последовательность может быть компонентом вектора или частью ДНК целевого полипептида, которая встроена в вектор. Сигнальная последовательность, выбранная для целей настоящего изобретения, должна распознаваться и подвергаться процессингу (т. е. расщепляться сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не процессируют сигнальные последовательности, нативные для гетерологичных полипептидов, сигнальную последовательность заменяют прокариотической сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы, состоящей из лидерных последовательностей щелочной фосфатазы, пенициллиназы, *Irr* или термостабильного энтеротоксина II (STII), *LamB*, *PhoE*, *PelB*, *OmpA* и *MBP*. В одном варианте осуществления настоящего изобретения сигнальные последовательности, используемые в обоих цистронах системы экспрессии, представляют собой сигнальные последовательности STII или их варианты.

[249] В другом аспекте продуцирование иммуноглобулинов согласно настоящему изобретению может происходить в цитоплазме клетки-хозяина и, следовательно, не требует присутствия сигнальных последовательностей секреции в каждом цистроне. В этом отношении легкие и тяжелые цепи иммуноглобулина экспрессируются с последовательностями дополнительной молекулы и т. д. или без них, подвергаются фолдингу и собираются с образованием функциональных иммуноглобулинов в цитоплазме. Определенные штаммы-хозяева (например, штаммы *trxB* *E. coli*) предоставляют в цитоплазме условия, благоприятные для образования дисульфидных связей, тем самым обеспечивая надлежащий фолдинг и сборку экспрессируемых белковых субъединиц. Proba and Plückthun, Gene, 159:203 (1995).

[250] Связывающие белки к CTLA4 по настоящему изобретению также можно получить с использованием системы экспрессии, в которой можно модулировать количественное соотношение экспрессируемых полипептидных компонентов, чтобы увеличить до максимума выход секретированных и правильно собранных антител по настоящему изобретению. Такое модулирование достигается по меньшей мере частично путем одновременного модулирования интенсивности трансляции полипептидных компонентов.

[251] Прокариотические клетки-хозяева, подходящие для экспрессии связывающего белка к CTLA4 по настоящему изобретению, включают археобактерии и эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы. Примеры применимых бактерий включают *Escherichia* (например, *E. coli*), *Bacilli* (например, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, виды *Pseudomonas* (например, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* или *Paracoccus*. В одном варианте осуществления используют грамотрицательные клетки. В одном варианте осуществления в качестве хозяев по настоящему изобретению используют клетки *E. coli*. Примеры штаммов *E. coli* включают штамм W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp.

1190-1219; номер депонирования в ATCC 27,325) и его производные, включая штамм 33D3, имеющий генотип W3110 Δ hfuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT(Δ nmprcfpE) degP41 kanR (патент США № 5639635). Другие штаммы и их производные, например, *E. coli* 294 (ATCC 31,446),

E. coli B, *E. coli* λ 1776 (ATCC 31,537) и *E. coli* RV308(ATCC 31,608) также являются подходящими. Эти примеры являются скорее иллюстративными, чем ограничивающими. Способы конструирования производных любых из вышеупомянутых бактерий, имеющих определенные генотипы, известны в данной области техники и описаны, например, в Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990). Обычно необходимо выбирать подходящие бактерии, принимая во внимание воспроизводимость репликаона в клетках бактерии. Например, виды *E. coli*, *Serratia* или *Salmonella* можно подходящим образом использовать в качестве хозяина, когда для доставки репликаона используются хорошо известные плазмиды, такие как pBR322, pBR325, pACYC177 или pKN410. Обычно клетка-хозяин должна секретировать минимальные количества протеолитических ферментов, и в культуру клеток по необходимости могут быть включены дополнительные ингибиторы протеаз.

Получение связывающих белков

[252] Клетки-хозяева трансформируют описанными выше векторами экспрессии и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных в соответствии с требованиями для индуцирования промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих требуемые последовательности.

[253] Трансформация означает введение ДНК в прокариотического хозяина так, чтобы ДНК могла реплицироваться либо как внехромосомный элемент, либо за счет

интегрированного в хромосому элемента. В зависимости от используемой клетки-хозяина трансформацию проводят стандартными методиками, подходящими для таких клеток. Обработку кальцием с использованием хлорида кальция обычно применяют для бактериальных клеток, которые содержат крепкие барьеры клеточных стенок. В другом способе трансформации используют полиэтиленгликоль/DMSO. Еще один используемый метод представляет собой электропорацию.

[254] Прокариотические клетки, используемые для получения связывающих белков к CTLA4 по настоящему изобретению, выращивают в средах, известных в данной области техники и подходящих для культивирования выбранных клеток-хозяев. Примеры подходящих сред включают среду Лурия (LB) плюс необходимые питательные добавки. В некоторых вариантах осуществления среда также содержит средство отбора, выбранное на основе конструкции вектора экспрессии, чтобы селективно обеспечивать рост прокариотических клеток, содержащих вектор экспрессии. Например, ампициллин добавляют в среду для роста клеток, экспрессирующих ген устойчивости к ампициллину.

[255] Любые необходимые добавки, помимо источников углерода, азота и неорганического фосфата, также можно включить в соответствующих концентрациях, введенных отдельно или в смеси с другой добавкой или средой, такой как комплексный источник азота. Необязательно культуральная среда может содержать один или несколько восстанавливающих средств, выбранных из группы, состоящей из глутатиона, цистеина, цистамина, тиогликоля, дитиоэритрита и дитиотрептола.

[256] Прокариотические клетки-хозяева культивируют при подходящих температурах. В определенных вариантах осуществления для роста *E. coli* температура роста колеблется от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C; от приблизительно 25°C до приблизительно 37°C, или приблизительно 30°C. Значение pH среды может быть любым в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 9, в зависимости, главным образом, от организма-хозяина. В определенных вариантах осуществления значение pH для *E. coli* составляет от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,4, или приблизительно 7,0.

[257] Если в векторе экспрессии по настоящему изобретению используют индуцируемый промотор, экспрессия белка индуцируется в условиях, подходящих для активации промотора. В одном аспекте настоящего изобретения для контроля транскрипции полипептидов используют промоторы PhoA. Соответственно, трансформированные клетки-хозяева культивируют в среде с ограниченным уровнем фосфатов для индуцирования. В определенных вариантах осуществления среда с ограниченным уровнем фосфатов представляет собой среду C.R.A.P. (см., например, Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). В зависимости от используемой векторной конструкции можно применять множество других индукторов, известных в данной области техники.

[258] В одном варианте осуществления экспрессированные связывающие белки к CTLA4 по настоящему изобретению секретируются в периплазму клеток-хозяев и

извлекаются из нее. Извлечение белка обычно включает разрушение микроорганизма, как правило, такими способами, как осмотический шок, обработка ультразвуком или лизис. После разрушения клеток клеточный дебрис или целые клетки можно удалить центрифугированием или фильтрацией. Белки можно дополнительно очистить, например, с помощью хроматографии на аффинной смоле. В качестве альтернативы белки могут транспортироваться в культуральную среду и выделяться из нее. Клетки можно удалить из культуры, а супернатант культуры отфильтровать и сконцентрировать для дополнительной очистки полученных белков. Экспрессированные полипептиды можно дополнительно выделить и идентифицировать с использованием общеизвестных методов, таких как электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE) и вестерн-блоттинг.

[259] В одном аспекте настоящего изобретения продуцирование связывающего белка к CTLA4 в больших количествах проводят в процессе ферментации. Для получения рекомбинантных белков доступны различные процедуры крупномасштабной периодической ферментации с подпиткой. Крупномасштабная ферментация характеризуется емкостью по меньшей мере 1000 литров и в определенных вариантах осуществления емкостью от приблизительно 1000 до 100000 литров. В этих ферментерах применяют лопастные мешалки для распределения кислорода и питательных веществ, особенно глюкозы. Мелкомасштабная ферментация обычно относится к ферментации в ферментере с объемной емкостью не более чем приблизительно 100 литров и может варьироваться от приблизительно 1 литра до приблизительно 100 литров.

[260] В процессе ферментации индуцирование экспрессии белка обычно начинается после того, как клетки были выращены в подходящих условиях до требуемой плотности, например, OD550 приблизительно 180-220, на этой стадии клетки находятся в ранней стационарной фазе. В зависимости от используемой векторной конструкции можно применять различные индукторы, известные в данной области техники и описанные выше. Перед индуцированием клетки можно выращивать в течение более коротких периодов времени. Клетки обычно индуцируют в течение приблизительно 12-50 часов, хотя можно использовать более длительное или более короткое время индуцирования.

[261] Чтобы улучшить выход продукции и качество полипептидов по настоящему изобретению, можно модифицировать различные условия ферментации. Например, для улучшения правильной сборки и фолдинга секретируемых полипептидов антител можно использовать дополнительные векторы, избыточно экспрессирующие белки-шапероны, такие как белки Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD и/или DsbG) или FkpA (пептидилпролил-цис-транс-изомеразы с шаперонной активностью), для совместной трансформации прокариотических клеток-хозяев. Было продемонстрировано, что белки-шапероны способствуют правильному фолдингу и растворимости гетерологичных белков, вырабатываемых в бактериальных клетках-хозяевах. Chen et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:19601-19605; Georgiou et al., патент США № 6083715; Georgiou et al., патент США № 6027888; Bothmann and Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm and

Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie et al. (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

[262] Чтобы свести к минимуму протеолиз экспрессированных гетерологичных белков (особенно тех, которые чувствительны к протеолизу), в настоящем изобретении можно использовать определенные штаммы-хозяева, дефицитные по протеолитическим ферментам. Например, штаммы клеток-хозяев могут быть модифицированы, чтобы вызвать генетическую(генетические) мутацию(мутации) в генах, кодирующих известные бактериальные протеазы, такие как протеаза III, OmpT, DegP, Tsp, протеаза I, протеаза Mi, протеаза V, протеаза VI и их комбинации. Некоторые штаммы *E. coli* с дефицитом протеазы доступны и описаны, например, в Joly et al. (1998), выше; Georgiou et al., патенте США № 5264365; Georgiou et al., патенте США № 5508192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

[263] В одном варианте осуществления штаммы *E. coli*, дефицитные по протеолитическим ферментам и трансформированные плазмидами, избыточно экспрессирующими один или несколько белков-шаперонов, используют в качестве клеток-хозяев в системе экспрессии по настоящему изобретению.

Очистка связывающих белков

[264] В одном варианте осуществления получаемый в данном документе белок антитела дополнительно очищают с получением препаратов, которые являются практически гомогенными, для дальнейших анализов и путей применения. Можно использовать стандартные способы очистки белков, известные в данной области техники. Следующие процедуры являются примерами подходящих процедур очистки: фракционирование на иммуноаффинных или ионообменных колонках, осаждение этанолом, HPLC с обращенной фазой, хроматография на силикагеле или на катионообменной смоле, такой как DEAE, хроматофокусирование, SDS-PAGE, осаждение сульфатом аммония и гель-фильтрация с использованием, например, Sephadex G-75.

[265] В одном аспекте белок А, иммобилизованный на твердой фазе, используют для иммуноаффинной очистки продуктов антител по настоящему изобретению. Белок А представляет собой белок клеточной стенки размером 41 кДа из *Staphylococcus aureus*, который с высокой аффинностью связывается с Fc-областью антител. Lindmark et al (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. Твердая фаза, на которой иммобилизуют белок А, может быть колонкой, имеющей поверхность из стекла или диоксида кремния, или стеклянной колонкой с регулируемыми порами, или колонкой с кремниевой кислотой. В некоторых случаях колонку покрывают реагентом, например глицерином, чтобы предотвратить неспецифическую адгезию загрязняющих веществ.

[266] В качестве первой стадии очистки препарат, полученный из культуры клеток, как описано выше, можно нанести на твердую фазу с иммобилизованным белком А, чтобы обеспечить специфическое связывание представляющего интерес антитела с белком А. Затем твердую фазу промывают для удаления загрязняющих примесей, неспецифически связанных с твердой фазой. Наконец, представляющее интерес антитело

выделяют из твердой фазы путем элюирования.

10. Получение связывающих белков с применением эукариотических клеток-хозяев [267] Вектор для применения в эукариотической клетке-хозяине обычно включает один или несколько из следующих неограничивающих компонентов: сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

Компонент сигнальной последовательности

[268] Вектор для применения в эукариотической клетке-хозяине может также содержать сигнальную последовательность или другой полипептид, имеющий специфический сайт расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида, представляющего интерес. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность может быть последовательностью, которая распознается и подвергается процессингу (т. е. расщепляется с помощью сигнальной пептидазы) клеткой-хозяином. При экспрессии в клетках млекопитающих доступны сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например, сигнал gD вируса простого герпеса. ДНК для такой области-предшественника лигируют в рамке считывания с ДНК, кодирующей антитело.

Точка начала репликации

[269] Обычно для векторов экспрессии у млекопитающих компонент точки начала репликации не требуется. Например, точку начала SV40 обычно можно использовать только потому, что она содержит ранний промотор.

Компонент гена отбора

[270] Векторы экспрессии и клонирования могут содержать ген отбора, также называемый селективируемым маркером. Типичные гены отбора кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (b) обеспечивают восполнение ауксотрофного дефицита, где это уместно, или (с) обеспечивают поставку необходимых питательных веществ, недоступных из сложных сред.

[271] В одном примере в схеме отбора используют лекарственное средство для остановки роста клетки-хозяина. Те клетки, которые успешно трансформируются гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий устойчивость к лекарственному средству, и, таким образом, выживают в режиме отбора. В примерах такого доминантного отбора используют такие лекарственные средства, как неомицин, микофеноловую кислоту и гигромицин.

[272] Другим примером подходящих селективируемых маркеров для клеток млекопитающих являются маркеры, которые позволяют идентифицировать клетки, способные принимать нуклеиновую кислоту, кодирующую связывающий белок к CTLA4, такие как гены DHFR, тимидинкиназы, металлотioneина-I и -II, металлотioneина приматов, аденозиндезаминазы, орнитиндекарбоксилазы и т. д.

[273] Например, в некоторых вариантах осуществления клетки,

трансформированные геном отбора DHFR, сначала идентифицируют путем культивирования всех трансформантов в культуральной среде, содержащей метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. В некоторых вариантах осуществления подходящей клеткой-хозяином при использовании DHFR дикого типа является линия клеток яичника китайского хомячка (CHO), дефицитная по активности DHFR (например, ATCC CRL-9096).

[274] В качестве альтернативы клетки-хозяева (особенно хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR), трансформированные или котрансформированные последовательностями ДНК, кодирующими связывающий белок к CTLA4, белок DHFR дикого типа и другой селективируемый маркер, такой как аминогликозид-3'-фосфотрансфераза (APH), можно отобрать основываясь на росте клеток в среде, содержащей средство отбора для селективируемого маркера, такое как аминогликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин или G418. См. патент США № 4965199. Клетки-хозяева могут включать NS0, в том числе клеточные линии, дефицитные по глутаминсинтетазе (GS). Способы применения GS в качестве селективируемого маркера для клеток млекопитающих описаны в патенте США № 5122464 и патенте США № 5891693.

Промоторный компонент

[275] Векторы экспрессии и клонирования обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей связывающий белок к CTLA4, представляющий интерес. Промоторные последовательности для эукариот являются известными. Например, практически все эукариотические гены имеют AT-богатую область, расположенную приблизительно на 25-30 оснований выше сайта начала транскрипции. Другая последовательность, обнаруженная на 70-80 оснований выше точки начала транскрипции многих генов, представляет собой область CNCAAT, где N может быть любым нуклеотидом. На 3'-конце большинства эукариотических генов находится последовательность AATAAA, которая может быть сигналом для добавления поли-A-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. В определенных вариантах осуществления любую или все из этих последовательностей можно подходящим образом вставить в эукариотические векторы экспрессии.

[276] Транскрипция векторов в клетках-хозяевах млекопитающих контролируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы птиц, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и обезьяний вирус 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например, промотора гена актина или промотора гена иммуноглобулина, из промоторов генов белков теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клеток-хозяев.

[277] Ранний и поздний промоторы вируса SV40 удобно получать в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит вирусную точку начала

репликации SV40. Непосредственно ранний промотор цитомегаловируса человека удобно получать в виде рестрикционного фрагмента HindIII E. Система для экспрессии ДНК у млекопитающих-хозяев с использованием вируса папилломы крупного рогатого скота в качестве вектора раскрыта в патенте США № 4419446. Модификация этой системы описана в патенте США № 4601978. См. также Reyes et al., *Nature* 297:598-601 (1982), описывающую экспрессию cDNA человеческого β -интерферона в мышинных клетках под контролем промотора тимидинкиназы из вируса простого герпеса. Альтернативно, в качестве промотора можно использовать длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса.

Компонент энхансерного элемента

[278] Транскрипция ДНК, кодирующей антитело по настоящему изобретению, высшими эукариотами часто увеличивается путем вставки энхансерной последовательности в вектор. В настоящее время известно множество энхансерных последовательностей из генов млекопитающих (глобин, эластаза, альбумин, α -фетопротеин и инсулин). Однако обычно используют энхансер из вируса эукариотических клеток. Примеры включают энхансер SV40 участка позднего начала репликации (100-270 п.о.), энхансер раннего промотора цитомегаловируса человека, энхансер раннего промотора цитомегаловируса мыши, энхансер полиомы участка позднего начала репликации и энхансеры аденовируса. См. также Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982), где описаны энхансерные элементы для активации эукариотических промоторов. Энхансер можно сплайсировать в вектор в положении 5' или 3' относительно последовательности, кодирующей полипептид антитела, но обычно он расположен в участке 5' от промотора.

Компонент терминации транскрипции

[279] Векторы экспрессии, используемые в эукариотических клетках-хозяевах, также могут содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации mRNA. Такие последовательности обычно доступны из 5'- и иногда 3'-нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или cDNA. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые как полиаденилированные фрагменты в нетранслируемой части mRNA, кодирующей антитело. Одним из применимых компонентов терминации транскрипции является область полиаденилирования бычьего гормона роста. См. WO94/11026 и раскрытый в ней вектор экспрессии.

Отбор и трансформация клеток-хозяев

[280] Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в векторах в данном документе включают клетки высших эукариот, описанные в данном документе, включая клетки-хозяева позвоночных. Размножение клеток позвоночных в культуре (культуре ткани) стало обычной процедурой. Примерами применимых линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия эмбриональной почки человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре,

Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почки новорожденного хомяка (ВНК, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); мышинные клетки Сертоли (ТМ4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крыс линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4 и линия гепатомы человека (Hep G2).

[281] Клетки-хозяева трансформируют описанными выше векторами экспрессии или клонирования для продуцирования связывающего белка к CTLA4 и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных в соответствии с требованиями для индуцирования промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих требуемые последовательности.

Культивирование клеток-хозяев

[282] Клетки-хозяева, используемые для получения связывающих белков к CTLA4 по настоящему изобретению, можно культивировать в различных средах. Для культивирования клеток-хозяев подходят такие коммерчески доступные среды, как F10 Хэма (Sigma), минимальная питательная среда ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная по Дульбекко среда Игла ((DMEM), Sigma). Кроме того, любую из сред, описанных в Ham et al., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), патентах США №№ 4767704; 4657866; 4927762; 4560655 или 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195 или патенте США Re. 30985, можно использовать в качестве культуральной среды для клеток-хозяев. Любую из этих сред можно при необходимости дополнить гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, соль кальция, соль магния и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как лекарственное средство GENTAMYCIN™), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие добавки также можно включить в соответствующих концентрациях, которые известны специалистам в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и т. п., являются теми, которые ранее использовались с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии, и будут очевидны для специалиста обычной квалификации в данной области техники.

Очистка связывающего белка

[283] При использовании рекомбинантных методов связывающие белки к CTLA4 могут продуцироваться внутриклеточно или непосредственно секретироваться в среду. Если антитело вырабатывается внутриклеточно, на первой стадии частицы дебриса, либо

клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты, можно удалить, например, центрифугированием или ультрафильтрацией. Когда связывающий белок к CTLA4 секретируется в среду, супернатанты из таких систем экспрессии можно сначала сконцентрировать с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрирования белка, например, установки для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. Ингибитор протеаз, такой как PMSF, можно включать на любой из вышеупомянутых стадий для ингибирования протеолиза, и антибиотики можно включать для предотвращения роста случайных загрязняющих примесей.

[284] Композицию антител, полученную из клеток, можно очистить с использованием, например, хроматографии на гидроксилapatите, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, при этом аффинная хроматография является удобной методикой. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изоформа любого Fc-домена иммуноглобулина, присутствующего в антителе. Белок А можно использовать для очистки антител на основе тяжелых цепей $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ человека (Lindmark et al., *J. Immunol. Methods* 62:1-13 (1983)). Белок G рекомендуется для всех изоформ мышей и для $\gamma 3$ человека (Guss et al., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). Матрица, к которой присоединяют аффинный лиганд, может быть агарозой, но доступны и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемыми порами или поли(стиролдивинил)бензол, обеспечивают более высокие скорости потока и более короткое время обработки, чем может быть достигнуто с агарозой. Если антитело содержит домен СН3, для очистки применима смола Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Филлипсбург, Нью-Джерси). Другие методики очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, HPLC с обращенной фазой, хроматография на силикагеле, хроматография на гепарин-SEPHAROSE™, хроматография на анионо- или катионообменной смоле (такой как колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония, также доступны в зависимости от подлежащего извлечению антитела.

[285] После любой стадии(стадий) предварительной очистки смесь, содержащую представляющий интерес связывающий белок и загрязняющие примеси, можно подвергнуть дальнейшей очистке, например, с помощью хроматографии с гидрофобным взаимодействием при низком рН с использованием буфера для элюирования с рН приблизительно 2,5-4,5 при низких концентрациях соли (например, приблизительно 0-0,25 М соли).

[286] В целом, различные методологии получения антител для применения в исследованиях, тестировании и клинической практике хорошо известны в данной области техники, согласуются с вышеописанными методологиями и/или считаются специалистами в данной области техники подходящими для конкретного представляющего интерес антитела.

Композиции

[287] В некоторых аспектах в данном документе также предусмотрены композиции (например, фармацевтическая композиция), содержащие любой из связывающих белков к CTLA4, описанных в данном документе.

[288] Терапевтические составы готовят для хранения путем смешивания активного ингредиента, имеющего требуемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wiklins, Pub., Gennaro Ed., Philadelphia, Pa. 2000). Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, антиоксиданты, в том числе аскорбиновую кислоту, метионин, витамин Е, метабисульфит натрия; консерванты, изотонирующие добавки, стабилизаторы, комплексы металлов (например, Zn-протеиновые комплексы); хелатообразующие средства, такие как EDTA, и/или неионные поверхностно-активные вещества.

[289] Буферы можно использовать для регулирования рН в диапазоне, при котором оптимизируется терапевтическая эффективность, особенно если стабильность зависит от рН. Буферы могут присутствовать в концентрациях в диапазоне от приблизительно 20 мМ до приблизительно 250 мМ. Подходящие буферные средства для применения в настоящем изобретении включают как органические, так и неорганические кислоты и их соли. Например, цитрат, фосфат, сукцинат, тартрат, fumarат, глюконат, оксалат, лактат, ацетат. Кроме того, буферы могут состоять из гистидина и солей триметиламина, таких как Трис.

[290] Консерванты можно добавить для предотвращения роста микробов, и обычно их количество составляет приблизительно 0,2%-1,0% (вес/об.). Подходящие консерванты для применения в настоящем изобретении включают хлорид октадецилдиметилбензиламмония; гексаметония хлорид; галогениды бензалкония (например, хлорид, бромид, йодид), хлорид бензетония; тимеросал, фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол.

[291] Регуляторы тоничности, иногда известные как «стабилизаторы», могут присутствовать для регулирования или поддержания тоничности жидкости в композиции. При использовании с крупными заряженными биомолекулами, такими как белки и антитела, их часто называют «стабилизаторами», поскольку они могут взаимодействовать с заряженными группами боковых цепей аминокислот, тем самым уменьшая возможность меж- и внутримолекулярных взаимодействий. Регуляторы тоничности могут присутствовать в любом количестве от приблизительно 0,1 мас. % до приблизительно 25 мас. % или от приблизительно 1 до приблизительно 5 мас. %, с учетом относительных количеств других ингредиентов. В некоторых вариантах осуществления регуляторы тоничности включают многоатомные сахарные спирты, трехатомные или высшие сахарные спирты, такие как глицерин, эритрит, арабит, ксилит, сорбит и маннит.

[292] Дополнительные вспомогательные вещества включают средства, которые

могут служить в качестве одного или нескольких из следующих: (1) наполнители, (2) усилители растворимости, (3) стабилизаторы и (4) средства, предотвращающие денатурацию или прилипание к стенке контейнера. Такие вспомогательные вещества включают: многоатомные сахарные спирты (перечисленные выше); аминокислоты, такие как аланин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин, лизин, орнитин, лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота, треонин и т. д.; органические сахара или сахарные спирты, такие как сахароза, лактоза, лактит, трегалоза, стахиоза, манноза, сорбоза, ксилоза, рибоза, рибитол, миоинозитола, миоинозитол, галактоза, галактитол, глицерин, циклитолы (например, инозитол), полиэтиленгликоль; серосодержащие восстановители, такие как мочевины, глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин, α -монотиоглицерин и тиосульфат натрия; низкомолекулярные белки, такие как сывороточный альбумин человека, бычий сывороточный альбумин, желатин или другие иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; моносахариды (например, ксилоза, манноза, фруктоза, глюкоза); дисахариды (например, лактоза, мальтоза, сахароза); трисахариды, такие как рафиноза; и полисахариды, такие как декстрин или декстран.

[293] Могут присутствовать неионные поверхностно-активные вещества или детергенты (также известные как «смачивающие средства»), чтобы способствовать солюбилизации терапевтического средства, а также для защиты терапевтического белка от агрегации, вызванной встряхиванием, что также позволяет подвергать состав поверхностному сдвигу, не вызывая денатурации активного терапевтического белка или антитела. Неионные поверхностно-активные вещества присутствуют в диапазоне от приблизительно 0,05 мг/мл до приблизительно 1,0 мг/мл или от приблизительно 0,07 мг/мл до приблизительно 0,2 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления неионные поверхностно-активные вещества присутствуют в диапазоне от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,1% вес/об. или от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1% вес/об. или от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,025% вес/об.

[294] Подходящие неионные поверхностно-активные вещества включают полисорбаты (20, 40, 60, 65, 80 и т. д.), полиоксамеры (184, 188 и т. д.), полиолы PLURONIC®, TRITON®, моноэфиры полиоксиэтиленсорбитана (TWEEN®-20, TWEEN®-80 и др.), лауромакрогол 400, полиоксил 40 стеарат, полиоксиэтиленовое гидрогенизированное касторовое масло 10, 50 и 60, моностеарат глицерина, сложный эфир сахарозы и жирной кислоты, метилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу. Анионные детергенты, которые можно использовать, включают лаурилсульфат натрия, диоктилсульфосукцинат натрия и диоктилсульфонат натрия. Катионные детергенты включают хлорид бензалкония или хлорид бензетония.

[295] Чтобы составы можно было использовать для введения *in vivo*, они должны быть стерильными. Состав можно сделать стерильным путем фильтрации через мембраны для стерилизующей фильтрации. Терапевтические композиции в данном документе обычно помещают в контейнер, имеющий стерильное отверстие для доступа, например,

пакет для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, прокалываемую иглой для подкожных инъекций.

[296] Путь введения соответствует известным и принятым способам, таким как однократный или многократный болюс или инфузия в течение длительного периода времени посредством подходящего способа, например, инъекцией или инфузией подкожным, внутривенным, внутривнутрибрюшинным, внутримышечным, внутриартериальным, внутрь очага поражения или внутрисуставным путем, при местном введении, ингаляцией или с помощью средств замедленного или пролонгированного высвобождения.

[297] Связывающий белок к CTLA4, описанный в данном документе (например, антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент), можно использовать отдельно или в комбинации с другими терапевтическими средствами, такими как в способах, описанных в данном документе. Термин «в комбинации с» охватывает два или более терапевтических средства (например, связывающий белок к CTLA4 и терапевтическое средство), которые включены в один и тот же состав или в отдельные составы. В некоторых вариантах осуществления «в комбинации с» относится к «одновременному» введению, и в этом случае введение связывающего белка к CTLA4 по настоящему изобретению происходит одновременно с введением одного или нескольких дополнительных терапевтических средств (например, в одно и то же время или в течение одного часа между введением (введениями) связывающего белка к CTLA4 и введением одного или нескольких дополнительных терапевтических средств). В некоторых вариантах осуществления «в комбинации с» относится к последовательному введению, и в этом случае введение связывающего белка к CTLA4 по настоящему изобретению происходит до и/или после введения одного или нескольких дополнительных терапевтических средств (например, более одного часа между введением (введениями) связывающего белка к CTLA4 и введением одного или нескольких дополнительных терапевтических средств). Рассматриваемые в данном документе средства включают без ограничения цитотоксическое средство, цитокин, средство, нацеленное на молекулу иммунной контрольной точки, средство, нацеленное на иммуностимулирующую молекулу, или средство, подавляющее рост.

[298] Состав, описанный в данном документе, может также содержать более одного активного соединения, если необходимо для конкретного показания, подлежащего лечению, предпочтительно соединения с дополнительными активностями, которые не влияют отрицательно друг на друга. Альтернативно или дополнительно композиция может содержать цитотоксическое средство, цитокин, средство, нацеленное на молекулу иммунной контрольной точки или стимулирующую молекулу, или средство, подавляющее рост. Такие молекулы обычно присутствуют в комбинации в количествах, эффективных для предполагаемой цели.

Способы лечения

[299] В данном документе предусмотрены способы лечения или предупреждения заболевания у субъекта, включающие введение субъекту эффективного количества

связывающего белка к CTLA4, описанного в данном документе (например, антитела к CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента), или композиций с ним. В некоторых вариантах осуществления у субъекта (например, пациента-человека) диагностировано неопластическое нарушение (например, рак) или существует риск развития такого нарушения.

[300] Для предупреждения или лечения заболевания подходящая дозировка активного средства будет зависеть от типа подлежащего лечению заболевания, как определено выше, тяжести и течения заболевания, от того, вводят ли средство в целях предупреждения или терапевтических целях, от предшествующей терапии, истории болезни субъекта и реакции на средство, а также от усмотрения лечащего врача. Средство подходящим образом вводят субъекту за один раз или в течение серии курсов лечения. В некоторых вариантах осуществления описанных в данном документе способов интервал между введениями описанного связывающего белка к CTLA4 (например, антитела к CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента) составляет приблизительно один месяц или дольше. В некоторых вариантах осуществления интервал между введениями составляет приблизительно два месяца, приблизительно три месяца, приблизительно четыре месяца, приблизительно пять месяцев, приблизительно шесть месяцев или дольше. Как используется в данном документе, интервал между введениями относится к периоду времени между одним введением антитела и следующим введением антитела. Как используется в данном документе, интервал приблизительно один месяц включает четыре недели. В некоторых вариантах осуществления интервал между введениями составляет приблизительно одну неделю, две недели, приблизительно три недели, приблизительно четыре недели, приблизительно восемь недель, приблизительно двенадцать недель, приблизительно шестнадцать недель, приблизительно двадцать недель, приблизительно двадцать четыре недели или дольше. В некоторых вариантах осуществления лечение включает множественные введения антитела, где интервал между введениями может варьироваться. Например, интервал между первым введением и вторым введением составляет приблизительно один месяц, а интервалы между последующими введениями составляют приблизительно три месяца. В некоторых вариантах осуществления интервал между первым введением и вторым введением составляет приблизительно один месяц, интервал между вторым введением и третьим введением составляет приблизительно два месяца, а интервалы между последующими введениями составляют приблизительно три месяца. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к CTLA4 (например, антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент), описанный в данном документе, вводят в фиксированной дозе. В зависимости от типа и тяжести заболевания от приблизительно 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например 0,1 мг/кг-10 мг/кг) антитела может быть начальной дозой-кандидатом для введения пациенту, будь то, например, в одном или нескольких отдельных введениях или в непрерывной инфузии. Одна типичная суточная доза может варьироваться от приблизительно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более в зависимости от факторов, упомянутых выше. В случае повторных введений в течение

нескольких суток или более, в зависимости от состояния, лечение обычно будет продолжаться до тех пор, пока не произойдет требуемое подавление симптомов заболевания. Одна иллюстративная доза антитела будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. Таким образом, пациенту можно вводить одну или несколько доз, составляющих приблизительно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг или 10 мг/кг (или любую их комбинацию). В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к CTLA4 (например, антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент), описанный в данном документе, вводят субъекту в дозировке от приблизительно 25 мг до приблизительно 500 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к CTLA4 (например, антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент), описанный в данном документе, вводят субъекту в дозе от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 1,0 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок к CTLA4 (например, антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент), описанный в данном документе, вводят субъекту в дозе, имеющей любое значение из приблизительно 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3,0 мг/кг, 3,5 мг/кг, 4,0 мг/кг, 4,5 мг/кг, 5,0 мг/кг, 5,5 мг/кг, 6,0 мг/кг, 6,5 мг/кг, 7,0 мг/кг, 7,5 мг/кг, 8,0 мг/кг, 8,5 мг/кг, 9,0 мг/кг, 9,5 мг/кг или 10,0 мг/кг. Можно использовать любую частоту дозирования, описанную выше.

[301] Рассматриваемый в данном документе способ лечения предусматривает лечение нарушения или заболевания с помощью связывающего белка к CTLA4 (например, антитела к CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента), описанного в данном документе. Нарушения или заболевания, которые поддаются лечению составами по настоящему изобретению, включают лейкоз, лимфому, рак головы и шеи, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, меланому, рак молочной железы, нейробластому, рак легкого, рак яичника, остеосаркому, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак печени, рак почки, рак кожи (например, карциному из клеток Меркеля) или рак яичка.

[302] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен способ лечения или предупреждения рака путем введения связывающего белка к CTLA4 (например, антитела к CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента), описанного в данном документе. Используемый в данном документе термин «рак» относится ко всем типам рака, новообразований или злокачественных опухолей, обнаруживаемых у млекопитающих, включая виды лейкоза, лимфомы, меланомы, нейроэндокринные опухоли, виды карциномы и саркомы. Иллюстративные виды рака, которые можно подвергать лечению с помощью связывающего белка к CTLA4 (например, антитела к CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента), фармацевтической композиции или способа, предусмотренных в данном документе, включают лимфому, саркому, рак мочевого пузыря, рак кости, опухоль головного мозга, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, рак почки, миелому, рак

щитовидной железы, лейкоз, рак предстательной железы, рак молочной железы (например, тройной отрицательный, ER-положительный, ER-отрицательный, резистентный к химиотерапии, резистентный к герцептину, HER2-положительный, резистентный к доксорубину, резистентный к тамоксифену, протоковую карциному, лобулярную карциному, первичный, метастатический), рак яичника, рак поджелудочной железы, рак печени (например, гепатоцеллюлярную карциному), рак легкого (например, немелкоклеточную карциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, аденокарциному, крупноклеточную карциному легкого, мелкоклеточную карциному легкого, карциноид, саркому), мультиформную глиобластому, глиому, меланому, рак предстательной железы, устойчивый к кастрации рак предстательной железы, рак молочной железы, тройной отрицательный рак молочной железы, глиобластому, рак яичника, рак легкого, плоскоклеточный рак (например, головы, шеи или пищевода), колоректальный рак, лейкоз, острый миелоидный лейкоз, лимфому, В-клеточную лимфому или множественную миелому. Дополнительные примеры включают рак щитовидной железы, эндокринной системы, головного мозга, молочной железы, шейки матки, толстой кишки, головы и шеи, пищевода, печени, почки, легкого, немелкоклеточный легкого, меланому, мезотелиому, яичника, саркому, желудка, матки или медуллобластому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, нейробластому, глиому, мультиформную глиобластому, рак яичника, рабдомиосаркому, первичный тромбоцитоз, первичную макроглобулинемию, первичные опухоли головного мозга, рак, злокачественную инсулиному поджелудочной железы, злокачественный карциноид, рак мочевого пузыря, предраковые поражения кожи, рак яичка, лимфомы, рак щитовидной железы, нейробластому, рак пищевода, рак мочеполовой системы, злокачественную гиперкальциемию, рак эндометрия, рак коры надпочечников, неоплазии эндокринной или экзокринной части поджелудочной железы, медулярный рак щитовидной железы, медулярную карциному щитовидной железы, меланому, колоректальный рак, папиллярный рак щитовидной железы, гепатоцеллюлярную карциному, рак соска молочной железы Педжета, филоидные цистосаркомы, лобулярную карциному, протоковую карциному, рак звездчатых клеток поджелудочной железы, рак звездчатых клеток печени или рак предстательной железы.

[303] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен способ лечения или предупреждения лейкоза путем введения связывающего белка к CTLA4 (например, антитела к CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента), описанного в данном документе. Термин «лейкоз» в широком смысле относится к прогрессирующим злокачественным заболеваниям кроветворных органов и обычно характеризуется нарушенной пролиферацией и развитием лейкоцитов и их предшественников в крови и костном мозге. Клинически лейкоз обычно классифицируют на основании (1) продолжительности и характера заболевания - острый или хронический; (2) типа вовлеченной клетки: миелоидный (миелогенный), лимфоидный (лимфогенный) или моноцитарный; и (3) увеличения или отсутствия увеличения количества аномальных

клеток в крови - лейкемический или алейкемический (сублейкемический). Примеры видов лейкоза, которые можно лечить с помощью соединения, фармацевтической композиции или способа, предусмотренных в данном документе, включают, 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, бластно-клеточный лейкоз, лейкоз крупного рогатого скота, хронический миелоцитарный лейкоз, гематодермию, эмбриональный лейкоз, эозинофильный лейкоз, лейкоз Гросса, лейкоз ворсистых клеток, гемобластный лейкоз, гемоцитобластный лейкоз, гистиоцитарный лейкоз, лейкоз стволовых клеток, острый моноцитарный лейкоз, лейкопенический лейкоз, лимфолейкоз, лимфобластный лейкоз, лимфоцитарный лейкоз, лимфогенный лейкоз, лимфоидный лейкоз, лимфосаркома-клеточный лейкоз, лейкоз тучных клеток, мегакариоцитарный лейкоз, микромиелобластный лейкоз, моноцитарный лейкоз, миелобластный лейкоз, миелоцитарный лейкоз, миелоидный гранулоцитарный лейкоз, миеломоноцитарный лейкоз, лейкоз Негели, лейкоз плазматических клеток, множественную миелому, плазмоцитарный лейкоз, промиелоцитарный лейкоз, лейкоз клеток Ридера, лейкоз Шиллинга, лейкоз стволовых клеток, сублейкемический лейкоз или лейкоз недифференцированных клеток.

[304] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен способ лечения или предупреждения саркомы путем введения связывающего белка к CTLA4 (например, антитела к CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента), описанного в данном документе. Термин «саркома» обычно относится к опухоли, которая состоит из вещества, подобного эмбриональной соединительной ткани, и обычно состоит из плотно упакованных клеток, заключенных в фибриллярное или гомогенное вещество. Саркомы, которые можно лечить с помощью соединения, фармацевтической композиции или способа, предусмотренных в данном документе, включают хондросаркому, фибросаркому, лимфосаркому, меланосаркому, миксосаркому, остеосаркому, саркому Абемети, саркому жировой ткани, липосаркому, альвеолярную саркому мягких тканей, амелобластосаркому, ботриоидную саркому, хлорому, хориокарциному, эмбриональную саркому, опухоль Вильмса, саркому эндометрия, стромальную саркому, саркому Юинга, фасциальную саркому, фибробластическую саркому, гигантоклеточную саркому, гранулоцитарную саркому, саркому Ходжкина, идиопатическую множественную геморрагическую саркому, иммунобластную саркому В-клеток, лимфому, иммунобластную саркому Т-клеток, саркому Йенсена, саркому Капоши, саркому из клеток Купфера, ангиосаркому, лейкосаркому, злокачественную мезенхимому, оссифицирующую периостальную саркому, ретикулоцитарную саркому, саркому Рауса, листовидную цистосаркому, синовиальную саркому или остеогенную саркому с сосудистым компонентом.

[305] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен

способ лечения или предупреждения меланомы путем введения связывающего белка к CTLA4 (например, антитела к CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента), описанного в данном документе. Термин «меланома» означает опухоль, возникающую из меланоцитарной системы кожи и других органов. Виды меланомы, которые можно лечить с помощью соединения, фармацевтической композиции или способа, предусмотренных в данном документе, включают, например, акрально-лентигозную меланому, амеланотическую меланому, доброкачественную ювенильную меланому, меланому Клаудмана, меланому S91, меланому Хардинга-Пасси, ювенильную меланому, меланому типа злокачественного лентиго, злокачественную меланому, нодулярную меланому, подногтевую меланому или поверхностно распространяющуюся меланому.

[306] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен способ лечения или предупреждения карциномы путем введения связывающего белка к CTLA4 (например, антитела к CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента), описанного в данном документе. Термин «карцинома» относится к злокачественному новообразованию, состоящему из эпителиальных клеток, которые имеют тенденцию проникать в окружающие ткани и вызывать метастазы. Примеры карцином, которые можно лечить с помощью соединения, фармацевтической композиции или способа, предусмотренных в данном документе, включают, например, медуллярную карциному щитовидной железы, семейную медуллярную карциному щитовидной железы, ацинарную аденокарциному, аденокарциному, аденокистозную карциному, железисто-кистозную карциному, железисто-кистозную карциному, карциному коры надпочечников, альвеолярную карциному, альвеолярно-клеточную карциному, базально-клеточную карциному, базально-клеточную карциному, базалоидную карциному, базальную плоскоклеточную карциному, бронхоальвеолярную карциному, бронхиолярную карциному, бронхогенную карциному, церебриформную карциному, холангиоцеллюлярную карциному, хорионическую карциному, коллоидную карциному, карциному комедонного типа, карциному тела матки, крибриформную карциному, метастатическую форму рака молочной железы, рак кожи, цилиндрическую карциному, карциному цилиндрических клеток, карциному протоков, протоковую карциному, твердую карциному, эмбриональную карциному, энцефалоидную карциному, эпидермоидную карциному, аденоидную эпителиальную карциному, экзофитную карциному, рак из язвы, фиброзную карциному, желатинозную карциному, студенистую карциному, гигантоклеточную карциному, гигантоклеточную карциному, железистый рак, гранулезоклеточную карциному, базально-клеточную эпителиому, гематоидную карциному, гепатоцеллюлярную карциному, карциному из клеток Гюртля, гиалинизирующую карциному, гипернефроидную карциному, инфантильную эмбриональную карциному, карциному *in situ*, внутриэпидермальную карциному, интраэпителиальную карцином, карциному Кромпечера, карциному из клеток Кульчицкого, крупноклеточную карциному, карциному хрусталика, карциному хрусталика, липоматозную карциному, лобулярную карциному, лимфоэпителиальную

карциному, медуллярную карциному, медуллярный рак, меланотическую карциному, мягкую карциному, слизеобразующую карциному, мукоидный рак, мукоцеллюлярную карциному, мукоэпидермоидную карциному, карциному слизистой оболочки, слизистую карциному, миксоматодную карциному, карциному носоглотки, мелкоклеточную карциному, оссифицирующую карциному, остеоидную карциному, папиллярную карциному, перипортальную карциному, преинвазивную карциному, эпидермоидный рак, коллоидный рак, почечно-клеточную карциному почки, карциному резервных клеток, саркомоподобный рак, карциному слизистой оболочки синуса, фиброзную карциному, карциному мошонки, перстневидно-клеточную карциному, недифференцированный рак, мелкоклеточную карциному, соланоидную карциному, сфероидно-клеточную карциному, саркоматоидную карциному, губчатый рак, плоскоклеточную карциному, плоскоклеточный рак, волокнистую карциному, остеогенную карциному, карциному с кожными метастазами при раке молочной железы, переходно-клеточную карциному, клубневидную карциному, тубулярную карциному, туберозный рак, бородавчатый рак или ворсинчатую карциному.

[307] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен способ лечения или предупреждения метастатического рака путем введения связывающего белка к CTLA4 (например, антитела к CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента), описанного в данном документе. Используемые в данном документе термины «метастаз», «метастатический» и «метастатический рак» могут использоваться взаимозаменяемо и относятся к распространению неопластического заболевания или нарушения, например рака, из одного органа или другого несмежного органа или части тела. Рак возникает в исходном участке, например, в молочной железе, который называется первичной опухолью, например, первичным раком молочной железы. Некоторые раковые клетки в первичной опухоли или исходном участке приобретают способность проникать и внедряться в окружающие нормальные ткани в локальной области и/или способность проникать через стенки лимфатической системы или сосудистой системы, циркулируя по системе в другие участки и ткани тела. Вторая клинически обнаруживаемая опухоль, образованная из раковых клеток первичной опухоли, называется вторичной или метастатической опухолью. При метастазировании раковых клеток предполагается, что метастатическая опухоль и ее клетки подобны таковым в исходной опухоли. Таким образом, если рак легкого метастазирует в молочную железу, вторичная опухоль в участке молочной железы состоит из аномальных клеток легкого, а не из аномальных клеток молочной железы. Вторичная опухоль в молочной железе относится к метастатическому раку легкого. Таким образом, фраза метастатический рак относится к заболеванию, при котором субъект имеет или имел первичную опухоль и имеет одну или несколько вторичных опухолей. Фразы неметастатический рак или субъекты с раком, который не является метастатическим, относятся к заболеваниям, при которых у субъектов есть первичная опухоль, но нет одной или нескольких вторичных опухолей. Например, метастатический рак легкого относится к

заболеванию у субъекта с первичной опухолью легкого или с историей первичной опухоли легкого и с одной или несколькими вторичными опухолями во втором или нескольких местоположениях, например, в молочной железе.

[308] В некоторых вариантах осуществления заболевания или нарушения, при которых могут принести пользу связывающие белки к CTLA4, описанные в данном документе, включают заболевание (например, диабет, рак (например, рак предстательной железы, рак почки, метастатический рак, меланому, устойчивый к кастрации рак предстательной железы, рак молочной железы, тройной отрицательный рак молочной железы, глиобластому, рак яичника, рак легкого, плоскоклеточный рак (например, головы, шеи или пищевода), колоректальный рак, лейкоз, острый миелоидный лейкоз, лимфому, В-клеточную лимфому или множественную миелому)), вызванное (полностью или частично) CTLA4 или активностью или функцией CTLA4, или симптом данного заболевания, вызванный (полностью или частично) CTLA4 или активностью или функцией CTLA4.

[0101] VI. Промышленные изделия или наборы

[309] В другом аспекте в данном документе предусмотрено промышленное изделие или набор, который содержит связывающий белок к CTLA4 (например, антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент), описанный в данном документе. Промышленное изделие или набор могут дополнительно содержать инструкции по применению связывающих белков в способах по настоящему изобретению. Таким образом, в определенных вариантах осуществления промышленное изделие или набор содержат инструкции по применению связывающего белка к CTLA4 (например, антитела к CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента) в способах лечения или предупреждения нарушения (например, рака) у индивидуума, включающих введение индивидууму эффективного количества связывающего белка к CTLA4 (например, антитела к CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента). В определенных вариантах осуществления индивидуум является человеком. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет заболевание, выбранное из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы, рака головы и шеи, колоректального рака, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, меланомы, рака молочной железы, нейробластомы, рака легкого, рака яичника, остеосаркомы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака печени, рака почки, рака кожи или рака яичка.

[310] Промышленное изделие или набор могут дополнительно содержать контейнер. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы (например, двухкамерные флаконы), шприцы (например, одно- или двухкамерные шприцы) и пробирки. Контейнер может быть изготовлен из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит состав. В некоторых вариантах осуществления состав представляет собой лиофилизированный состав.

[311] Промышленное изделие или набор могут дополнительно содержать этикетку или листок-вкладыш, который находится на контейнере или связан с ним, может

отображать инструкции по восстановлению и/или применению состава. Этикетка или листок-вкладыш могут дополнительно указывать, что состав применим или предназначен для подкожного, внутривенного или других способов введения для лечения или предупреждения нарушения (например, рака) у индивидуума. Контейнер, содержащий состав, может быть флаконом для одноразового применения или флаконом для многократного применения, который позволяет многократно вводить восстановленный состав. Промышленное изделие или набор могут дополнительно содержать второй контейнер, содержащий подходящий разбавитель. Промышленное изделие или набор могут дополнительно включать другие материалы, необходимые с коммерческой, терапевтической и пользовательской точек зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковки с инструкциями по применению.

[312] В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает наборы для получения дозы для однократного приема. Такие наборы содержат контейнер с водным составом терапевтического антитела, включая как одно-, так и многокамерные предварительно заполненные шприцы. Иллюстративные предварительно заполненные шприцы доступны от Vetter GmbH, Равенсбург, Германия.

[313] Промышленное изделие или набор в данном документе необязательно дополнительно включает контейнер, содержащий второй лекарственный препарат, где связывающий белок к CTLA4 (например, антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент) является первым лекарственным препаратом, и это изделие или набор дополнительно содержат инструкции на этикетке или вкладыше к упаковке для лечения субъекта вторым лекарственным препаратом в эффективном количестве.

[314] В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрено промышленное изделие или набор, содержащие составы, описанные в данном документе, для введения в автоматическом инъекторе. Автоматический инъектор можно описать как инъекционное устройство, которое после активации доставит свое содержимое без дополнительных необходимых действий со стороны пациента или администратора. Они особенно подходят для самостоятельного лечения терапевтическими составами, когда скорость доставки должна быть постоянной, а время доставки превышает несколько секунд.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[315] Среди предусмотренных иллюстративных вариантов осуществления представлены следующие.

1. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен тяжелой цепи (VH), где:

VL-домен содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3; и/или VH-домен содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную

последовательность под SEQ ID NO: 5, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; или

VL-домен содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15; и/или VH-домен содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18; или

VL-домен содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9; и/или VH-домен содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12; или

VL-домен содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21; и/или VH-домен содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

2. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, где:

VL-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 25, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26; или

VL-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 30, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 31.

3. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, где:

VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25, а VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26; или

VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30, а VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

4. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен тяжелой цепи (VH), где:

VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25 и/или VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26; или

VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30 и/или VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

5. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-4, где VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25 и VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26.

6. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-4, где VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30 и VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

7. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константный домен тяжелой цепи (CH).

8. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность CH, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35-38.

9. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 7 или 8, где CH содержит аминокислотные замены S239D или I332E или обе, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом согласно Kabat.

10. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность CH под SEQ ID NO: 38.

11. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-10, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константный домен легкой цепи (CL).

12. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-11, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность CL под SEQ ID NO: 39.

13. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-12, где:

легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27 и тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29; или

легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32 и тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

14. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29.

15. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

16. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-15, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются афукозилированными или дефицитными по фукозе.

17. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-16, где антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы со средством.

18. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 17, где средство является ингибитором полимеризации тубулина, повреждающим ДНК средством или ингибитором синтеза ДНК.

19. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 17, где средство представляет собой майтанзиноид, ауристин, димер пирролобензодиазепина (PBD), калихеамицин, дуокармицин, димер индолинобензодиазепина или производное экзатекана Dxd.

20. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие

1) легкую цепь и тяжелую цепь первой пары, которая специфически связывается с CTLA4;

2) легкую цепь и тяжелую цепь второй пары, которая специфически связывается с антигеном; где легкая цепь первой пары содержит VL-домен и тяжелая цепь первой пары содержит VH-домен, и где:

VL-домен содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3; и/или VH-домен содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; или

VL-домен содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15; и/или VH-домен содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную

последовательность под SEQ ID NO: 17, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18; или

VL-домен содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9; и/или VH-домен содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12; или

VL-домен содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21; и/или VH-домен содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

21. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 20, где:

VL-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 25, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26; или

VL-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 30, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 31.

22. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 20 или 21, где:

VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25, а VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26; или

VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30, а VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

23. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие

1) легкую цепь и тяжелую цепь первой пары, которая специфически связывается с CTLA4;

2) легкую цепь и тяжелую цепь второй пары, которая специфически связывается с антигеном; где легкая цепь первой пары содержит VL-домен и тяжелая цепь первой пары содержит VH-домен, и где:

VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25 и/или VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26; или

VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30 и/или VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

24. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 20-23, где VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25 и VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26.

25. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 20-23, где VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30 и VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

26. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 20-25, где биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константный домен тяжелой цепи (CH).

27. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 20-26, где биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность CH, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35-38.

28. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 26 или 27, где CH содержит аминокислотные замены S239D или I332E или обе, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом согласно Kabat.

29. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 20-28, где биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность CH под SEQ ID NO: 38.

30. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 20-29, где биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константный домен легкой цепи (CL).

31. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 20-30, где биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность CL под SEQ ID NO:39.

32. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 20-31, где:

легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:27 и тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:29; или

легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32 и тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

33. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее

1) легкую цепь и тяжелую цепь первой пары, которая специфически связывается с CTLA4;

2) легкую цепь и тяжелую цепь второй пары, которая специфически связывается с антигеном; где первая пара содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29.

34. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее

1) легкую цепь и тяжелую цепь первой пары, которая специфически связывается с CTLA4;

2) легкую цепь и тяжелую цепь второй пары, которая специфически связывается с антигеном; где первая пара содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

35. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 20-34, где биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются афукозилированными или дефицитными по фукозе.

36. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 20-35, где биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы со средством.

37. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 36, где средство является ингибитором полимеризации тубулина, повреждающим ДНК средством или ингибитором синтеза ДНК.

38. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 36, где средство представляет собой майтанзиноид, ауристатин, димер пирролобензодиазепина (PBD), калихеамицин, дуокармицин, димер индолинобензодиазепина или производное экзатекана Dxd.

39. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-19 или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 20-38.

40. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 39.

41. Клетка-хозяин, содержащая антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-19, биспецифическое антитело или

его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 20-38 или нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 39.

42. Клетка-хозяин по варианту осуществления 41, где клетка-хозяин способна продуцировать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые являются афукозилированными или дефицитными по фукозе.

43. Клетка-хозяин по варианту осуществления 41 или 42, где клетка-хозяин характеризуется нокаутом по альфа-1,6-фукозилтрансферазе (Fut8).

44. Клетка-хозяин по любому из вариантов осуществления 41-43, где клетка-хозяин избыточно экспрессирует β 1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnT-III).

45. Клетка-хозяин по любому из вариантов осуществления 41-44, где клетка-хозяин избыточно экспрессирует μ -маннозидазу I (ManII) аппарата Гольджи.

46. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из вариантов осуществления 41-45 в условиях, которые обеспечивают получение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

47. Способ получения афукозилированного или дефицитного по фукозе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из вариантов осуществления 42-45 в условиях, которые обеспечивают получение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

48. Способ по любому из вариантов осуществления 43-45, дополнительно включающий выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, продуцируемых клеткой-хозяином.

49. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полученные посредством способа по любому из вариантов осуществления 46-48.

50. Композиция, содержащая антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-19, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 20-38 или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 49.

51. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-19, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 20-38 или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 49 и фармацевтически приемлемый носитель.

52. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-19, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 20-38 или его антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 49 и фармацевтически приемлемый носитель для применения при лечении или предупреждении неопластического заболевания у субъекта.

53. Применение фармацевтической композиции, содержащей антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-19, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 20-38 или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 49 и фармацевтически приемлемый носитель при изготовлении лекарственного препарата для лечения или предупреждения неопластического заболевания у субъекта.

54. Набор, содержащий антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-19, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 20-38 или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 49.

55. Способ лечения или предупреждения неопластического заболевания у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела к CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-19, биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 20-38, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по варианту осуществления 49 или композиции по любому из вариантов осуществления 50-52.

ПРИМЕРЫ

[316] Настоящее изобретение будет более полно понято при ссылке на следующие примеры. Однако их не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения. Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном документе, предназначены только для иллюстративных целей, и что различные модификации или изменения в свете их будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в сущность и область действия настоящей заявки и объем прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1. Характеристика связывания *in vitro* антител к CTLA4 с CTLA4: ELISA и SPR для связывания антигена с низкой плотностью

[317] Связывание между иллюстративными антителами к CTLA4 и вариантами с CTLA4 или Fc γ RIIIa (CD16a) оценивали с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) или поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Способы

Антитела

[318] Тестируемыми антителами были гуманизированные антитела к CTLA4, называемые антитело 1 и антитело 2, и их варианты/формы/версии. В соответствии с конкретной схемой нумерации антитело 1 содержит переменную область легкой цепи с CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:1, CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:2, и CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, и содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR-H1, содержащую

аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:4, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:5, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6. В соответствии со схемой нумерации согласно Kabat антитело 1 содержит переменную область легкой цепи с CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:7, CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:8, и CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9, и содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:10, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:11, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12. В соответствии с конкретной схемой нумерации антитело 2 содержит переменную область легкой цепи с CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:13, CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:14, и CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, и содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:16, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:17, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18. В соответствии со схемой нумерации согласно Kabat антитело 2 содержит переменную область легкой цепи с CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:19, CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:20, и CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21, и содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:22, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:23, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24. Были созданы и оценены различные формы антитела 1, например, содержащие определенные мутации в Fc-доме или афукозилированные версии, каждая из которых имеет номенклатуру «антитело 1-#», а также были созданы и оценены различные формы антитела 2, например, содержащие определенные мутации в Fc-доме, или афукозилированные версии, каждая из которых имеет номенклатуру «антитело 2-#».

ELISA

[319] Все ELISA выполняли способом, по существу аналогичным описанию ниже или в целом совместимым со способами, известными в данной области техники. 96-луночные микропланшеты из полистирена (Fisher № 07-200-591) покрывали человеческим CTLA4-Fc (R&D № 7268-CT) по 1 мкг/мл на лунку и хранили в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали с помощью 0,05% Tween в TBS (TBS-T), блокировали с помощью 1% BSA (Sigma Aldrich № B4287-25G) и промывали с помощью TBS-T. Серийные разведения образцов, содержащих антитела к CTLA4, описанные выше, делали в буфере

для анализа (PBS+0,05% Tween+1% BSA), добавляли в планшет и встряхивали на орбитальном шейкере при 100 об./мин. при комнатной температуре в течение одного часа. После промывки с помощью TBS-T антитело к легкой каппа-цепи человека [клон: SB81a]-HRP (Abcam № ab79115), разведенное до 1:8000 в буфере для анализа, вносили в лунки и встряхивали при комнатной температуре в течение одного часа. Планшеты промывали с помощью TBS-T, на планшет наносили субстрат HRP (хемилюминесцентный субстрат Super Signal Pico, Thermo № 37069) и регистрировали люминесценцию с использованием спектрофотометра (BioTek). Данные анализировали с помощью GraphPad Prism.

SPR

[320] Все анализы поверхностного плазмонного резонанса (SPR) выполняли способом, по существу аналогичным описанию ниже или в целом совместимым со способами, известными в данной области техники. SPR выполняли на определенных антителах для оценки связывания между антителом или его фрагментом и целевым белком, таким как CTLA4 человека (huCTLA4), CTLA4 яванского макака (супоCTLA4) или FcγRIIIa (CD16a). В некоторых исследованиях были проводили анализ SPR для проверки связывания определенных антител, например антитела 2-6 (версия антитела 2, имеющего мутацию S239D, мутацию I332E в Fc-области), и антитела к CTLA4 ипилимумаба с человеческим CTLA4. В некоторых исследованиях проводили анализ SPR для проверки связывания определенных антигенсвязывающих фрагментов, например Fab антител, таких как антитело 2 и ипилимумаб, с рекомбинантным человеческим CTLA4 (rhCTLA4). В некоторых исследованиях проводили анализ SPR для проверки связывания определенных антигенсвязывающих фрагментов, например Fab антител, таких как антитело 2 и ипилимумаб, с Fc-CTLA4 яванского макака. Анализ SPR выполняли на приборе GE Biacore T200 при 37°C. Антитело и изотипический контроль (канал эталона) связывали на уровне иммобилизации 100 RU с чипом CM5 (GE Healthcare). Пептиды синтезировали и разводили в подвижном буфере HBS-EP+ (GE Healthcare). Данные связывания анализировали с использованием программного обеспечения Biacore Evaluation Software, версия 3,0.

Результаты

ELISA

[321] На **фиг. 1А** и **фиг. 1В** показаны результаты исследований связывания, оцененных с помощью ELISA, с гуманизированными антителами к CTLA4, антителом 1 и антителом 2 или их вариантами, как описано выше, с CTLA-Fc человека. На **фиг. 1А** показано отсутствие заметной разницы между связыванием версии антитела 1, имеющей Fc-область дикого типа (антитело 1-1), и версии антитела 1, имеющей мутацию S239D и мутацию I332E в Fc-области (антитело 1-2), с человеческим CTLA4-Fc. На **фиг. 1В** сравнивается связывание CTLA4 различными формами антитела 2, включая версию антитела 2, имеющую Fc-область дикого типа (антитело 2-1), версию антитела 2, имеющую мутацию S239D и мутацию I332E в Fc-области (антитело 2-2), версию антитела 2, имеющую мутацию S239D, мутацию I332E в Fc-области и две мутации шарнирной

области (антитело 2-3), версию антитела 2, имеющую мутации S239D, I332E и A330L в Fc-области (антитело 2-4), и версию антитела 2, имеющую мутации S239D, I332E, A330L в Fc-области и две мутации шарнирной области (антитело 2-5). Как показано на **фиг. 1B**, все формы антител связывались с человеческим CTLA4-Fc сходным образом. Средние значения EC₅₀ для тестируемых антител представлены в **таблице 2** ниже.

Таблица 2.

Связывание антитела с человеческим CTLA4-Fc		
Антитело	EC50 (нМ)	R²
Антитело 1-1	0,32 ± 0,01	0,9984
Антитело 1-2	0,32 ± 0,01	0,998
Антитело 2-1	0,44 ± 0,02	0,9978
Антитело 2-2	0,39 ± 0,01	0,9979
Антитело 2-3	0,40 ± 0,02	0,9967
Антитело 2-4	0,40 ± 0,02	0,9962
Антитело 2-5	0,41 ± 0,02	0,9968

[322] На **фиг. 1C-1E** показаны результаты исследований связывания, оцененных с помощью ELISA, с гуманизированными антителами к CTLA4: антитело 1, антитело 2 или ипилимумаб или их варианты, содержащие мутации в Fc-области, или афукозилированные версии, с CTLA-Fc человека. Средние значения EC₅₀ для тестируемых антител представлены на соответствующих фигурах. На **фиг. 1C** показано отсутствие заметной разницы между связыванием версии антитела 1, имеющей Fc-область дикого типа (антитело 1-1), версии антитела 1, имеющей мутацию S239D и мутацию I332E в Fc-области (антитело 1-2), и афукозилированной версии антитела 1 (антитело 1-aFuc) с человеческим CTLA4-Fc. На **фиг. 1D** показано отсутствие заметной разницы между связыванием версии антитела 2, имеющей Fc-область дикого типа (антитело 2-1), версии антитела 2, имеющей мутацию S239D и мутацию I332E в Fc-области (антитело 2-6) ,и афукозилированной версии антитела 2 (антитело 2-aFuc) с человеческим CTLA4-Fc. На **фиг. 1E** показано отсутствие заметной разницы между связыванием версии ипилимумаба, имеющей Fc-область дикого типа (ипилимумаб), и версии ипилимумаба, имеющей мутацию S239D и мутацию I332E в Fc-области (ипилимумаб-m), и фукозилированной версии ипилимумаба (ипилимумаб-aFuc) с человеческим CTLA4-Fc. Как показано на **фиг. 1C-1E** все варианты каждого антитела связывались с человеческим CTLA4-Fc сходным образом.

SPR

[323] На **фиг. 2A** показаны результаты анализа SPR, демонстрирующие связывание между антителом 2-6 (версия антитела 2, имеющая мутацию S239D, мутацию I332E в Fc-

области) или ипилимумабом и человеческим CTLA4 (huCTLA4) при 32 нМ, 16 нМ, 8 нМ, 4 нМ и 2 нМ. На **фиг. 2В** обобщены результаты связывания, представленного на **фиг. 2А** в соответствии с константой скорости ассоциации (k_a), константой скорости диссоциации (k_d) и константой равновесной диссоциации (K_D), а также кратностью различия между антителом 2-6 и ипилимумабом. Как показано на **фиг. 2В**, антитело 2-6 имеет K_D 91 пМ, в то время как ипилимумаб имеет K_D 1640 пМ, что демонстрирует, что антитело 2-6 имеет примерно в 18 раз большую аффинность связывания с huCTLA4, чем ипилимумаб, как измерено с помощью K_D . Анализ SPR связывания между антителом 2-6 и CTLA4 яванского макака показал K_D 131 пМ.

[324] На **фиг. 2С** показаны результаты анализа SPR, демонстрирующие связывание между Fab ипилимумаба (ипилимумаб-Fab) или Fab антитела 2 (антитело 2-Fab) и rhCTLA4-Fc при 32 нМ, 16 нМ, 8 нМ, 4 нМ и 2 нМ. На **фиг. 2D** обобщены результаты связывания, представленного на **фиг. 2С** в соответствии с константой скорости ассоциации (k_a), константой скорости диссоциации (k_d), а также константой равновесной диссоциации (K_D) и значением χ^2 . Как показано на **фиг. 2D**, ипилимумаб-Fab имеет значение K_D 4,74 нМ, в то время как антитело 2-Fab имеет значение K_D 4,53 пМ, что демонстрирует, что антитело 2-Fab имеет гораздо большую аффинность связывания с rhCTLA4-Fc, чем ипилимумаб-Fab, как измерено с помощью K_D . Дополнительные данные по аффинности связывания между rhCTLA4-Fc и ипилимумаб-Fab или антителом 2-Fab представлены ниже в **таблице 3**, в которой показана средняя K_D 5,71 +/- 0,87 нМ для ипилимумаба-Fab и средняя K_D 3,86 +/- 2,1 пМ для антитела 2-Fab.

Таблица 3

Канал	Образец	k_a (1/(M*s))	k_d (1/c)	K_D	χ^2
Ch1	Ипилимумаб-Fab	2,45e+5	1,40e-3	4,74 нМ	1,40
Ch2	Ипилимумаб-Fab	2,17e+5	1,40e-3	6,43 нМ	4,83
Ch3	Ипилимумаб-Fab	2,18e+5	1,30e-3	5,97 нМ	5,48
	Ипилимумаб-Fab			5,71 +/- 0,87 нМ (среднее)	
Ch1	Антитело 2-Fab	3,61e+5	1,63e-6	4,53 пМ	2,85
Ch2	Антитело 2-Fab	3,45e+5	5,19e-7	1,51 пМ	1,66
Ch3	Антитело 2-Fab	3,31e+5	1,84e-6	5,55 пМ	3,03
	Антитело 2-Fab			3,86 +/- 2,1 пМ (среднее)	

[325] На **фиг. 2Е** показаны результаты анализа SPR, демонстрирующие связывание между Fab ипилимумаба (ипилимумаб-Fab) или Fab антитела 2 (антитело 2-Fab) и CTLA4-Fc яванского макака при 32 нМ, 16 нМ, 8 нМ, 4 нМ и 2 нМ. На **фиг. 2F** обобщены результаты связывания, представленного на **фиг. 2Е** в соответствии с константой

скорости ассоциации (k_a), константой скорости диссоциации (k_d), а также константой равновесной диссоциации (K_D) и значением Chi^2 . Как показано на **фиг. 2F**, ипилимумаб-Fab имеет значение K_D 28,6 нМ, в то время как антитело 2-Fab имеет значение K_D 0,623 нМ, что демонстрирует, что антитело 2-Fab имеет гораздо большую аффинность связывания с CTLA4-Fc яванского макака, чем ипилимумаб-Fab, как измерено с помощью K_D . Дополнительные данные по аффинности связывания между CTLA4-Fc яванского макака и ипилимумаб-Fab или антителом 2-Fab представлены ниже в **таблице 4**, в которой показана средняя K_D 23,1 +/- 6,3 нМ для ипилимумаба-Fab и средняя K_D 0,779 +/- 0,15 нМ для антитела 2-Fab.

Таблица 4

Канал	Образец	k_a (1/(M*s))	k_d (1/c)	K_D	Chi^2
Ch1	Ипилимумаб-Fab	3,33e+5	9,51e-3	28,6 нМ	1,97
Ch2	Ипилимумаб-Fab	3,66e+5	8,93e-3	24,4 нМ	1,70
Ch3	Ипилимумаб-Fab	5,15e+5	8,37e-3	16,2 нМ	1,61
	Ипилимумаб-Fab			23,1 +/- 6,3 нМ (среднее)	
Ch1	Антитело 2-Fab	3,63e+5	2,26e-4	0,623 нМ	2,30
Ch2	Антитело 2-Fab	2,89e+5	2,29e-4	0,794 нМ	2,10
Ch3	Антитело 2-Fab	2,54e+5	2,34e-4	0,920 нМ	1,49
	Антитело 2-Fab			0,779 +/- 0,15 нМ (среднее)	

[326] На **фиг. 3** показаны результаты анализа SPR, демонстрирующие связывание между антителом 2-1 (версия антитела 2, имеющая Fc-область дикого типа), антителом 2-б (версия антитела 2, имеющая мутацию S239D, мутацию I332E в Fc-области) или ипилимумабом и человеческим Fc γ RIIIa (CD16a) в различных концентрациях. Кинетические параметры и аффинность невозможно было рассчитать на основе результатов.

Пример 2. Анализ с энтеротоксином

Анализ со стафилококковым энтеротоксином В (SEB) использовали для изучения способности различных антител стимулировать выработку IL-2 мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC). *Способы*

Анализ с SEB

[327] Для анализа с SEB разведения выбранных антител получали в предварительно нагретой среде (RPMI+10% инактивированной нагреванием FBS+1% HEPES+1% MEM NEAA+1% Na-пируват). Раствор антител высевали в трех повторностях и среду добавляли только в лунки «PBMC+SEB», лунки «только PBMC» и лунки по внешней границе. Раствор SEB получали в предварительно нагретой среде и добавляли во

все экспериментальные лунки, кроме «только PBMC». PBMC (BioIVT) размораживали на водяной бане при 37°C. Клетки переносили по каплям в коническую пробирку и добавляли 20x предварительно нагретой среды для промывки клеток. Клетки центрифугировали и среду аспирировали. Клетки ресуспендировали в 20 мл предварительно нагретой среды и отбирали аликвоту для подсчета. Оставшиеся клетки центрифугировали и ресуспендировали в объеме, необходимом для получения клеток в количестве 1×10^6 клеток/мл. Клетки высевали по 100 мкл на лунку и планшет инкубировали в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ в течение пяти дней. На пятый день планшет центрифугировали в течение пяти минут со скоростью 1000 об./мин. Из каждой лунки переносили по 250 мкл клеток в новый 96-луночный планшет. Планшет снова центрифугировали и 225 мкл клеток переносили в стрипы для ПЦР. Образцы хранили при -80°C до анализа с помощью ELISA.

ELISA IL-2

[328] Уровни IL-2 в клеточном супернатанте, полученном с использованием описанного выше протокола, определяли путем анализа с помощью наборов ELISA MAX Deluxe для человеческого IL-2 (BioLegend, № по кат. 431806). Образцы клеточного супернатанта разбавляли буфером для анализа до соответствия стандартной кривой.

Образцы анализировали с использованием GraphPad Prism и критерия множественных сравнений Тьюки (однофакторный дисперсионный анализ) для определения статистической значимости различий между группами обработки.

Результаты

[329] Различные формы антитела 1 и антитела 2 тестировали в анализе с SEB. Данные, показывающие уровни IL-2, вырабатываемого в присутствии антитела 1-1 или антитела 1-2, как описано в примере 1, или в отсутствие антитела, представлены на **фиг. 4А**. Данные, показывающие уровни IL-2, вырабатываемого в присутствии антитела 2-1, антитела 2-2, антитела 2-3, антитела 2-4 и антитела 2-5, как описано в примере 1, или в отсутствие антитела, представлены на **фиг. 4С**. Все тестируемые антитела продемонстрировали способность повышать уровни IL-2 по сравнению с контролем без антител. Кратность увеличения уровней IL-2 по сравнению с контролем без антител для каждого антитела показана на **фиг. 4В** (для антитела 1 и вариантов) и **фиг. 4D** (для антитела 2 и вариантов) вместе со сравнением с изотипическим контролем.

[330] На **фиг. 4Е** представлены результаты схожих оценок посредством SEB с различными версиями антитела 1 к CTLA4 [имеющего Fc-область дикого типа (антитело 1-1), имеющего мутацию S239D и мутацию I332E в Fc-области (антитело 1-2) и афукозилированной версией антитела 1 (антитело 1-aFuc)], антитела 2 [имеющее Fc-область дикого типа (антитело 2-1), имеющего мутацию S239D и I332E-мутацию в Fc-области (антитело 2-6), и афукозилированной версией антитела 2 (антитело 2-aFuc)] или ипилимумабом [имеющий Fc дикого типа (ипилимумаб), имеющий мутацию S239D и мутацию I332E в Fc-области (ипилимумаб-м) и афукозилированной версией ипилимумаба (ипилимумаб-aFuc)]. Результаты показали, что антитела с мутацией S239D и мутацией

I332E в Fc-области приводят к более высокому уровню продуцирования IL-2.

Пример 3. Активность ADCC, обусловленная антителами к CTLA4

[331] Способность антител к CTLA4 вызывать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) оценивали с использованием γрепортерного биоанализа с FcRIIIa.

Способы

γРепортерный биоанализ с FcRIIIa

[332] Репортерный биоанализ с FcγRIIIa проводили с использованием различных антител к CTLA4. Антитела разводили в предварительно нагретой полной среде (FBS с RPMI1640). Эффекторные клетки с CTLA4 (клетки-мишени: Promega J158A) размораживали и переносили в коническую пробирку, содержащую полную среду. Клетки смешивали и подсчитывали и плотность клеток доводили до 1×10^6 клеток/мл. Клетки-мишени добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета (Corning, № по кат. 3917). Разбавленные антитела добавляли в соответствующие лунки и тестировали в двух повторностях. Содержимое каждой лунки осторожно перемешивали и планшет инкубировали при 37°C в течение пятнадцати минут. Эффекторные клетки (клетки Jurkat, экспрессирующие FcγRIIIa) размораживали и переносили в коническую пробирку, содержащую полную среду. Клетки смешивали и подсчитывали и плотность клеток доводили до 3×10^6 клеток/мл. Эффекторные клетки незамедлительно вносили необходимое количество в каждую лунку и осторожно перемешивали. Планшет закрывали крышкой и выдерживали при 37°C в течение шести часов. За час до измерения субстрат Bio-Glo и буфер Bio-Glo извлекали из места хранения при температуре 4°C. Буфер Bio-Glo переносили в бутылку с субстратом Bio-Glo для приготовления реагента Bio-Glo и осторожно перемешивали переворачиванием. Бутылку хранили при комнатной температуре. После инкубирования планшет для анализа извлекали из инкубатора и выдерживали при комнатной температуре в течение десяти минут. Реагент Bio-Glo добавляли в каждую лунку и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение пяти-пятнадцати минут. Затем планшет считывали на люминометре.

[333] Тестируемые антитела включали антитело 1 к CTLA4 [имеющее Fc-область дикого типа (антитело 1-1), имеющее мутацию S239D и мутацию I332E в Fc-области (антитело 1-2) и афукозилированную версию антитела 1 (антитело 1-aFuc)], антитело 2 [имеющее Fc-область дикого типа (антитело 2-1), имеющее мутацию S239D и I332E-мутацию в Fc-области (антитело 2-6), и афукозилированную версию антитела 2 (антитело 2-aFuc)] или ипилимумаб [имеющий Fc дикого типа (ипилимумаб), имеющий мутацию S239D и мутацию I332E в Fc-области (ипилимумаб-m) и афукозилированную версию ипилимумаба (ипилимумаб-aFuc)].

Результаты

[334] На **фиг. 5A-5D** показаны кривая активации репортера и значения EC₅₀ из репортерного биоанализа ADCC для вариантов антитела 1 (**фиг. 5A**), вариантов антитела 2 (**фиг. 5B**), вариантов ипилимумаба (**фиг. 5C**) и афукозилированных вариантов всех 3

антител (**фиг. 5D**). Результаты показали, что антитела с мутацией S239D и I332E в Fc-области и афукозилированные антитела приводили к более высокому уровню активации по сравнению с соответствующей версией с Fc-областью дикого типа для каждого антитела.

Пример 4. Иммунофенотипирование *in vivo* иммунных клеток на мышинной модели с опухолью, экспрессирующей CTLA4 человека, после введения антител к CTLA4

[335] Иммунофенотипы иммунных клеток определяли на сконструированной с помощью генной инженерии мышинной модели, несущей опухоль MC38, с нокином человеческого CTLA4, которой вводили различные антитела к CTLA4.

Способы

[336] MC38 (1×10^6) вводили посредством подкожной инъекции в мышиную модель с нокином человеческого CTLA4. В день 0 мышей рандомизировали на основании измерений объема опухоли и внутривенно вводили однократную инъекцию 200 мкг тестируемого антитела (антитело 2-1, ипилимумаб, афукозилированная форма ипилимумаба (ипилимумаб-aFuc) или контроль IgG). Иммунофенотипирование проводили на CD45+ клетках селезенки и CD45+ клетках внутри опухоли через пять дней после инъекции. Клетки CD45+ оценивали на экспрессию маркеров, включая CD3+/ICOS+, CD3+Т-клетки, CD4+/Ki67+, CD3+/Ki67+, CD4+/ICOS+, CD4+Т-клетки,

CD8+/ICOS+, CD8+Т-клетки, Treg+/ICOS+, CD8+/ Ki67+, Treg, Treg+/Ki67+ с относительными долями клеток CD45+, экспрессирующих эти маркеры.

Результаты

[337] Результаты иммунофенотипирования с использованием мышей с опухолью MC38 с нокином CTLA4 показаны на **фиг. 6A-6D**, где относительная доля CD45+ в селезенке (**фиг. 6A** и **6B**) или CD45+ внутри опухоли (**фиг. 6C** и **6D**) представлена для маркеров в отношении CD3+/ICOS+, CD3+ Т-клеток, CD4+/Ki67+, CD3+/Ki67+, CD4+/ICOS+, CD4+ Т-клеток, CD8+/ICOS+, CD8+ Т-клеток, Treg+/ICOS+, CD8+/Ki67+, Treg, Treg+/Ki67+. Статистические данные представлены в **таблице 5** (клетки селезенки) и в **таблице 6** (клетки внутри опухоли). Группа 1: IgG, группа 2: Антитело 2-1; группа 4: ипилимумаб; группа 5: ипилимумаб-aFuc.

Таблица 5.

	Бартлетт	ANOVA/ Краскел	1 по срав нени ю с 2	1 по срав нени ю с 4	1 по срав нени ю с 5	2 по срав нени ю с 4	2 по срав нени ю с 5	4 по срав нени ю с 5
CD3+ICOS+	0,11	0,10	0,48	0,16	0,82	0,10	0,65	0,14
CD3+KI67+	0,25	0,18	0,70	0,23	0,94	0,13	0,78	0,22
Клетки CD3Т	0,09	0,16	0,83	0,14	0,76	0,13	0,66	0,19
CD4+ICOS+	0,14	0,19	0,18	0,41	0,41	0,14	0,48	0,24
CD4+KI67+	0,13	0,00	0,01	0,88	0,05	0,05	0,31	0,15

Клетки CD4T	0,10	0,25	0,25	0,38	0,62	0,16	0,45	0,28
CD8+ICOS+	0,01	0,22	0,33	0,05	0,54	0,18	1,00	0,24
CD8+KI67+	0,50	0,29	0,27	0,08	0,44	0,26	0,87	0,27
Клетки CD8T	0,01	0,16	0,18	0,02	0,54	0,18	0,94	0,24
Treg	0,02	0,00	0,01	0,54	0,01	0,06	0,59	0,13
Treg+ICOS+	0,03	0,00	0,00	0,08	0,00	0,06	0,59	0,13
Treg+KI67+	0,04	0,01	0,01	0,93	0,02	0,09	0,82	0,13

Таблица 6

	Бартлетт	ANOVA/ Краскел	1 по сравнению с 2	1 по сравнению с 4	1 по сравнению с 5	2 по сравнению с 4	2 по сравнению с 5	4 по сравнению с 5
CD3+ICOS+	0,00	0,03	0,08	0,09	0,03	0,66	0,79	0,24
CD3+KI67+	0,00	0,10	0,08	0,31	0,24	0,18	0,66	0,31
Клетки CD3T	0,26	0,08	0,13	0,32	0,04	0,38	0,55	0,15
CD4+ICOS+	0,02	0,05	0,05	0,18	0,09	0,18	0,93	0,18
CD4+KI67+	0,00	0,02	0,01	0,18	0,18	0,05	0,79	0,31
Клетки CD4T	0,17	0,19	0,12	0,35	0,08	0,43	0,86	0,33
CD8+ICOS+	0,14	0,03	0,11	0,26	0,04	0,31	0,39	0,09
CD8+KI67+	0,00	0,09	0,05	0,13	0,04	0,43	0,79	0,39
Клетки CD8T	0,24	0,05	0,12	0,31	0,04	0,32	0,44	0,10
Treg	0,03	0,11	0,93	0,09	0,82	0,43	0,54	0,59
Treg+ICOS+	0,03	0,02	0,54	0,02	0,04	0,54	0,79	0,70
Treg+KI67+	0,00	0,06	0,01	0,09	0,18	0,13	1,00	0,48

Пример 5. Подавление роста опухоли *in vivo* с помощью антител к CTLA4 в мышинной модели с опухолью, экспрессирующей CTLA4 человека

[338] Оценивали активность подавления роста опухоли с помощью различных антител к CTLA4 после введения в сконструированную с помощью генной инженерии мышиную модель, несущей опухоль MC38, с нокином человеческого CTLA4.

[339] Клетки MC38 (1×10^6) вводили подкожно в мышиную модель, с нокином кодирующей области внеклеточного домена CTLA4 человека. Мышам внутрибрюшинно вводили однократную инъекцию 20 мкг, 7 мкг или 2 мкг тестируемого антитела [антитело 2-6, ипилимумаб, афукозилированная форма ипилимумаба (ипилимумаб-аFuc) или антитело к RSV, содержащие мутации S239D и I332E в Fc-домене (RSV-m)]. Объем опухоли измеряли с течением времени после однократной инъекции тестируемого антитела.

[340] Результаты показаны на **фиг. 7А-7Д**. На **фиг. 7А** (среднее по группе) и **фиг. 7В** (отдельные мыши) показан объемы опухоли (мм^3) с течением времени для мышей,

которым вводили антитело 2-6, ипилимумаб или афукозилированную форму ипилимумаба (ипилимумаб-аFuc), и результаты показали, что все тестируемые антитела демонстрируют подавление роста опухоли. На **фиг. 7C** (20 мкг), **фиг. 7D** (7 мкг) и **фиг. 7E** (2 мкг) показано сравнение объема опухоли (мм³) с течением времени при каждой дозе различных антител. Результаты показали, что антитело 2-6 продемонстрировало наилучшее подавление роста опухоли при дозах 2 мкг и 7 мкг и такое же подавление роста опухоли, как и антитела ипилимумаба при дозе 20 мкг.

Пример 6. Эффективность и фармакодинамика антител к CTLA4 на мышинной модели опухоли мочевого пузыря MB49

Способы

[341] Эффективность и фармакодинамику (PD) антител к CTLA4 оценивали с использованием мышинной модели опухоли мочевого пузыря MB49. Эффективность оценивали при введении каждого из тестируемых антител (контрольное антитело RSV-m, ипилимумаб и антитело 2-6) с последующей оценкой объема опухоли и веса тела. Контрольное антитело к RSV содержит мутации S239D и I332E (контрольное антитело RSV-m). Также проводили периферическое иммунофенотипирование в день 5, в ходе которого оценивали процентное содержание CD4+Ki67+ клеток и процентное содержание CD4+ICOS+ клеток в периферической крови в день 5 после введения. Для исследований эффективности оценивали мышей с дозировкой в мг/кг, как показано в **таблице 7**. Используемое в данном документе дозирование в мг/кг также обозначается как «mpк». Клетки MB49 подкожно инокулировали мышам C57/BL6-huCTLA4. Обработку начинали, когда опухоли достигали размера приблизительно 350 мм³. Для определения статистической значимости обработки по сравнению с контролем (контрольное RSV-m) выполняли однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным критерием Даннета. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001.

Таблица 7

Когорта	Антитело	Доза (мг/кг)
1	Контрольное RSV-m	10
2	Ипилимумаб	0,3
3	Ипилимумаб	1
4	Ипилимумаб	3
5	Антитело 2-6	0,3
6	Антитело 2-6	1
7	Антитело 2-6	3
8	Антитело 2-6	10

[342] Фармакодинамику оценивают путем введения антитела каждой из пяти когорт мышей в дозе (мг/кг), как показано в **таблице 8**. Кроме получения прочих данных выполняют иммунофенотипирование в опухоли, печени, селезенке и крови. Т-клетки оценивают путем измерения количества Foxp3+CD25+ клеток в виде процента от CD4+ клеток, а количество CD8+ клеток измеряют в виде процента от CD45+ клеток.

Таблица 8

Когорта	Антитело	Доза (мг/кг)
---------	----------	--------------

1	КОНТРОЛЬНОЕ RSV-M	10
2	ИПИЛИМУМАБ	3
3	АНТИТЕЛО 2-6	3

Результаты

[343] На **фиг. 8А** представлены результаты исследования эффективности на основе процентного содержания CD4+Ki67+ клеток (слева) и CD4+ICOS+ клеток (справа) в периферической крови в день 5 после введения, что представляет уровень активации Т-клеток.

[344] Как показано на **фиг. 8В**, вес опухоли и соотношения CD8/Treg оценивали в день 7 у мышей, которых обрабатывали с помощью 10 мг/кг (контрольное RSV-m) или 3 мг/кг (ипилимумаб или антитело 2-6). Мыши, которых обрабатывали антителом 2-6, демонстрировали наиболее низкие значения веса опухоли и более высокие соотношения CD8/Treg в опухолях при 3 мг/кг в день 7. Никаких изменений веса тела, веса селезенки, веса почки или веса печени не наблюдалось ни в одной из групп обработки (данные не представлены).

[345] Как показано на **фиг. 8С**, истощение в отношении регуляторных Т-клеток и активация CD8+ Т-клеток наблюдается для антитела 2-6, но не для ипилимумаба.

[346] Как показано на **фиг. 8D**, сильная противоопухолевая активность наблюдалась после обработки антителами к CTLA4. В дозе 0,3 мг/кг антитело 2-6 продемонстрировало превосходную противоопухолевую активность по сравнению с ипилимумабом.

Пример 7. Оценка in vivo антител к CTLA4 у яванских макаков

[347] Фармакодинамические (PD) эффекты антитела к CTLA4 оценивали на яванских макаках. В двух различных сериях экспериментов яванским макакам вводили ипилимумаб, антитело 2-6 или изотипический контроль, и фармакодинамические (PD) эффекты оценивали путем измерения процентного содержания (%) Ki67+ клеток среди CD4+ клеток.

[348] Результаты первой и второй серии экспериментов по PD показаны на **фиг. 9**. Антитело 2-6 более эффективно индуцирует периферические PD-эффекты, чем ипилимумаб, о чем свидетельствует повышенное процентное содержание Ki67+ клеток среди CD4+ клеток по сравнению с ипилимумабом.

[349] Фармакокинетику также оценивали с использованием яванских макаков после внутривенного введения 10 мг/кг тестируемого антитела (контрольное RSV-m, ипилимумаб или антитело 2-6). Уровни каждого антитела в плазме измеряли, а период полувыведения (дни), C_{max} (мкг/мл) и площадь под кривой (AUC) (день* мкг/мл) определяли в двух исследованиях. Рассчитывали период полувыведения (дни), C_{max} (мкг/мл) и площадь под кривой (AUC) (день * мкг/мл) по результатам фармакокинетических исследований для каждого тестируемого антитела. Ипилимумаб имел самый длинный период полувыведения и самую высокую AUC. Антитело 2-6 имело примерно такую же C_{max}, что и ипилимумаб.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен тяжелой цепи (VH), где:

VL-домен содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3; и/или VH-домен содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; или

VL-домен содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15; и/или VH-домен содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18; или

VL-домен содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9; и/или VH-домен содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12; или

VL-домен содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21; и/или VH-домен содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

2. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где:

VL-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 25, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26; или

VL-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 30, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична

на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 31.

3. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, где:

VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25, а VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26; или

VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30, а VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

4. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен тяжелой цепи (VH), где:

VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25 и/или VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26; или

VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30 и/или VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

5. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, где VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25 и VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26.

6. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, где VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30 и VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

7. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константный домен тяжелой цепи (CH).

8. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-7, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность CH, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35-38.

9. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п. 7 или п. 8, где CH содержит аминокислотные замены S239D или I332E или обе, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом согласно Kabat.

10. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность CH под SEQ ID NO: 38.

11. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-10, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константный домен легкой цепи (CL).

12. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-11, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность CL под SEQ ID NO: 39.

13. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-12, где:

легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:27 и тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:29; или

легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32 и тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

14. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29.

15. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

16. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-15, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются афукозилированными или дефицитными по фукозе.

17. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-16, где антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы со средством.

18. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 17, где средство является ингибитором полимеризации тубулина, повреждающим ДНК средством или ингибитором синтеза ДНК.

19. Антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 17, где средство представляет собой майтанзиноид, ауристин, димер пирролобензодиазепина (PBD), калихеамицин, дуокармицин, димер индолинобензодиазепина или производное экзатекана Dxd.

20. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие

1) легкую цепь и тяжелую цепь первой пары, которая специфически связывается с CTLA4;

2) легкую цепь и тяжелую цепь второй пары, которая специфически связывается с антигеном; где легкая цепь первой пары содержит VL-домен и тяжелая цепь первой пары содержит VH-домен, и где:

VL-домен содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3; и/или VH-домен содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; или

VL-домен содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под

SEQ ID NO: 15; и/или VH-домен содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18; или

VL-домен содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9; и/или VH-домен содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12; или

VL-домен содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21; и/или VH-домен содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

21. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 20, где:

VL-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 25, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26; или

VL-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 30, и VH-домен содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на по меньшей мере приблизительно 90% аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 31.

22. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 20 или п. 21, где:

VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25, а VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26; или

VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30, а VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

23. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие

1) легкую цепь и тяжелую цепь первой пары, которая специфически связывается с CTLA4;

2) легкую цепь и тяжелую цепь второй пары, которая специфически связывается с антигеном; где легкая цепь первой пары содержит VL-домен и тяжелая цепь первой пары содержит VH-домен, и где:

VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25 и/или VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26; или

VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30 и/или VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

24. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 20-23, где VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25 и VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26.

25. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 20-23, где VL-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30 и VH-домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31.

26. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 20-25, где биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константный домен тяжелой цепи (CH).

27. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 20-26, где биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность CH, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35-38.

28. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 26 или п. 27, где CH содержит аминокислотные замены S239D или I332E или обе, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом согласно Kabat.

29. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 20-28, где биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность CH под SEQ ID NO: 38.

30. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 20-29, где биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константный домен легкой цепи (CL).

31. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 20-30, где биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность CL под SEQ ID NO:39.

32. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 20-31, где:

легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:27 и тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:29; или

легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32 и тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

33. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие

1) легкую цепь и тяжелую цепь первой пары, которая специфически связывается с CTLA4;

2) легкую цепь и тяжелую цепь второй пары, которая специфически связывается с антигеном; где первая пара содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29.

34. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие

1) легкую цепь и тяжелую цепь первой пары, которая специфически связывается с CTLA4;

2) легкую цепь и тяжелую цепь второй пары, которая специфически связывается с антигеном; где первая пара содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

35. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 20-34, где биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются афукозилированными или дефицитными по фукозе.

36. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 20-35, где биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы со средством.

37. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 36, где средство является ингибитором полимеризации тубулина, повреждающим ДНК средством или ингибитором синтеза ДНК.

38. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 36, где средство представляет собой майтанзиноид, ауристин, димер пирролобензодиазепина (PBD), калихеамицин, дуокармицин, димер индолинобензодиазепина или производное экзатекана Dxd.

39. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19 или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 20-38.

40. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 39.

41. Клетка-хозяин, содержащая антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 20-38 или нуклеиновую кислоту по п. 39.

42. Клетка-хозяин по п. 41, где клетка-хозяин способна продуцировать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые являются афукозилированными или дефицитными по фукозе.

43. Клетка-хозяин по п. 41 или п. 42, где клетка-хозяин характеризуется нокаутом по альфа-1,6-фукозилтрансферазе (Fut8).

44. Клетка-хозяин по любому из пп. 41-43, где клетка-хозяин избыточно экспрессирует β 1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnT-III).

45. Клетка-хозяин по любому из пп. 41-44, где клетка-хозяин избыточно экспрессирует μ -маннозидазу I (ManII) аппарата Гольджи.

46. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из пп. 41-45 в условиях, которые обеспечивают получение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

47. Способ получения афукозилированного или дефицитного по фукозе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из пп. 42-45 в условиях, которые обеспечивают получение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

48. Способ по любому из пп. 43-45, дополнительно включающий выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, продуцируемых клеткой-хозяином.

49. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полученные посредством способа по любому из пп. 46-48.

50. Композиция, содержащая антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 20-38 или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 49.

51. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 20-38 или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 49 и фармацевтически приемлемый носитель.

52. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 20-38 или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 49 и фармацевтически приемлемый носитель для применения при лечении или предупреждении неопластического заболевания у субъекта.

53. Применение фармацевтической композиции, содержащей антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 20-38 или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 49 и фармацевтически приемлемый носитель при изготовлении лекарственного препарата для лечения или предупреждения неопластического заболевания у субъекта.

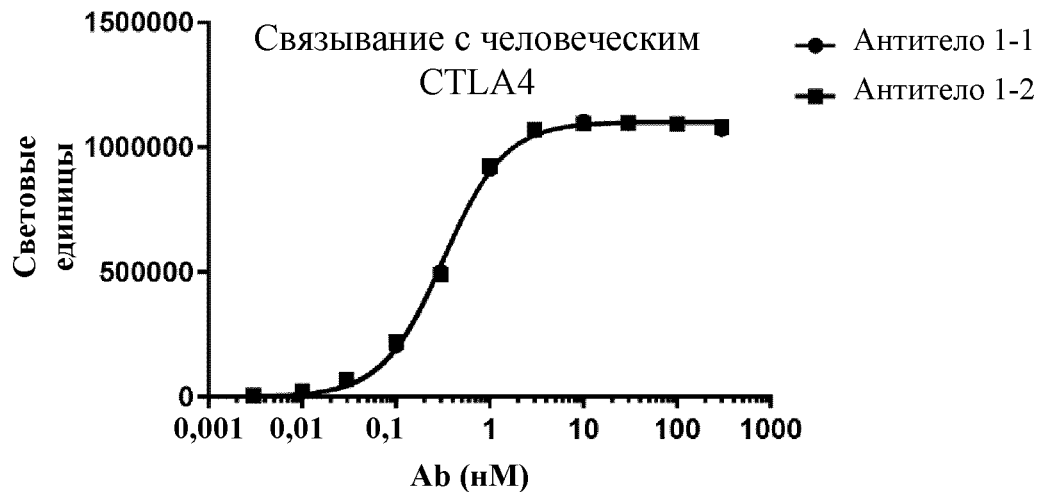
54. Набор, содержащий антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 20-38 или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 49.

55. Способ лечения или предупреждения неопластического заболевания у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела к CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-19, биспецифического антитела или

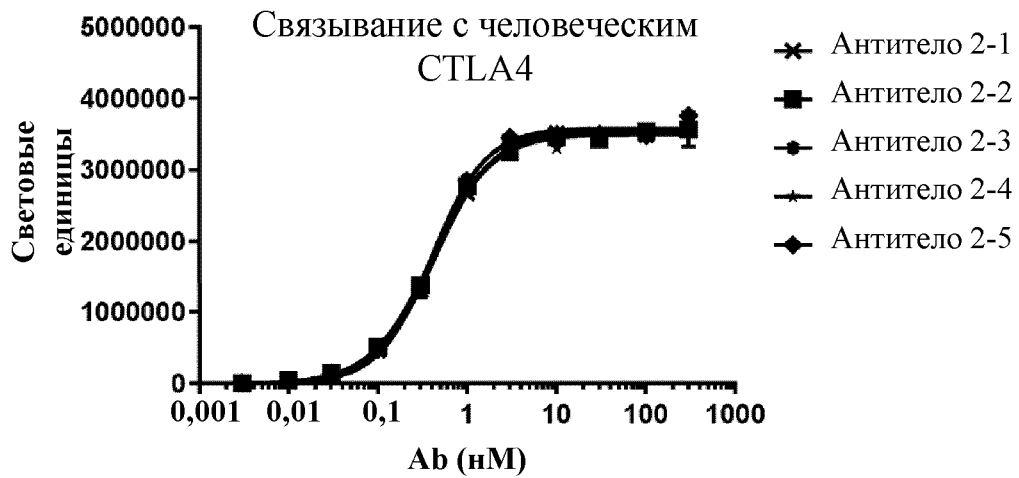
его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 20-38, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п. 49 или композиции по любому из пп. 50-52.

По доверенности

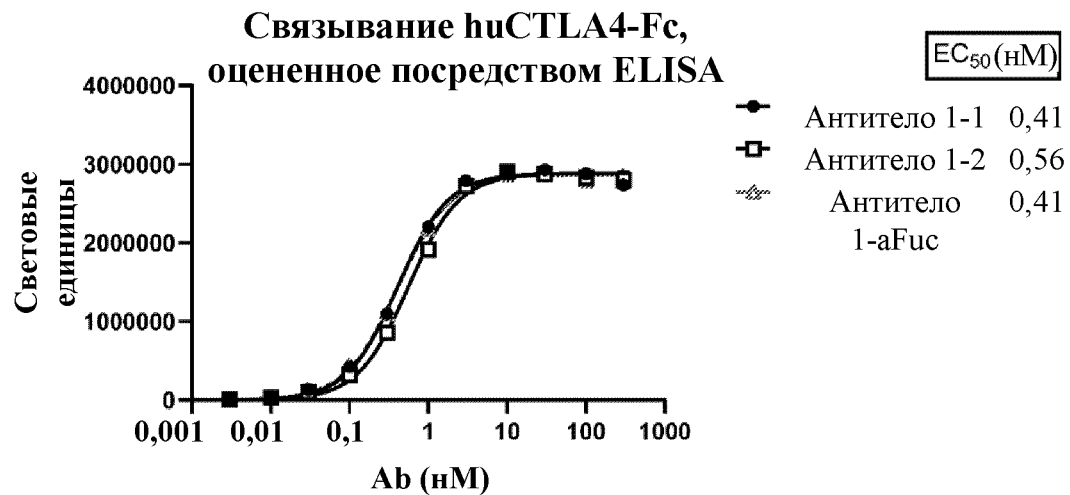
Фиг. 1А



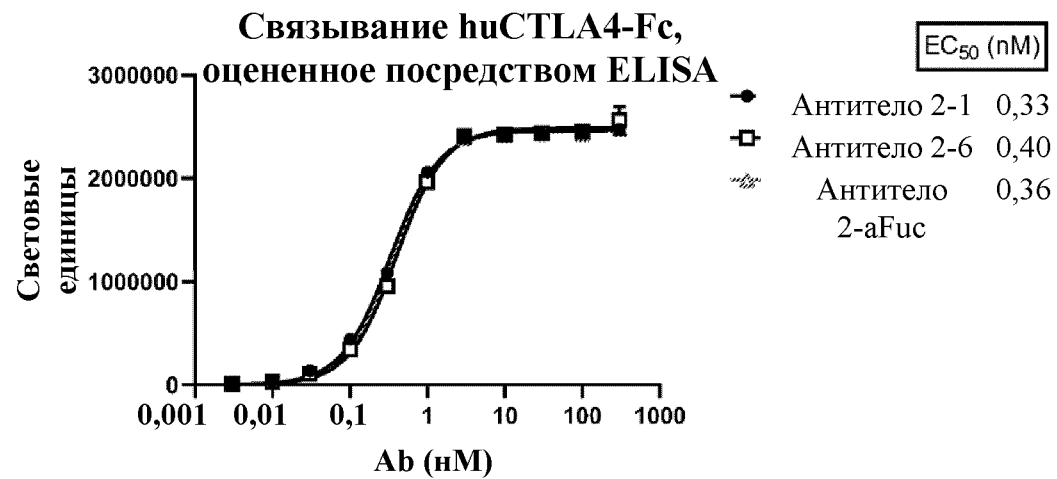
Фиг. 1В



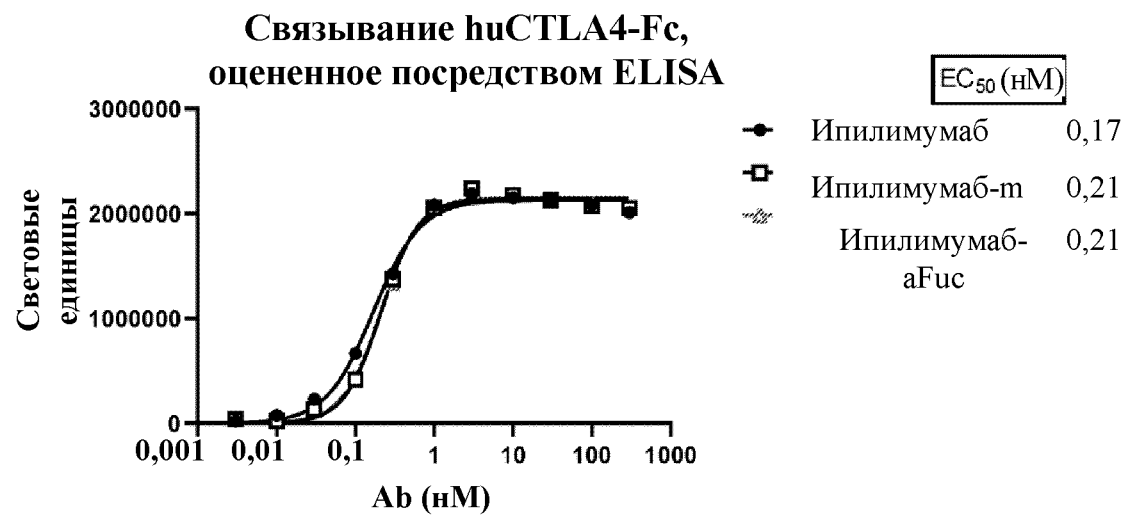
Фиг. 1С



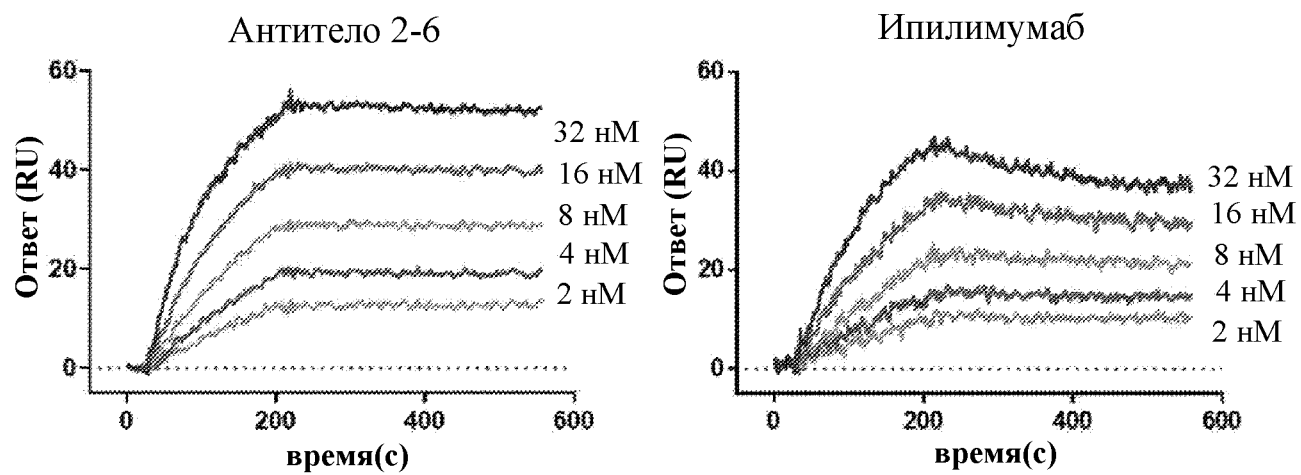
Фиг. 1D



Фиг. 1Е



Фиг. 2А

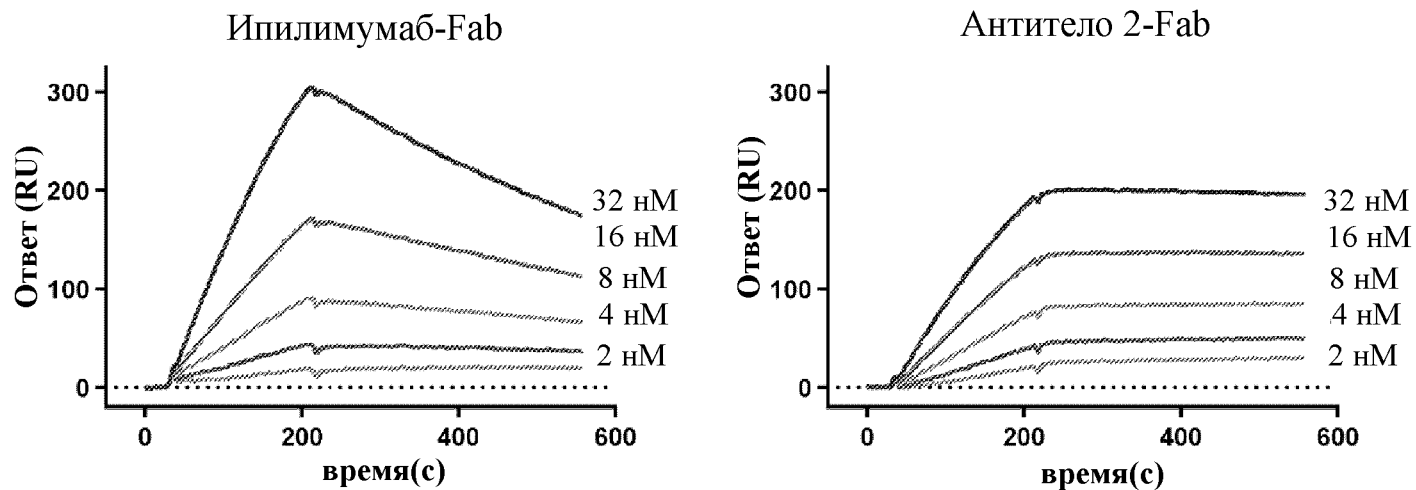


Фиг. 2В

Антитело	ka (1/(M*c))	kd (1/c)	Kd
Антитело 2-6	3,66E+5	3,33E-5	91 пМ
Ипилимумаб	2,90E+5	4,75E-4	1640 пМ
Кратность различия (Антитело 2-6 по сравнению с ипилимумабом)		~14x	~18x

Фиг. 2С

rhuCTLA4-Fc

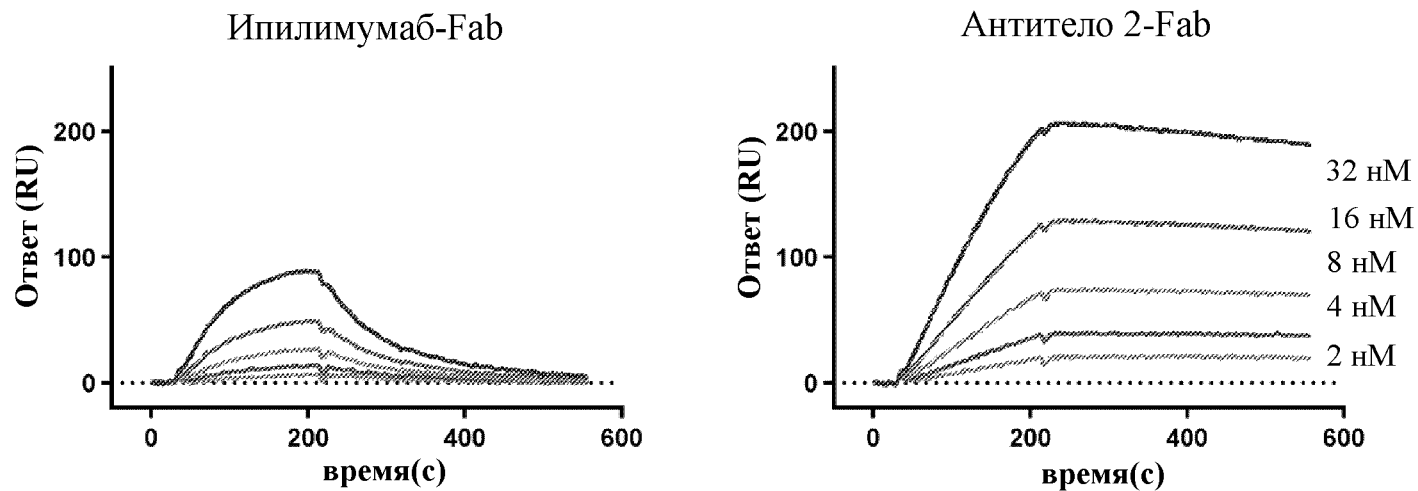


Фиг. 2D

Канал	Образец	k_a (1/(M*s))	k_d (1/с)	K_D	χ^2
Ch1	Ипилимумаб-Fab	2,45e+5	1,40e-3	4,74 нМ	1,40
Ch1	Антитело 2-Fab	3,61e+5	1,63e-6	4,53 пМ	2,85

Фиг. 2Е

суноCTLA4-Fc



Фиг. 2F

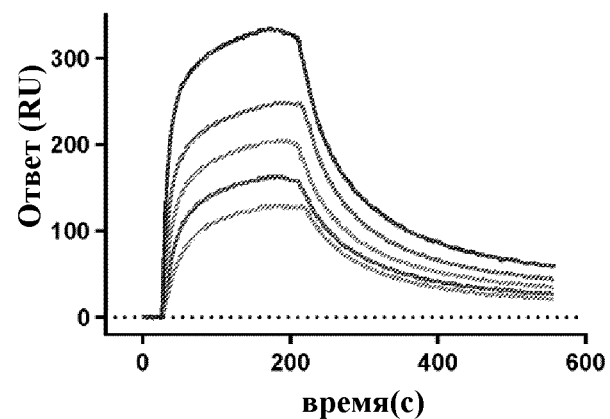
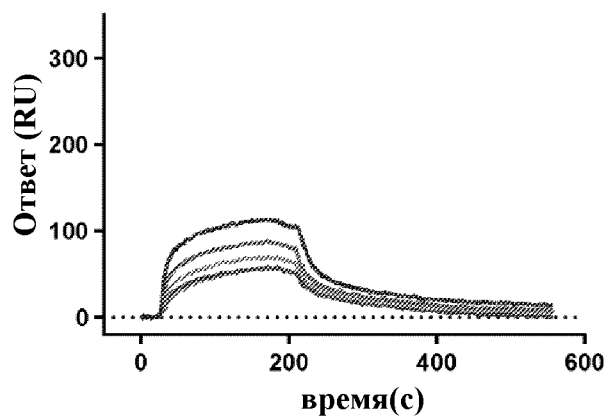
Канал	Образец	ka (1/(M*c))	kd (1/с)	K _D	Chi ²
Ch1	Ипилимумаб-Fab	3,33e+5	9,51e-3	28,6 нМ	1,97
Ch1	Антитело 2-Fab	3,63e+5	2,26e-4	0,623 нМ	2,30

Фиг. 3

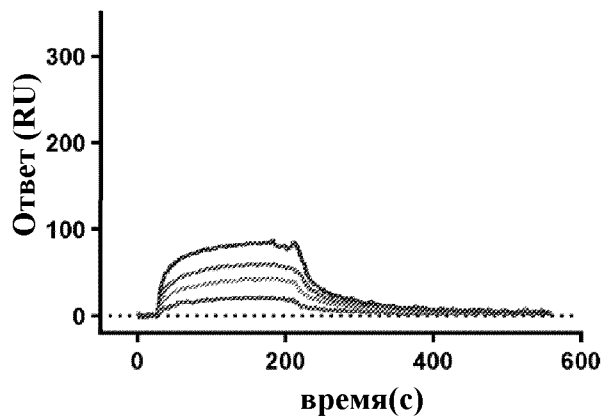
CD16a

Антитело 2-1

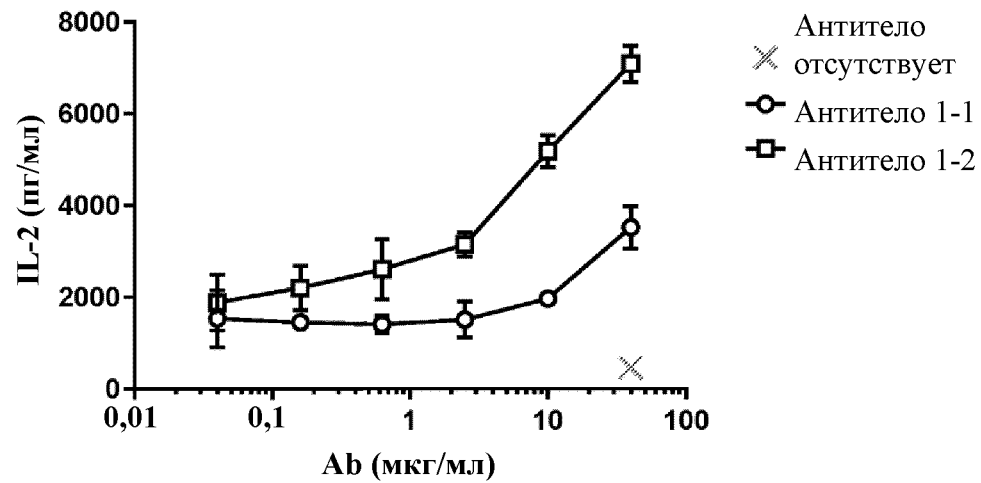
Антитело 2-6



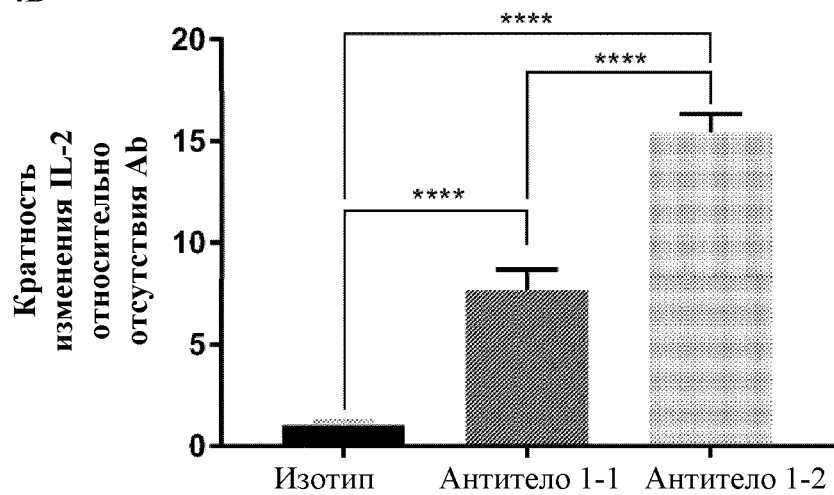
Ипилимуаб



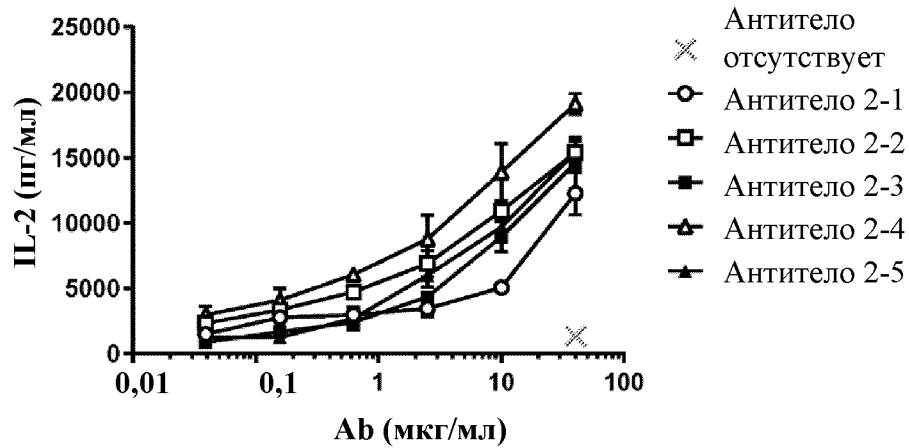
Фиг. 4А



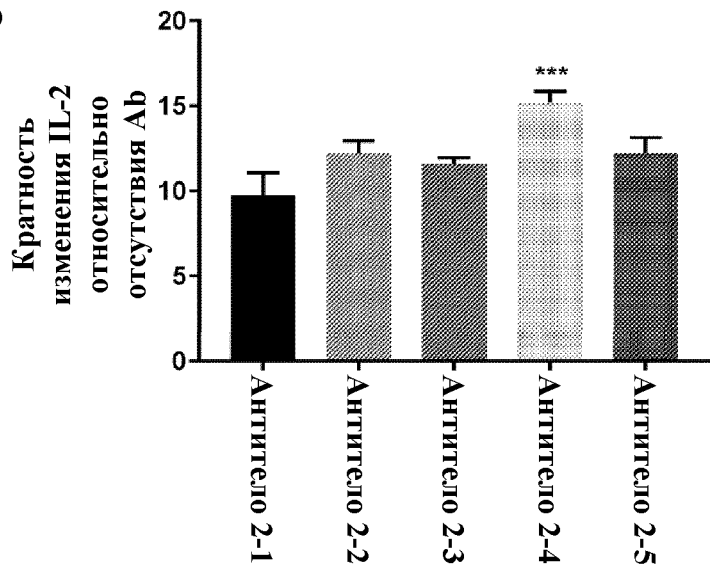
Фиг. 4В



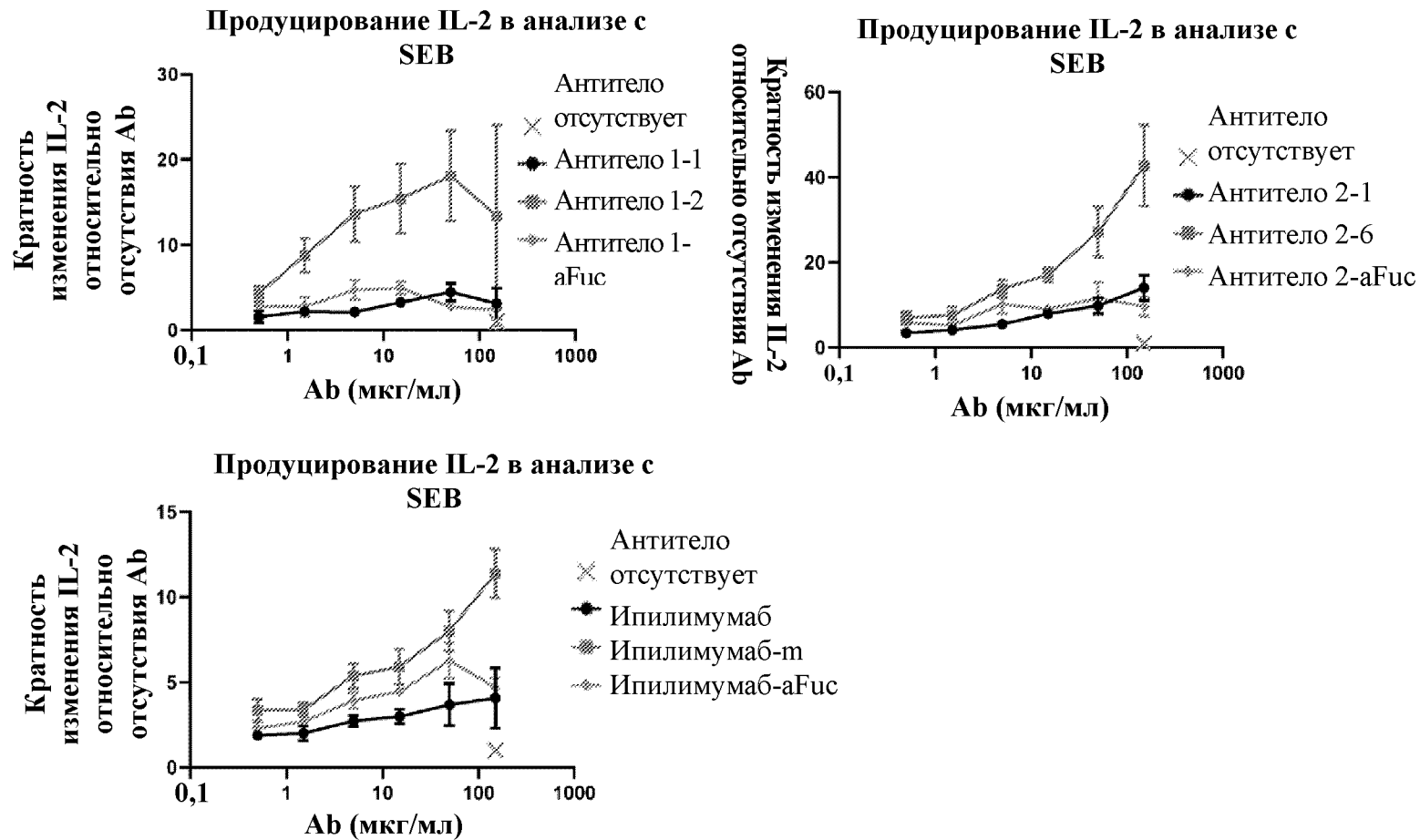
Фиг. 4С

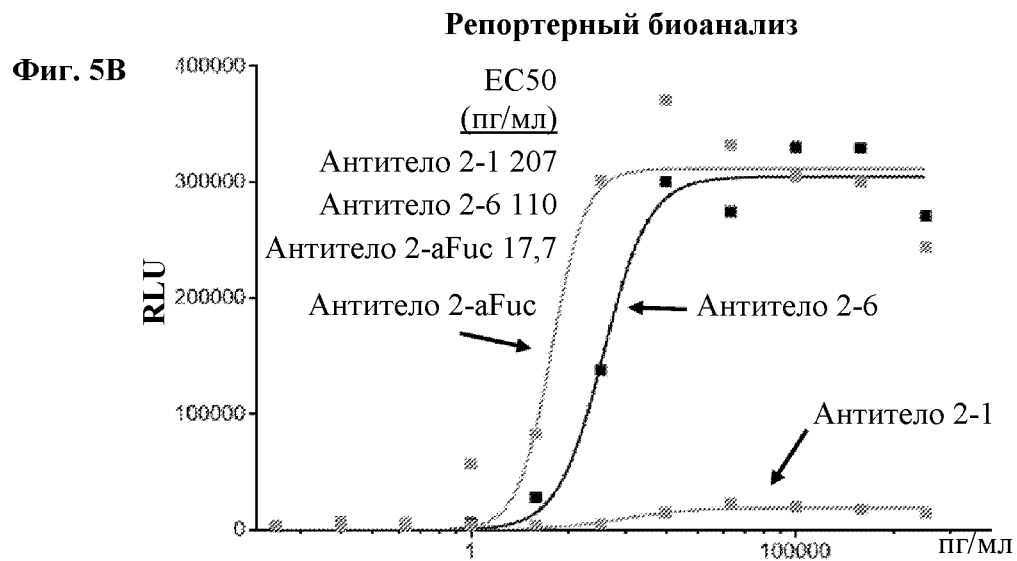
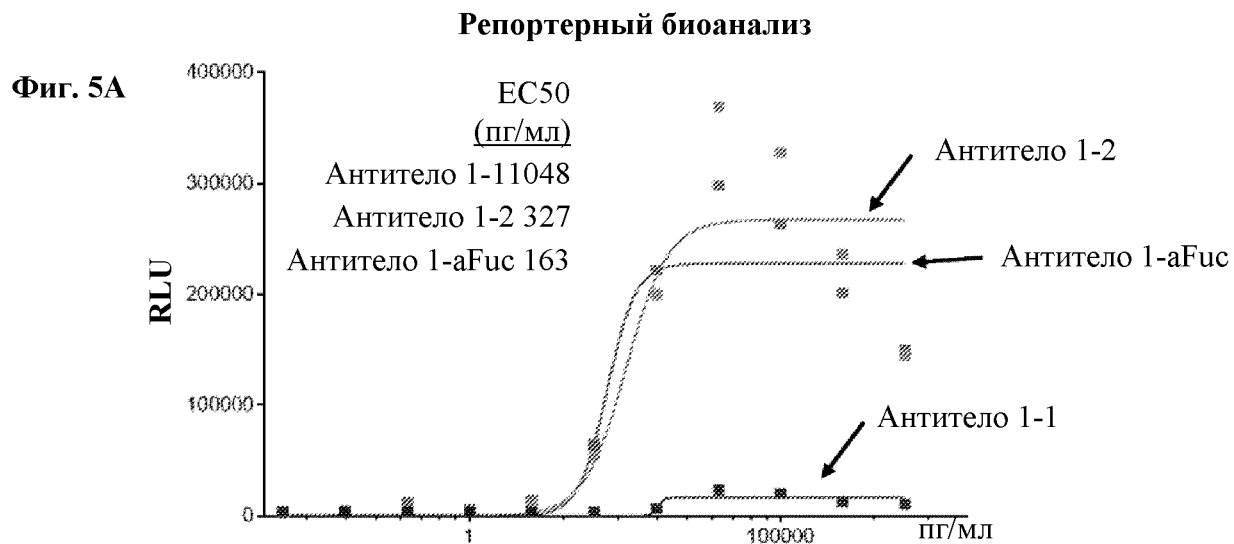


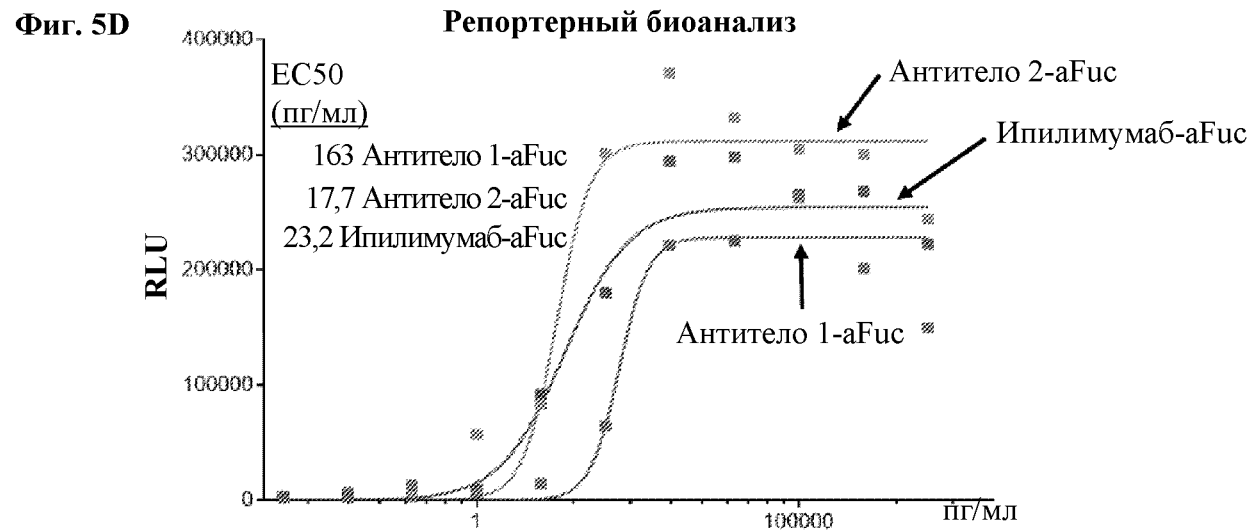
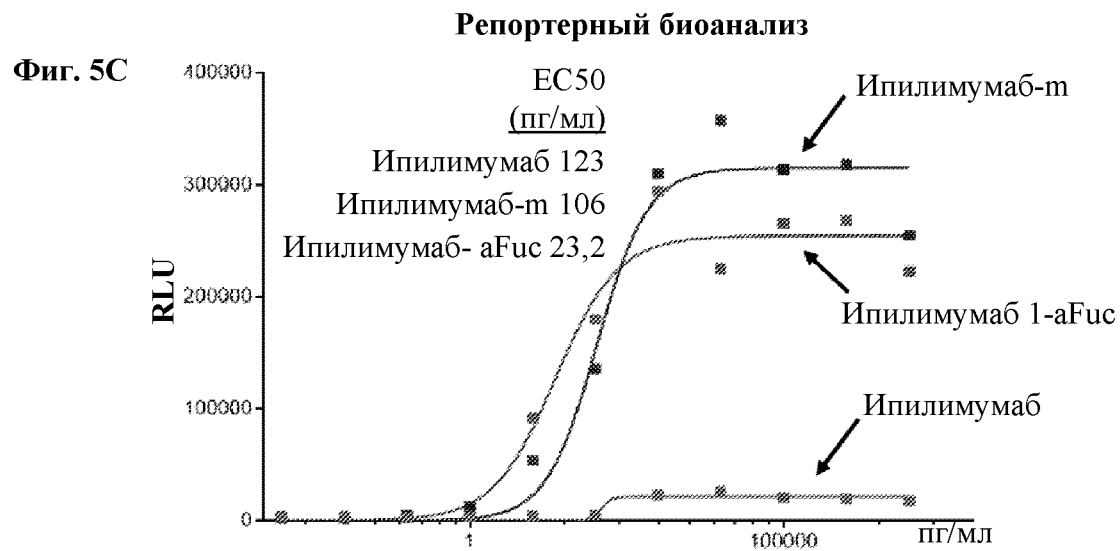
Фиг. 4D



Фиг. 4Е

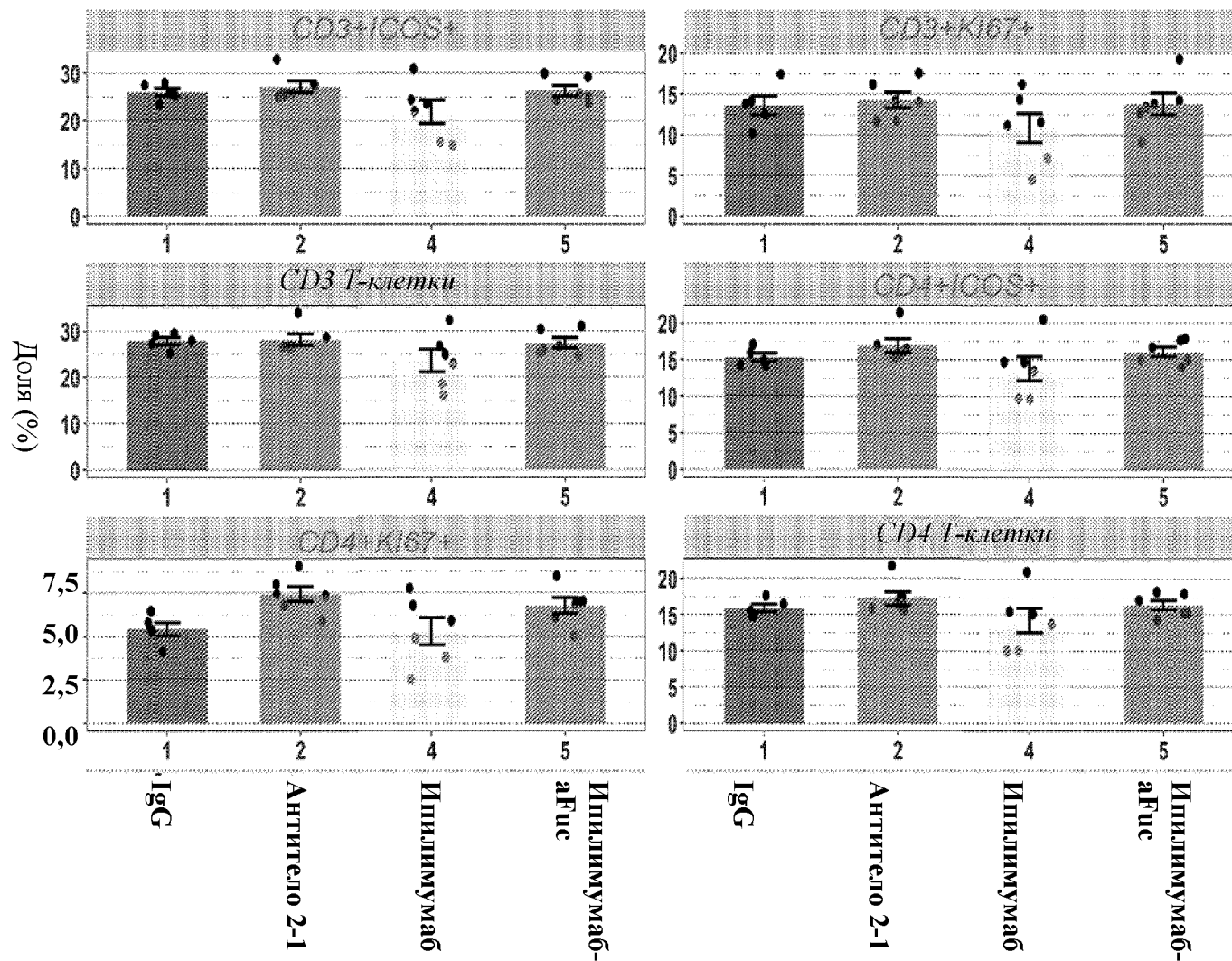






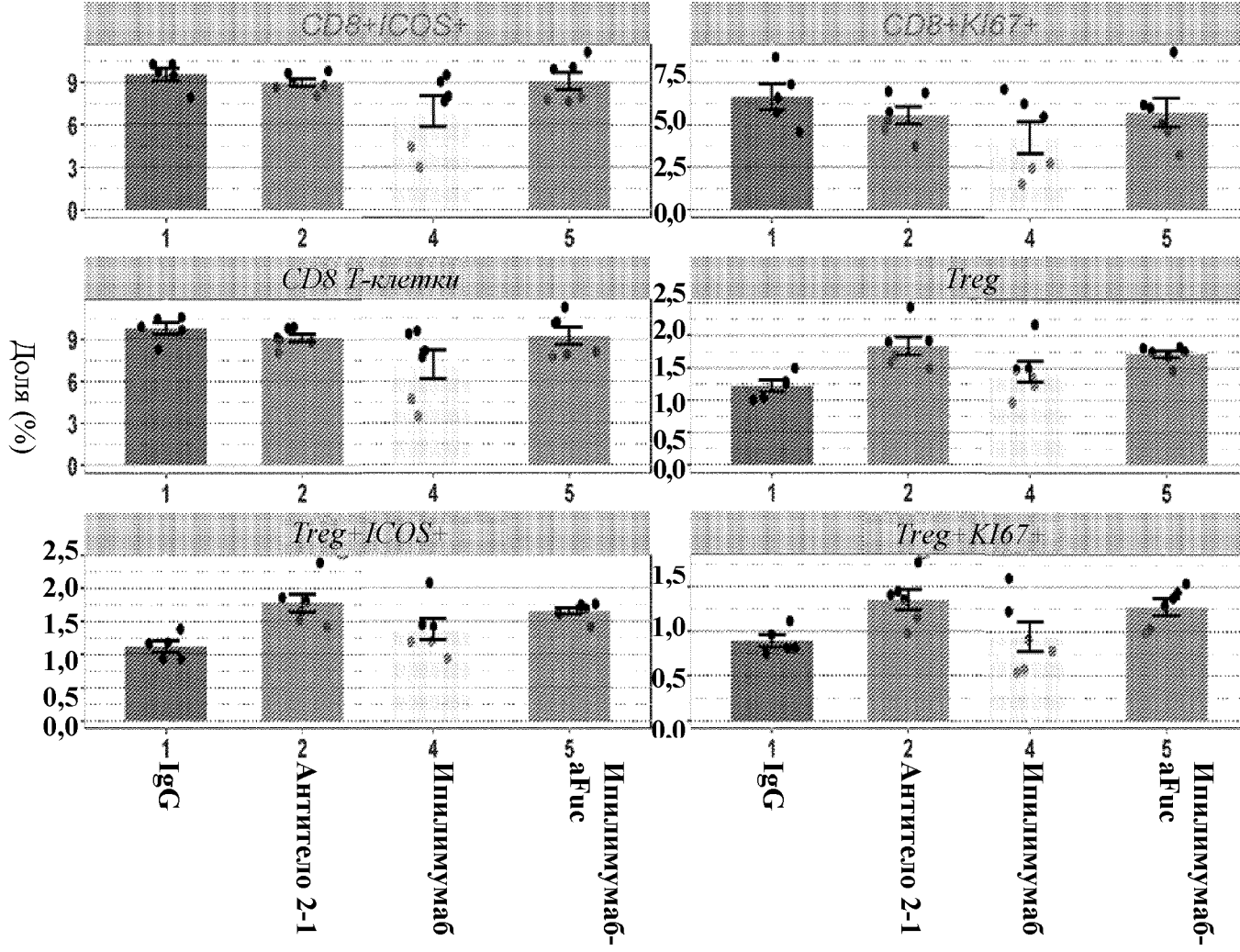
Фиг. 6А

CD45+ клетки селезенки



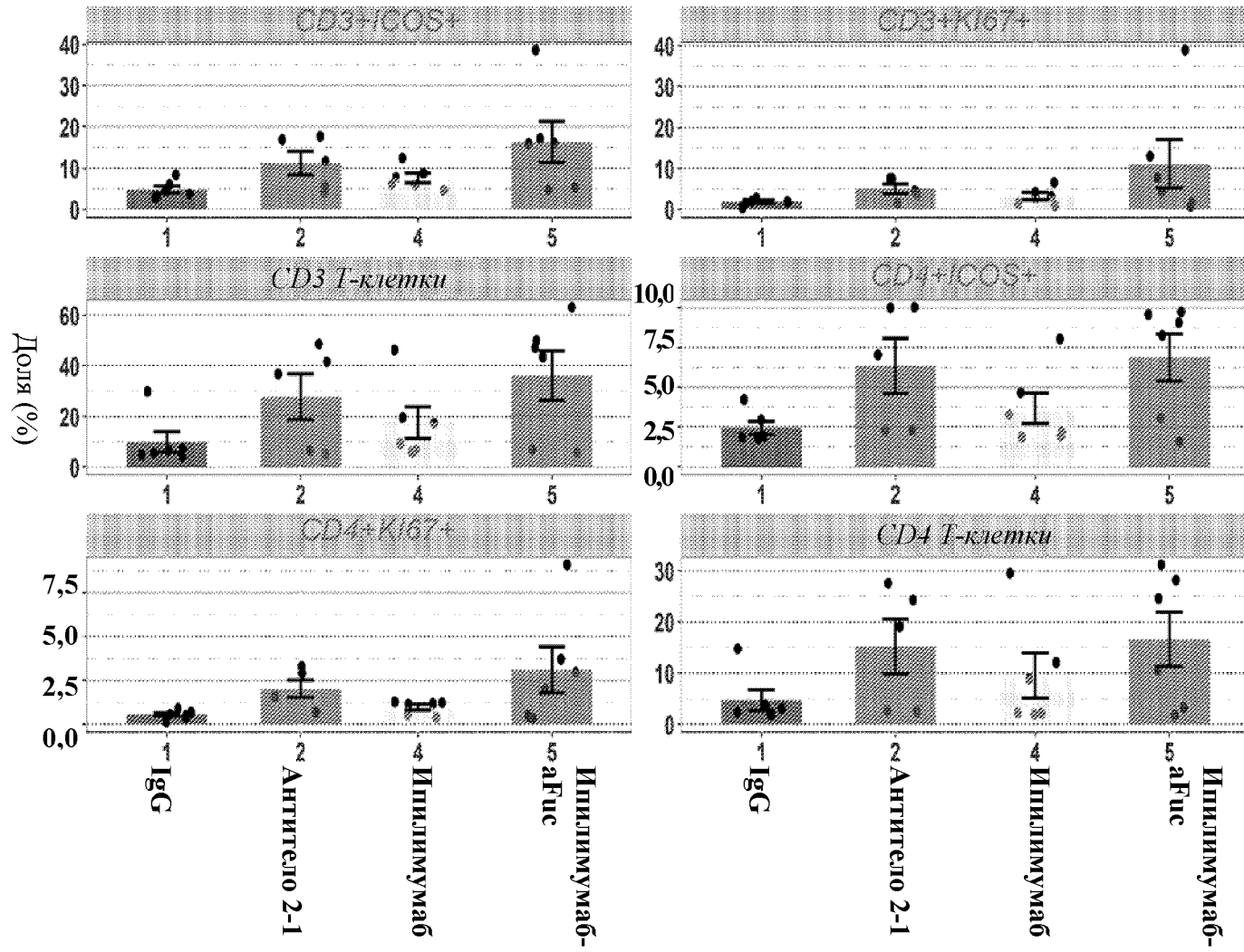
Фиг. 6В

CD45+ клетки селезенки



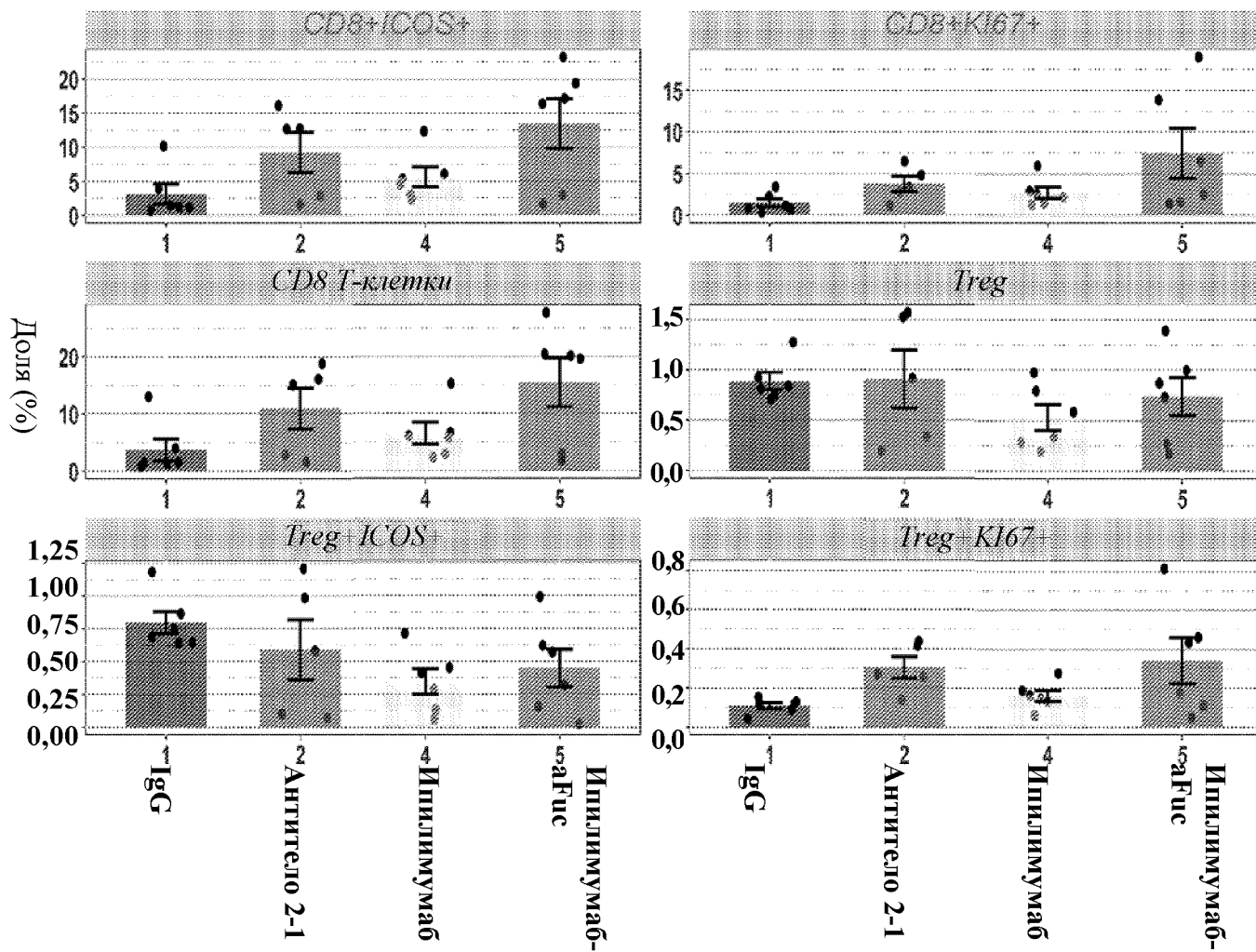
Фиг. 6С

CD45+ клетки внутри опухоли

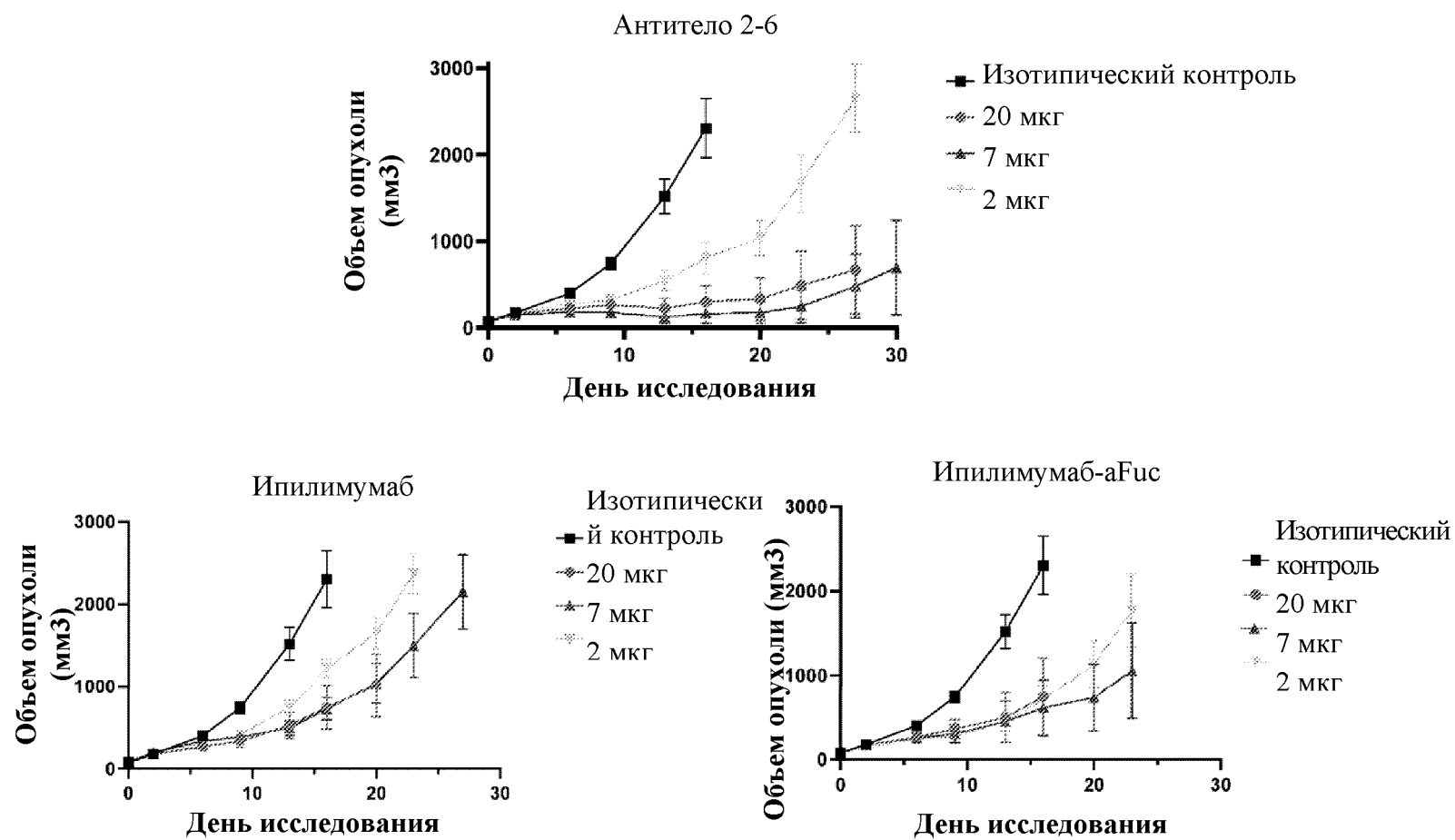


Фиг. 6D

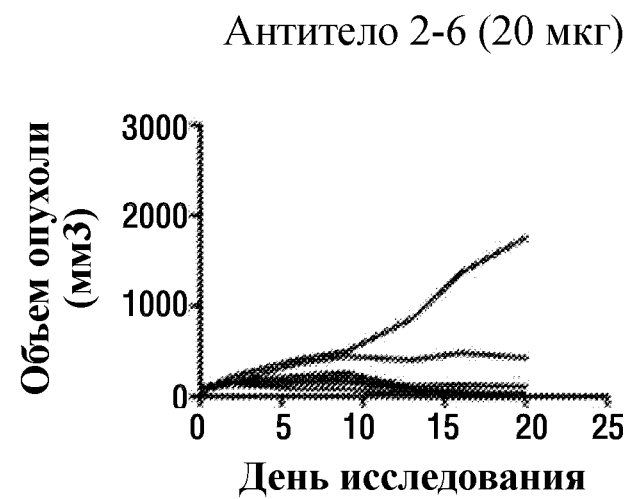
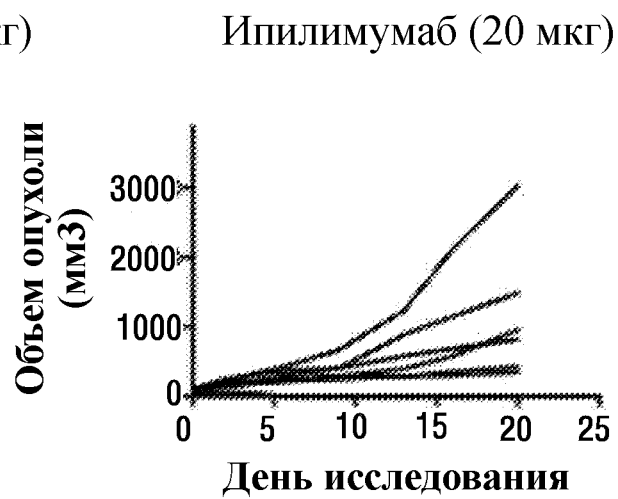
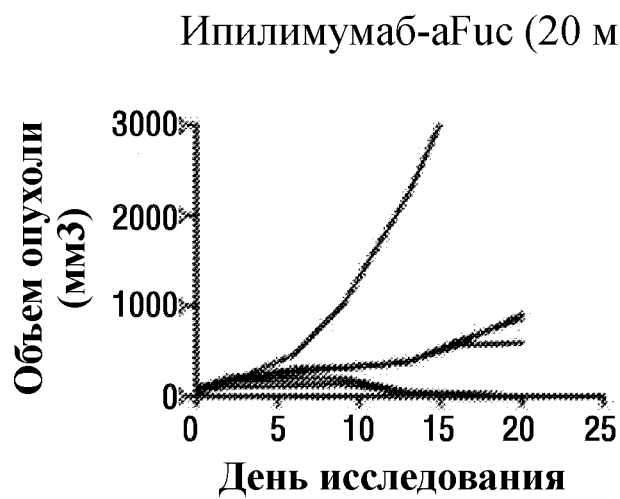
CD45+ клетки внутри опухоли



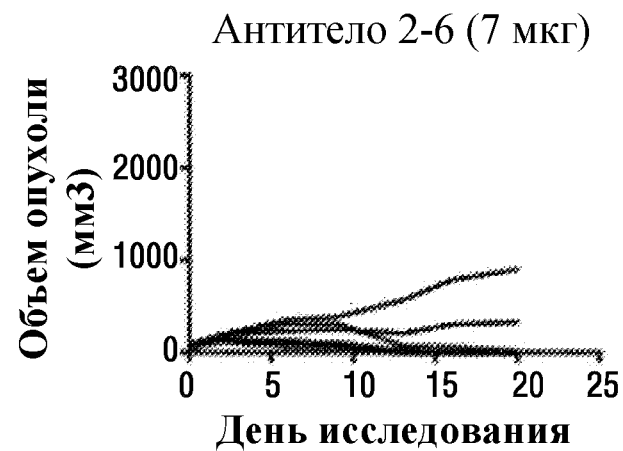
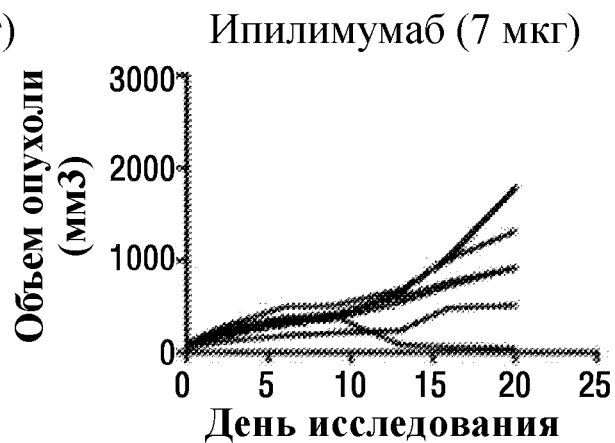
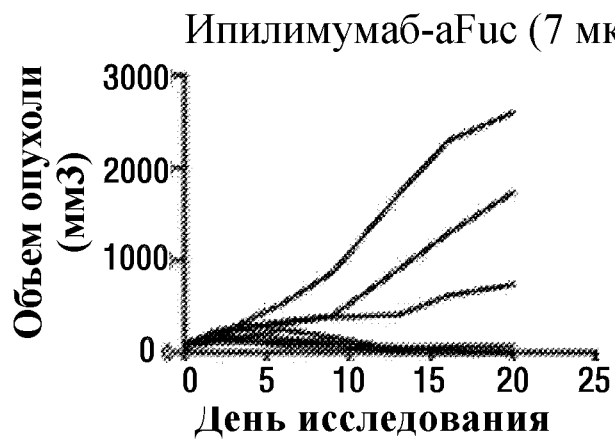
Фиг. 7А



Фиг. 7В

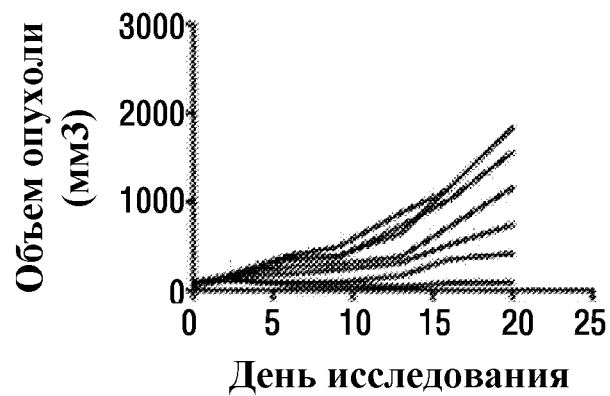


Фиг. 7В (продолжение)

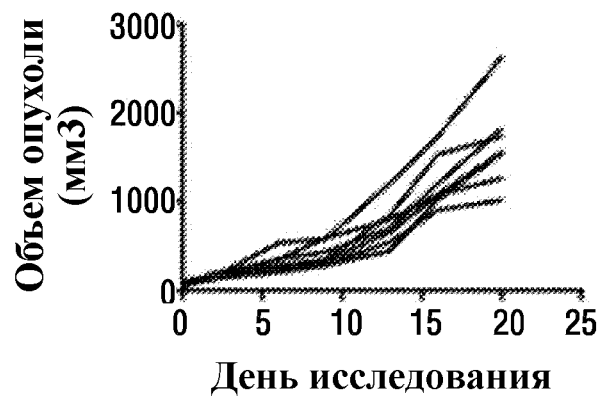


Фиг. 7В (продолжение)

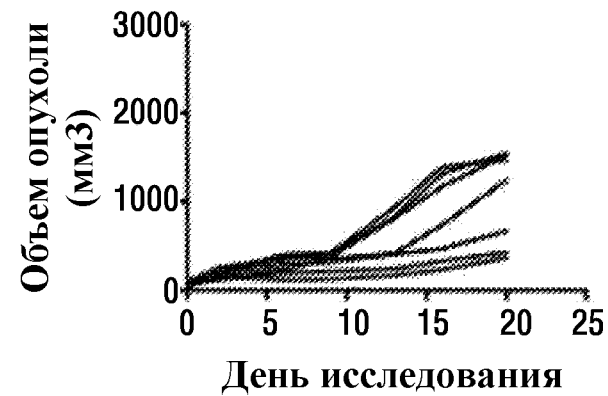
Ипилимумаб-аFuc (2 мкг)



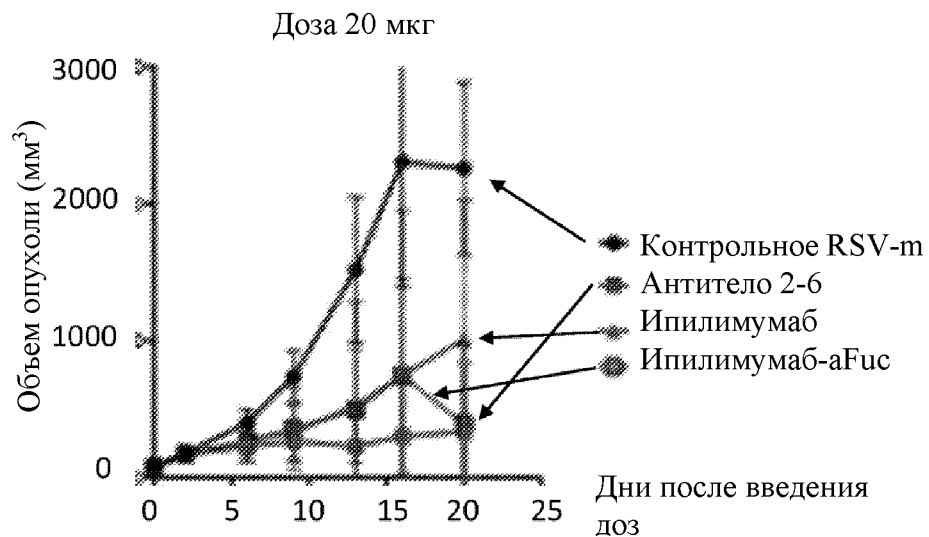
Ипилимумаб (2 мкг)



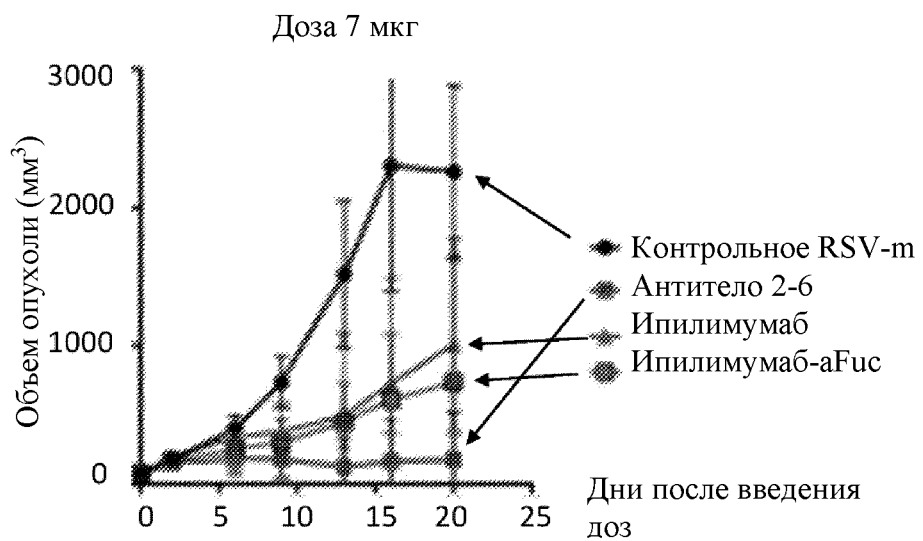
Антитело 2-6 (2 мкг)



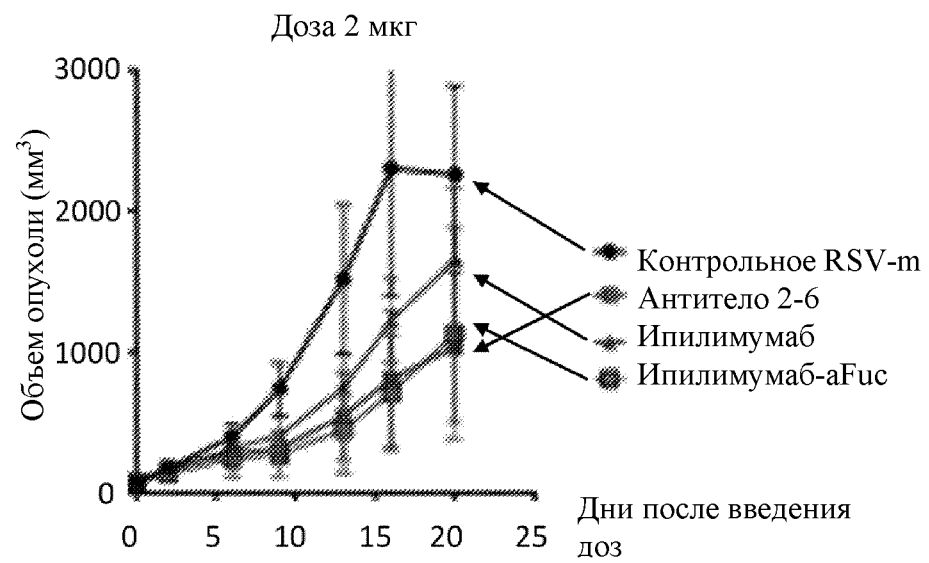
Фиг. 7С



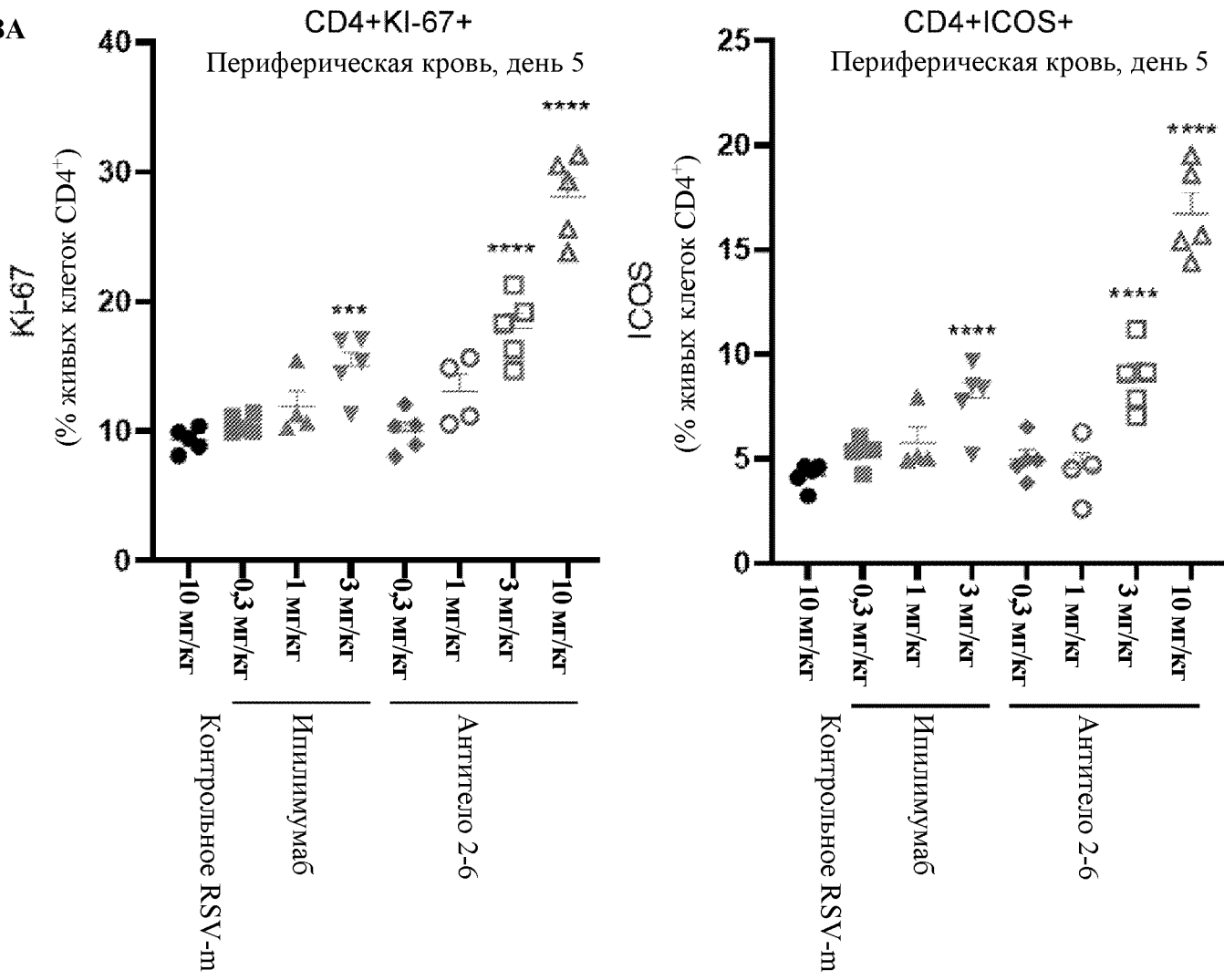
Фиг. 7D



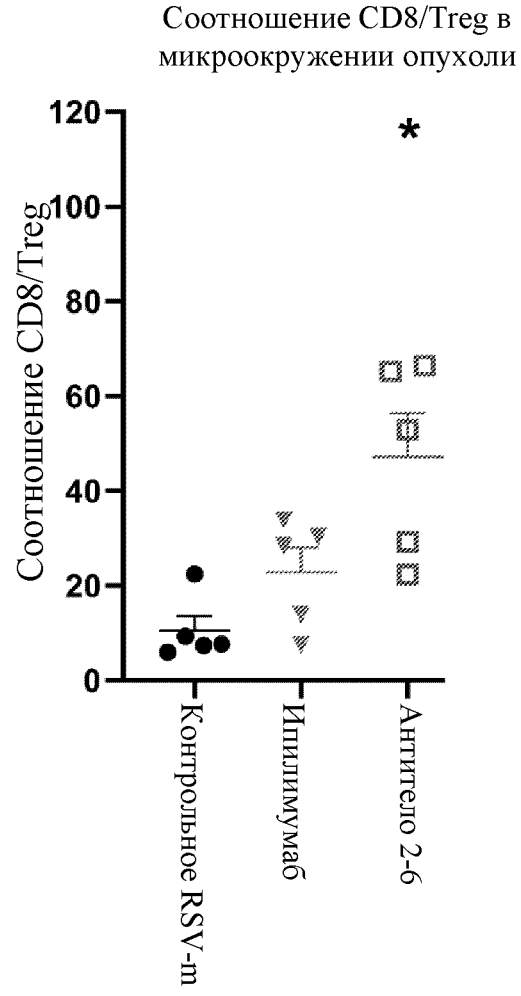
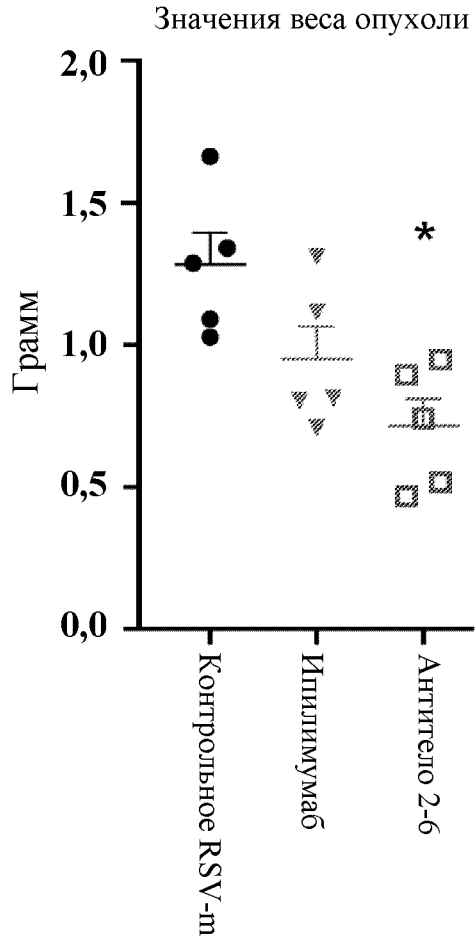
Фиг. 7Е



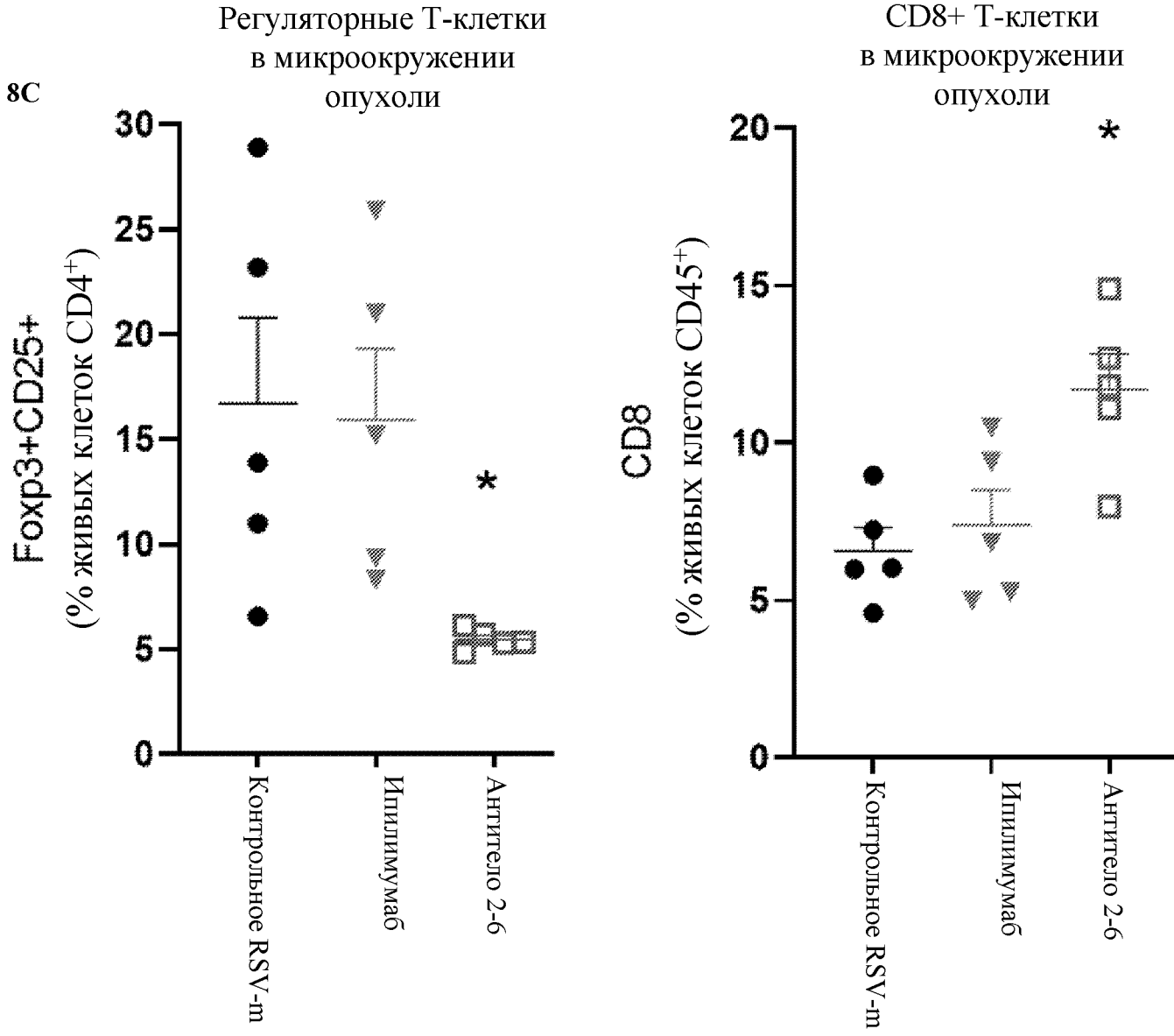
Фиг. 8А



Фиг. 8В

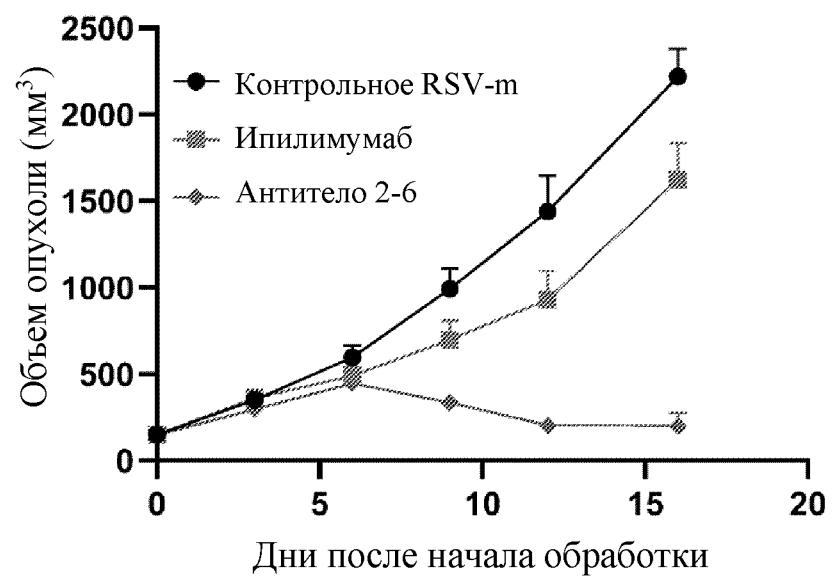


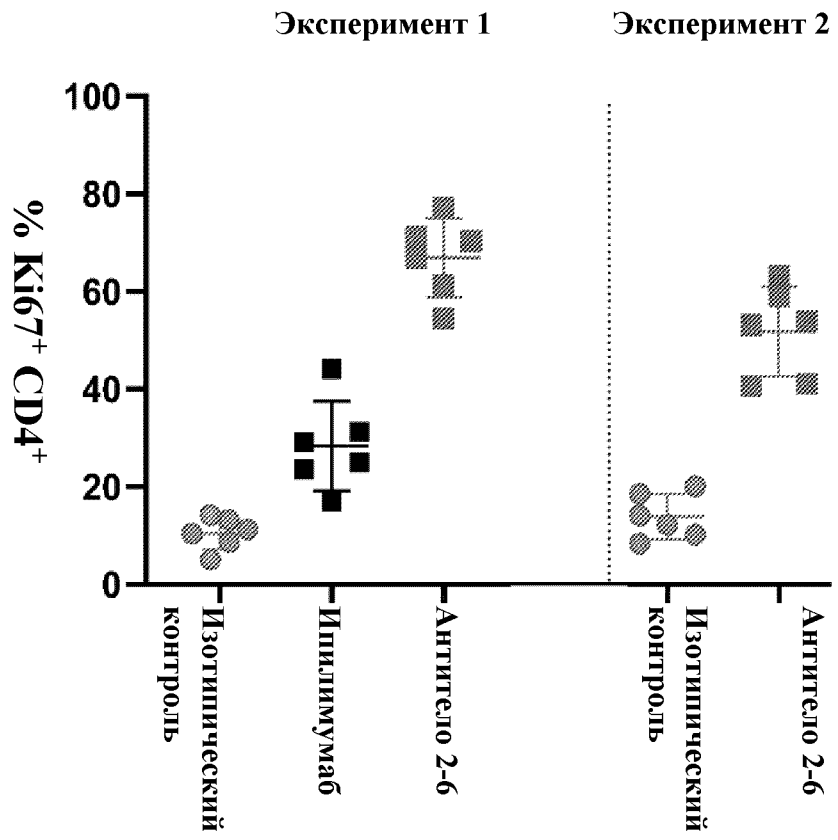
Фиг. 8С



Фиг. 8D

Доза 0,3 мг/кг





Фиг. 9