

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044966**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.18

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201991383

(22) Дата подачи заявки
2017.12.07

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

(31) **62/431,272**

(32) **2016.12.07**

(33) **US**

(43) **2019.12.30**

(86) **PCT/US2017/065011**

(87) **WO 2018/106862 2018.06.14**

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

(72) Изобретатель:
**Ван Дейк Марк (NL), Мундт
Корнелия Анне (DE), Риттер Герд,
Шаер Дэвид, Волчок Джедд Дэвид,
Мергхуб Таха, Уилсон Николас
Стьюарт, Савицкий Дэвид Адам,
Финдеис Марк Артур, Андервуд
Деннис Джон, Кюйеро Жан-Мари,
Проскуршим Игорь, Шебанова Ольга
(US)**

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

(56) **WO-A1-2009100140
WO-A1-2012120125
EP-A1-1262193
WO-A1-2016168809
WO-A1-2016179576**

Elise Drouin ET AL.: "AGEN1884 and AGEN2041: Two functionally distinct anti-CTLA-4 antagonist antibodies", 1 August 2016 (2016-08-01), XP55342395, Retrieved from the Internet: URL: http://agenusbio.com/wp-content/uploads/2016/08/CTLA-4_AACR_04082016_FINAL_POSTER.pdf [retrieved on 2017-02-06] the whole document

**WO-A1-2016196237
WO-A2-2009019312**

(57) Согласно изобретению предложены антитела, которые специфически связываются с СТЛА-4 (например, СТЛА-4 человека) и антагонизируют функцию СТЛА-4. Также предложены фармацевтические композиции, содержащие указанные антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие указанные антитела, экспрессионные векторы и клетки-хозяева для получения указанных антител, и способы лечения субъекта с применением указанных антител.

B1**044966****044966 B1**

Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/431272, поданной 7 декабря 2016 г., которая включена в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), и способам их применения.

Уровень техники

Т-лимфоциты играют ключевую роль в адаптивном иммунном ответе на антиген. По меньшей мере два сигнала необходимы для полной активации необученных Т-клеток (Bretscher 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96:185-90). Первый антигенспецифический сигнал обеспечивает взаимодействие Т-клеточного рецептора (TCR) с МНС/пептидным комплексом на антигенпрезентирующей клетке (АПК). Второй, костимулирующий сигнал обеспечивают взаимодействия между рецепторами на Т-клетке и их лигандами на антигенпрезентирующей клетке (АПК). Привлечение как TCR/МНС, так и костимулирующих взаимодействий приводит к активации Т-клеток через ряд внутриклеточных путей, в том числе путей кальций-кальциневрина и митоген-активируемой протеинкиназы RAS, с последующей активацией транскрипционных факторов ряда эффекторных соединений, в том числе цитокинов, таких как ИЛ-2. Указанные события приводят к пролиферации Т-клеток, продуцированию пула CD4⁺ хелперных Т-клеток (ТН) и размножению активированных CD8⁺ цитотоксических Т-клеток. Костимуляция критически важна не только для полной активации Т-клеток, ее отсутствие при привлечении TCR/МНС приводит к анергии и/или апоптозу.

В регуляцию Т-клеток вовлечено несколько положительных и отрицательных костимулирующих путей; однако наиболее важными являются связанные с CD28 на Т-клетках и В7-1 (CD80) и В7-2 (CD86) на АПК. CD28 способствует дифференцировке Т-клеток в клетки с фенотипом ТН1, а также усиливает продуцирование антител В-клетками и активацию Т-клеток. В7-1 и В7-2, экспрессируемые на таких АПК, как дендритные клетки (ДК) и В-клетки, выполняют пересекающиеся, но разные функции. В7-2 конститутивно экспрессируется и быстро повышающе регулируется на АПК одновременно с привлечением TCR/МНС (сигнал 1). Экспрессия В7-1 очень незначительна на покоящейся клетке, однако, как правило, индуцируется после продолжительной стимуляции Т-клеток. Указанные различия предполагают, что, хотя В7-2 может быть важен для инициации активации Т-клеток, В7-1 может играть более значительную роль в продлении иммунного ответа.

После активации Т-клеток на Т-клетках повышающе регулируется рецептор отрицательной регуляции, антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4) (Alegre et al., 2001, Nat Rev Immunol 1:220-8). CTLA-4 структурно гомологичен CD28, но более плотно связывается с обоими лигандами, В7-1 и В7-2. CTLA-4 ингибирует иммунный ответ несколькими способами: он конкурирует с CD28 за лиганды В7 и, соответственно, блокирует костимуляцию; он обеспечивает отрицательный сигнал для ингибирования активации Т-клеток; и он может захватывать CD80 и CD86 с встречных клеток путем транс-эндоцитоза, что приводит к нарушению костимуляции за счет CD28 (Krummel and Allison, 1995, J Exp Med 182:459-465; Walunas et al., 1994, Immunity 1:405-413; Qureshi et al., 2011, Science 332:600-603).

Учитывая критически важную роль костимулирующего пути В7 в стимуляции и поддержании иммунного ответа, терапевтические агенты, разработанные для антагонизации указанного пути, представляют потенциальный интерес для лечения аутоиммунных заболеваний и расстройств.

Краткое описание изобретения

Согласно настоящему изобретению предложены антитела, которые специфически связываются с CTLA-4 человека и антагонизируют функцию CTLA-4, например, CTLA-4-опосредованное подавление иммунитета. Также предложены фармацевтические композиции, содержащие указанные антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие указанные антитела, экспрессионные векторы и клетки-хозяева для получения указанных антител, а также способы лечения субъекта с применением указанных антител. Описанные в настоящем документе антитела, в частности, подходят для повышения активации Т-клеток в ответ на антиген (например, опухолевый антиген или антиген инфекционного заболевания) и/или снижения опосредованного Трег подавления иммунитета; и, соответственно, для лечения рака у субъекта или для лечения или предотвращения инфекционного заболевания у субъекта.

Соответственно, согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено выделенное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:

- (a) CDRH1 содержит последовательность аминокислот SYSMN (SEQ ID NO: 10);
- (b) CDRH2 содержит последовательность аминокислот SISSSSYIYYAXSVKG (SEQ ID NO: 18), где X представляет собой E или D;
- (c) CDRH3 содержит последовательность аминокислот VGLXGPFDI (SEQ ID NO: 19), где X представляет собой F или M;
- (d) CDRL1 содержит последовательность аминокислот RASQSVSRYLQ (SEQ ID NO: 15);
- (e) CDRL2 содержит последовательность аминокислот GASTRAT (SEQ ID NO: 16) и

(f) CDRL3 содержит последовательность аминокислот QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 17), и последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 указанного антитела не являются последовательностями SEQ ID NO: 10, 11 и 13, соответственно.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная CDRH2 содержит последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 11. Согласно некоторым вариантам реализации указанная CDRH2 содержит последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 12. Согласно некоторым вариантам реализации указанная CDRH3 содержит последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 13. Согласно некоторым вариантам реализации указанная CDRH3 содержит последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 14. Согласно некоторым вариантам реализации CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат последовательности аминокислот CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные в SEQ ID NO: 10, 11, и 14; 10, 12 и 13; или 10, 12 и 14, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат последовательности аминокислот CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные в SEQ ID NO: 10, 12 и 14, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат последовательности аминокислот, представленные в SEQ ID NO: 10, 11, 14, 15, 16 и 17; 10, 12, 13, 15, 16 и 17; или 10, 12, 14, 15, 16 и 17, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат последовательности аминокислот, представленные в SEQ ID NO: 10, 12, 14, 15, 16 и 17, соответственно.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:

(a) CDRH1 содержит последовательность аминокислот SYSMN (SEQ ID NO: 10);

(b) CDRH2 содержит последовательность аминокислот SSSSSSYIYYXSVK (SEQ ID NO: 18), где X представляет собой E или D;

(c) CDRH3 содержит последовательность аминокислот VGLXGPFDI (SEQ ID NO: 19), где X представляет собой F или M;

(d) CDRL1 содержит последовательность аминокислот RASQSVSRYLG (SEQ ID NO: 15);

(e) CDRL2 содержит последовательность аминокислот GASTRAT (SEQ ID NO: 16) и

(f) CDRL3 содержит последовательность аминокислот QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 17),

и последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 указанного антитела не являются последовательностями SEQ ID NO: 10, 11 и 13, соответственно.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная CDRH2 содержит последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 11. Согласно некоторым вариантам реализации указанная CDRH2 содержит последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 12. Согласно некоторым вариантам реализации указанная CDRH3 содержит последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 13. Согласно некоторым вариантам реализации указанная CDRH3 содержит последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 14. Согласно некоторым вариантам реализации CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат последовательности аминокислот CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные в SEQ ID NO: 10, 11, и 14; 10, 12 и 13; или 10, 12 и 14, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат последовательности аминокислот CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные в SEQ ID NO: 10, 12 и 14, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат последовательности аминокислот, представленные в SEQ ID NO: 10, 11, 14, 15, 16 и 17; 10, 12, 13, 15, 16 и 17; или 10, 12, 14, 15, 16 и 17, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат последовательности аминокислот, представленные в SEQ ID NO: 10, 12, 14, 15, 16 и 17, соответственно.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат последовательности аминокислот, представленные в SEQ ID NO: 10, 12, 14, 15, 16 и 17, соответственно.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 4-8. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 4-8. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 8. Согласно некото-

линии человека (например,IGHV3-21*01, например, с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 21); и варибельную область легкой цепи, имеющую последовательность аминокислот, происходящую из последовательности IGKV3-20*01 зародышевой линии человека (например, IGKV3-20*01, например, с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 22).

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂ человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанная константная область тяжелой цепи представляет собой соответствующую область IgG₁. Согласно некоторым вариантам реализации указанная константная область тяжелой цепи представляет собой соответствующую область IgG₂. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из Igκ и Igλ, человека.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG₁. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 28. Согласно определенному варианту реализации указанная последовательность аминокислот константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит мутации S239D/I332E в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 29. Согласно некоторым вариантам реализации указанная последовательность аминокислот константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит мутации S239D/A330L/I332E в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам реализации указанная последовательность аминокислот константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит мутации L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 31. Согласно некоторым вариантам реализации указанная константная область тяжелой цепи IgG₁ представляет собой афукозилированную область IgG₁.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG человека, которая представляет собой вариант константной области тяжелой цепи IgG человека дикого типа, причем указанный вариант константной области тяжелой цепи IgG человека связывается с FcγRIIIA с более высокой аффинностью, чем константная область тяжелой цепи IgG человека дикого типа связывается с FcγRIIIA. Согласно некоторым вариантам реализации указанный вариант константной области тяжелой цепи IgG человека представляет собой вариант константной области тяжелой цепи IgG₁ человека.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из Igκ и Igλ человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область легкой цепи Igκ. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 32.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое перекрестно конкурирует за связывание с CTLA-4 человека с антителом, описанным в настоящем документе. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое перекрестно конкурирует за связывание с CTLA-4 человека с антителом, содержащим последовательности аминокислот варибельных областей тяжелой и легкой цепей, представленные в SEQ ID NO: 8 и 9, соответственно.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое связывается с тем же эпитопом на CTLA-4 человека, что и антитело, описанное в настоящем документе. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое связывается с тем же эпитопом на CTLA-4 человека, что и антитело, содержащее последовательности аминокислот варибельных областей тяжелой и легкой цепей, представленные в SEQ ID NO: 8 и 9, соответственно.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое связывается, например, специфически связывается, с эпитопом CTLA-4 человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело связывается с эпитопом, локализованным в области CTLA-4 человека, состоящей из последовательности аминокислот, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-39. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело связывается с эпитопом, локализованным в области CTLA-4 человека, состоящей из последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 37. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело связывается с эпитопом, локализованным в области CTLA-4 человека, состоящей из последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 36. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело связывается с эпитопом, локализованным в области CTLA-4 человека, состоящей из последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 35. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело связывается с эпитопом, локализованным в

настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело при связывании с белком CTLA-4 человека или его фрагментом, например, содержащим последовательность аминокислот из остатков 37-162 последовательности SEQ ID NO: 33, уменьшает обмен водорода на дейтерий в области, состоящей из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 34, относительно обмена водорода на дейтерий в области, состоящей из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 34, в отсутствие указанного антитела, по оценке с применением анализа методом водородно-дейтериевого обмена. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело при связывании с белком CTLA-4 человека или его фрагментом, например, содержащим последовательность аминокислот из остатков 37-162 последовательности SEQ ID NO: 33, уменьшает обмен водорода на дейтерий в области, состоящей из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 35, относительно обмена водорода на дейтерий в области, состоящей из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 35, в отсутствие указанного антитела, по оценке с применением анализа методом водородно-дейтериевого обмена. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело при связывании с белком CTLA-4 человека или его фрагментом, например, содержащим последовательность аминокислот из остатков 37-162 последовательности SEQ ID NO: 33, уменьшает обмен водорода на дейтерий в области, состоящей из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 36, относительно обмена водорода на дейтерий в области, состоящей из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 36, в отсутствие указанного антитела, по оценке с применением анализа методом водородно-дейтериевого обмена. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело, при связывании с белком CTLA-4 человека или его фрагментом, например, содержащим последовательность аминокислот из остатков 37-162 последовательности SEQ ID NO: 33, уменьшает обмен водорода на дейтерий в области, состоящей из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 37, относительно обмена водорода на дейтерий в области, состоящей из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 37, в отсутствие указанного антитела, по оценке с применением анализа методом водородно-дейтериевого обмена. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело, при связывании с белком CTLA-4 человека или его фрагментом, например, содержащим последовательность аминокислот из остатков 37-162 последовательности SEQ ID NO: 33, уменьшает обмен водорода на дейтерий в области, состоящей из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 38, относительно обмена водорода на дейтерий в области, состоящей из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 38, в отсутствие указанного антитела, по оценке с применением анализа методом водородно-дейтериевого обмена. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело, при связывании с белком CTLA-4 человека или его фрагментом, например, содержащим последовательность аминокислот из остатков 37-162 последовательности SEQ ID NO: 33, уменьшает обмен водорода на дейтерий в области, состоящей из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 39, относительно обмена водорода на дейтерий в области, состоящей из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 39, в отсутствие указанного антитела, по оценке с применением анализа методом водородно-дейтериевого обмена.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой антитело человека. Согласно определенному варианту реализации указанное антитело представляет собой биспецифическое антитело.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело является антагонистическим в отношении CTLA-4 человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело деактивирует, уменьшает или ингибирует активность CTLA-4 человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело ингибирует связывание CTLA-4 человека с CD80 человека или CD86 человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело индуцирует продуцирование ИЛ-2 мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК), стимулированными стафилококковым энтеротоксином А (SEA).

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом, цитостатическим агентом, токсином, радионуклидом или детектируемой меткой.

Согласно некоторым вариантам реализации N-концевой остаток аминокислоты вариabельной области тяжелой цепи и/или вариabельной области легкой цепи указанного антитела был преобразован в пироглутамат.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу согласно настоящему изобретению для применения в качестве медикамента.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к применению антитела согласно настоящему изобретению для получения фармацевтических композиций или медикаментов для иммунотерапии. Согласно некоторым вариантам реализации указанная иммунотерапия предназначена для повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, необязательно для лечения ракового заболевания, или лечения или предотвращения инфекционных заболеваний.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу согласно настоящему изобретению для применения в качестве диагностического агента.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к применению антитела согласно настоящему изобретению для *in vitro* детекции CTLA-4 человека в биологическом образце.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено фармацевтическая композиция, содержащая антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую и/или легкую цепь антитела, описанного в настоящем документе. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен вектор, содержащий указанный полинуклеотид. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая указанный полинуклеотид или указанный вектор. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ получения антитела, которое связывается с CTLA-4 человека, при этом указанный способ включает культивирование клетки-хозяина таким образом, чтобы происходила экспрессия указанного полинуклеотида и продуцирование указанного антитела.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества антитела против CTLA-4 или фармацевтической композиции, описанных в настоящем документе. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения рака у субъекта, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества антитела против CTLA-4 или фармацевтической композиции, описанных в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект страдает раком. Согласно некоторым вариантам реализации у указанного субъекта имеется метастатическая или местнораспространенная опухоль (например, солидная опухоль). Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак лечат в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, в качестве первой противораковой терапии после диагностирования указанной метастатической или местнораспространенной опухоли (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования). Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак лечат в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, в качестве первой противораковой терапии после диагностирования прогрессирования опухоли (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования прогрессирования опухоли), которое произошло несмотря на предшествующее лечение указанной опухоли с применением другой противораковой терапии, при этом необязательно способ, описанный в настоящем документе, применяют в качестве второй применяемой противораковой терапии. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак лечат в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, в качестве первой противораковой терапии после диагностирования токсичности другой противораковой терапии (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования токсичности другой противораковой терапии), при этом необязательно способ, описанный в настоящем документе, применяют в качестве второй применяемой противораковой терапии. Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой метастатический или местнораспространенный рак (например, солидную опухоль), доступная стандартная терапия для лечения которого отсутствует. Согласно другим вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой метастатический или местнораспространенный рак (например, солидную опухоль), лечение которого с применением стандартной терапии было неуспешным (т.е. указанный рак прогрессировал после проведения стандартной терапии). Согласно некоторым вариантам реализации терапия является неуспешной, если рак рефрактерен к указанной терапии. Согласно некоторым вариантам реализации терапия является неуспешной, если рак рецидивирует после ответа, полного или частичного, на указанную терапию. Согласно некоторым вариантам реализации метастатический или местнораспространенный рак (например, солидная опухоль) был подтвержден гистологически или цитологически.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак экспрессирует PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце рака, демонстрирующих детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 1% (например, по меньшей мере 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%). Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце рака, демонстрирующих детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 1%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце рака, демонстрирующих детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 5%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце рака, демонстрирующих детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 25%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце рака, демонстрирующих детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 50%.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная метастатическая или местнораспространенная опухоль экспрессирует PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатической или местнораспространенной опухоли, которая демонстрирует детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 1% (например, по меньшей мере 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%). Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатической или местнораспространенной опухоли, которая демонстрирует детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 1%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатической или местнораспространенной опухоли, которая демонстрирует детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 5%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатической или местнораспространенной опухоли, которая демонстрирует детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 25%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатической или местнораспространенной опухоли, которая демонстрирует детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 50%.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой рак шейки матки. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой метастатический или местнораспространенный рак (например, солидную опухоль). Согласно некоторым вариантам реализации указанный метастатический или местнораспространенный рак (например, солидная опухоль) представляет собой метастатическую или местнораспространенную нерезектабельную плоскоклеточную карциному, железисто-плоскоклеточную карциному или аденокарциному шейки матки. Согласно некоторым вариантам реализации доступная стандартная терапия для указанного рака (например, рака шейки матки), или метастатической или местнораспространенной опухоли (например, солидной опухоли) отсутствует. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак (например, рак шейки матки), или метастатическая или местнораспространенная опухоль (например, солидная опухоль) является рефрактерным или рефрактерной к стандартной терапии. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак (например, рак шейки матки), или метастатическая или местнораспространенная опухоль (например, солидная опухоль) рецидивировал(а) после стандартной терапии. Согласно некоторым вариантам реализации указанная стандартная терапия включает платиносодержащую химиотерапию. Согласно некоторым вариантам реализации указанная стандартная терапия представляет собой двухкомпонентную платиносодержащую химиотерапию. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак (например, рак шейки матки) представляет собой метастатическую или местнораспространенную нерезектабельную плоскоклеточную карциному, железисто-плоскоклеточную карциному или аденокарциному шейки матки, которая рецидивировала после двухкомпонентной платиносодержащей химиотерапии, проведенной для лечения распространенного (рецидивирующего, нерезектабельного или метастатического) заболевания. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак (например, рак шейки матки), или указанная метастатическая или местнораспространенная опухоль являются ВПЧ-положительными. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак, или указанная метастатическая или местнораспространенная солидная опухоль представляет собой рак головы и шеи, меланому, почечноклеточный рак, уротелиальную карциному или карциному эндометрия. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак (например, рак шейки матки), или указанная метастатическая или местнораспространенная солидная опухоль ассоциирован(а) с микросателлитной нестабильностью.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект страдает раком шейки матки (например, метастатической или местнораспространенной нерезектабельной плоскоклеточной карциномой, железисто-плоскоклеточной карциномой или аденокарциномой шейки матки), а указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества антитела против CTLA-4, описанного в настоящем документе, например, AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E), или фармацевтической композиции, содержащей такое антитело против CTLA-4, в качестве первой противораковой терапии после диагностирования рака шейки матки (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования), при этом необязательно антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, например, AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E), или фармацевтическую композицию, содержащую такое антитело против CTLA-4, вводят в дозировке и с частотой, которые выбраны из группы, состоящей из 0,3 мг/кг каждые четыре недели, 1 мг/кг каждые четыре недели, 3 мг/кг каждые четыре недели, 0,3 мг/кг каждые шесть недель, 1 мг/кг каждые шесть недель, 3 мг/кг каждые шесть недель, 0,3 мг/кг каждые 12 недель, 1 мг/кг каждые 12 недель и 3 мг/кг каждые 12 недель. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект страдает раком шейки матки (например, метастатической или местнораспространенной нерезектабельной плоскоклеточной карциномой, железисто-плоскоклеточной карциномой или аденокарциномой шейки матки), а указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества терапевтической комбинации,

содержащей антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, например, AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E), или фармацевтическую композицию, содержащую такое антитело против CTLA-4, и пембролизумаб, в качестве первой противораковой терапии после диагностирования рака шейки матки (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования), при этом необязательно антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, например, AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E), или фармацевтическую композицию, содержащую такое антитело против CTLA-4, вводят в дозировке и с частотой, которые выбраны из группы, состоящей из 0,3 мг/кг каждые четыре недели, 1 мг/кг каждые четыре недели, 3 мг/кг каждые четыре недели, 0,3 мг/кг каждые шесть недель, 1 мг/кг каждые шесть недель, 3 мг/кг каждые шесть недель, 0,3 мг/кг каждые 12 недель, 1 мг/кг каждые 12 недель и 3 мг/кг каждые 12 недель, а пембролизумаб вводят в дозе 200 мг каждые три недели.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). Согласно некоторым вариантам реализации указанный НМРЛ представляет собой НМРЛ IV стадии. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце НМРЛ, которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 1% (например, по меньшей мере 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%). Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце НМРЛ, которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 1%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце НМРЛ, которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 5%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце НМРЛ, которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 25%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце НМРЛ, которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 50%. Согласно некоторым вариантам реализации указанный НМРЛ не характеризуется геномными опухолевыми абберациями рЭФР или ALK (киназы анапластической лимфомы). Согласно некоторым вариантам реализации указанный метастатический или местнораспространенный НМРЛ не характеризуется сенситизирующей мутацией рЭФР (например, мутацией, которая поддается лечению ингибитором тирозинкиназы, в том числе эрлотинибом, гефинитибом или афатинибом) или транслокацией ALK. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект ранее не получал системного химиотерапевтического лечения НМРЛ.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная метастатическая или местнораспространенная солидная опухоль представляет собой метастатический или местнораспространенный немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). Согласно некоторым вариантам реализации указанная метастатическая или местнораспространенная солидная опухоль представляет собой метастатический немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). Согласно некоторым вариантам реализации указанная метастатическая или местнораспространенная солидная опухоль представляет собой, метастатический или местнораспространенный НМРЛ IV стадии. Согласно некоторым вариантам реализации указанная метастатическая или местнораспространенная солидная опухоль представляет собой метастатический НМРЛ IV стадии. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатического или местнораспространенного НМРЛ, которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 1% (например, по меньшей мере 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%). Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатического или местнораспространенного НМРЛ, которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 1%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатического или местнораспространенного НМРЛ, которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 5%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатического или местнораспространенного НМРЛ, которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 25%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатического или местнораспространенного НМРЛ, которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 50%. Согласно некоторым вариантам реализации указанный метастатический или местнораспространенный НМРЛ не характеризуется геномными опухолевыми абберациями рЭФР или ALK. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект ранее не получал системного химиотерапевтического лечения метастатического или местнораспространенного НМРЛ.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект страдает НМРЛ (например, метастатическим или местнораспространенным НМРЛ IV стадии), необязательно отличающимся тем, что процент опухолевых клеток в образце НМРЛ, которые демонстрируют детектируемую экспрессию (например, мембранную экспрессию, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%, а указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества антитела против CTLA-4, описанного в настоящем документе, например, AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E), или фармацевтической композиции, содержащей такое антитело против CTLA-4, в качестве первой противораковой терапии после диагностирования рака шейки матки (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования), при этом необязательно антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, например, AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E), или фармацевтическую композицию, содержащую такое антитело против CTLA-4, вводят в дозировке и с частотой, которые выбраны из группы, состоящей из 0,3 мг/кг каждые четыре недели, 1 мг/кг каждые четыре недели, 3 мг/кг каждые четыре недели, 0,3 мг/кг каждые шесть недель, 1 мг/кг каждые шесть недель, 3 мг/кг каждые шесть недель, 0,3 мг/кг каждые 12 недель, 1 мг/кг каждые 12 недель, и 3 мг/кг каждые 12 недель. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект страдает НМРЛ (например, метастатическим или местнораспространенным НМРЛ IV стадии), необязательно отличающимся тем, что процент опухолевых клеток в образце НМРЛ, которые демонстрируют детектируемую экспрессию (например, мембранную экспрессию, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%, а указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтической комбинации, содержащей антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, например, AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E), или фармацевтической композиции, содержащей такое антитело против CTLA-4, и пембролизумаб, в качестве первой противораковой терапии после диагностирования рака шейки матки (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования), при этом необязательно антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, например, AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E), или фармацевтическую композицию, содержащую такое антитело против CTLA-4, вводят в дозировке и с частотой, которые выбраны из группы, состоящей из 0,3 мг/кг каждые четыре недели, 1 мг/кг каждые четыре недели, 3 мг/кг каждые четыре недели, 0,3 мг/кг каждые шесть недель, 1 мг/кг каждые шесть недель, 3 мг/кг каждые шесть недель, 0,3 мг/кг каждые 12 недель, 1 мг/кг каждые 12 недель, и 3 мг/кг каждые 12 недель, а пембролизумаб вводят в дозе 200 мг каждые три недели.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой кожную плоскоклеточную карциному (cSCC). Согласно некоторым вариантам реализации указанная метастатическая или местнораспространенная солидная опухоль представляет собой кожную плоскоклеточную карциному (cSCC) IV стадии. Согласно некоторым вариантам реализации указанную cSCC диагностируют гистологически или цитологически в соответствии с 8-м изданием руководства по стадированию рака Американского объединенного онкологического комитета. Согласно некоторым вариантам реализации указанная cSCC не излечима с помощью лучевой терапии. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект страдает cSCC (например, cSCC IV стадии), а указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества антитела против CTLA-4, описанного в настоящем документе, например, AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E), или фармацевтической композиции, содержащей такое антитело против CTLA-4, в качестве первой противораковой терапии после диагностирования cSCC (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования), при этом необязательно антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, например, AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E), или фармацевтическую композицию, содержащую такое антитело против CTLA-4, вводят в дозировке и с частотой, которые выбраны из группы, состоящей из 0,3 мг/кг каждые четыре недели, 1 мг/кг каждые четыре недели, 3 мг/кг каждые четыре недели, 0,3 мг/кг каждые шесть недель, 1 мг/кг каждые шесть недель, 3 мг/кг каждые шесть недель, 0,3 мг/кг каждые 12 недель, 1 мг/кг каждые 12 недель, и 3 мг/кг каждые 12 недель. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект страдает cSCC (например, cSCC IV стадии), а указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества терапевтической комбинации, содержащей антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, например, AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E), или фармацевтической композиции, содержащей такое антитело против CTLA-4, и пембролизумаб, в качестве первой противораковой терапии после диагностирования cSCC (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования), при этом необязательно антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, например, AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E), или фармацевтическую композицию, содержащую такое антитело против CTLA-4, вводят в дозировке и с частотой, которые выбраны из группы, состоящей из 0,3 мг/кг каждые четыре недели, 1 мг/кг каждые четыре недели, 3 мг/кг каждые четыре недели, 0,3 мг/кг каждые шесть недель, 1 мг/кг каждые шесть недель, 3 мг/кг каждые шесть недель, 0,3 мг/кг каждые 12 недель, 1 мг/кг каждые 12 недель, и 3 мг/кг каждые 12 недель, а пембролизумаб вводят в дозе 200 мг каждые три недели.

те доставляют в дренирующий опухоль лимфатический узел. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе доставляют посредством локализованного введения (например, подкожного введения). Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе доставляют посредством локализованного введения (например, подкожного введения) в дозе 0,01 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе доставляют посредством локализованного введения (например, подкожного введения) в дозе, вплоть до 5-кратно, 10-кратно, 20-кратно, 30-кратно, 40-кратно, 50-кратно, 60-кратно, 70-кратно, 80-кратно, 90-кратно, 100-кратно или 200-кратно более низкой, чем доза при системном введении. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе доставляют посредством локализованного введения (например, подкожного введения) в дозе, вплоть до 10-кратно более низкой, чем доза при системном введении. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе доставляют посредством локализованного введения (например, подкожного введения) в дозе, вплоть до 100-кратно более низкой, чем доза при системном введении. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе доставляют посредством локализованного введения (например, подкожного введения), и указанный способ дополнительно включает введение дополнительного терапевтического агента указанному субъекту. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой вакцину. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вакцина содержит комплекс белка теплового шока с пептидом (HSPPC), содержащий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом. Согласно одному варианту реализации указанный белок теплового шока представляет собой белок gp96 и входит в комплекс с опухолассоциированным антигенным пептидом, при этом указанный HSPPC происходит из опухоли, полученной от субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации указанный белок теплового шока выбран из группы, состоящей из hsc70, hsp70, hsp90, hsp110, grp170, gp96, кальретикулина, мутантов и комбинаций двух или более перечисленных белков. Согласно некоторым вариантам реализации указанный белок теплового шока представляет собой hsc70. Согласно некоторым вариантам реализации указанный белок теплового шока представляет собой hsp70. Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенный пептид является синтетическим. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект страдает раком. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект страдает инфекционным заболеванием. Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы дополнительно включают введение дополнительного терапевтического агента указанному субъекту. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтическое средство или нацеленный на контрольные точки агент. Согласно некоторым вариантам реализации указанный нацеленный на контрольные точки агент выбран из группы, состоящей из антитела-антагониста против PD-1, антитела-антагониста против PD-L1, антитела-антагониста против PD-L2, антитела-антагониста против CTLA-4, антитела-антагониста против TIM-3, антитела-антагониста против LAG-3, антитела-антагониста против CEACAM1, антитела-агониста против GITR, антитела-агониста против OX40 и антитела-агониста против CD137, антитела-агониста против DR3, антитела-агониста против TNFSF14, и антитела-агониста против CD27. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой радиационную терапию. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО). Подходящие ингибиторы ИДО включают, без ограничения, эпакадостат, F001287, индоксимод и NLG919. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой вакцину. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вакцина содержит комплекс белка теплового шока с пептидом (HSPPC), содержащий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом. Согласно одному варианту реализации указанный белок теплового шока представляет собой белок gp96 и входит в комплекс с опухолассоциированным антигенным пептидом, при этом указанный HSPPC происходит из опухоли, полученной от субъекта.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения инфекционного заболевания у субъекта, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества антитела против CTLA-4 или фармацевтической композиции, описанных в настоящем документе. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ предотвращения инфекционного заболевания у субъекта, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества антитела против CTLA-4 или фармацевтической композиции, описанных в настоящем документе.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу согласно настоящему изобретению, полинуклеотиду согласно настоящему изобретению, вектору согласно настоящему изобретению и/или рекомбинантной клетке-хозяину согласно настоящему изобретению для применения в качестве медикамента.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу согласно настоящему изобретению, полинуклеотиду согласно настоящему изобретению, вектору согласно настоящему изобретению и/или рекомбинантной клетке-хозяину согласно настоящему изобретению для применения в качестве диагностического агента.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к применению антитела согласно настоящему изобретению, полинуклеотида согласно настоящему изобретению, вектора согласно настоящему изобретению и/или рекомбинантной клетки-хозяина согласно настоящему изобретению для *in vitro* детекции СТЛА-4 человека в биологическом образце.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против СТЛА-4, описанное в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, для применения в качестве медикамента.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против СТЛА-4, описанное в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, для применения в качестве диагностического агента.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против СТЛА-4, описанное в настоящем документе, полинуклеотид согласно настоящему изобретению, вектор согласно настоящему изобретению и/или рекомбинантную клетку-хозяина согласно настоящему изобретению, и фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Согласно одному аспекту указанная фармацевтическая композиция предназначена для применения в качестве медикамента и/или диагностического агента.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения в способе повышения активации Т-клеток в ответ на антиген.

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

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

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

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

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

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению; и (b) дополнительному терапевтическому агенту, предпочтительно, антителу против PD-1, для применения в качестве медикамента.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению; и (b) дополнительному терапевтическому агенту, предпочтительно, антителу против PD-1, для применения в способе лечения рака. Согласно предпочтительному варианту реализации указанный рак представляет собой солидную опухоль. Согласно другому предпочтительному варианту реализации указанные антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят внутрь опухоли указанному субъекту, предпочтительно, вводят внутрь опухоли указанному субъекту в дозе 0,01 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг, необязательно с интервалом один раз в три недели.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или составному набору, содержащим (а) антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению; и (b) дополнительный терапевтический агент, предпочтительно, антитело против PD-1.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобре-

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения в способе лечения рака и/или для применения в способе повышения активации Т-клеток в ответ на антиген, отличающемся тем, что указанные антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяину и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению доставляют в дренирующий опухоль лимфатический узел.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к применению антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению в способе лечения рака и/или в способе повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, отличающемся тем, что указанные антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяину и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению доставляют в дренирующий опухоль лимфатический узел.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к применению антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для получения медикаментов для иммунотерапии, например, для повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, лечения рака, или лечения или предотвращения инфекционных заболеваний.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к применению антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для получения медикаментов для иммунотерапии, например, для повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, лечения рака, или лечения или предотвращения инфекционных заболеваний, отличающемся тем, что указанные антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяину и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению доставляют в дренирующий опухоль лимфатический узел.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к применению (а) антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению и (b) антитела против HER2; и, необязательно, (c) химиотерапевтического агента, для получения медикамента для иммунотерапии, например, для повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, лечения рака, или лечения или предотвращения инфекционных заболеваний.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к применению (а) антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению и (b) антитела против HER2; и, необязательно, (c) химиотерапевтического агента, для получения медикамента для иммунотерапии, например, для повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, лечения рака, или лечения или предотвращения инфекционных заболеваний, отличающемся тем, что указанные антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяину и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению доставляют в дренирующий опухоль лимфатический узел.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A-1G приведены гистограммы проточной цитометрии, отражающие связывание антител против CTLA-4 или изотипического контрольного антитела IgG₁ с клетками Jurkat, сконструированными для экспрессии CTLA-4 человека на поверхности клеток. Тестировали следующие антитела против CTLA-4: AGEN1884.H1.1 (IgG₁), AGEN1884.H1.2 (IgG₁), AGEN1884.H1.3 (IgG₁), AGEN1884.H2.1 (IgG₁), AGEN1884.H2.2 (IgG₁), AGEN1884.H2.3 (IgG₁) AGEN1884.H3 (IgG₁).

На фиг. 2 приведен график, отражающий продуцирование ИЛ-2 первичными МПКК человека после инкубации при субоптимальной стимуляции суперантигеном стафилококкового энтеротоксина А (SEA) в отсутствие или в присутствии антитела против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁) или изотипического контрольного антитела (IgG₁). Анализ проводили в 8 повторностях для каждой группы; средние значения для 8 повторностей отмечены линией черного цвета.

На фиг. 3 приведен график, отражающий результаты ИЛ-2-люциферазного репортерного анализа, демонстрирующие, что блокада CTLA-4 приводит к активации Т-клеток. Приведен график зависимости кратности ответа в виде экспрессии люциферазы, суррогатного маркера активации гена ИЛ-2, от диапазона концентраций антитела AGEN1884.H3 (IgG₁) или изотипического контрольного антитела (IgG₁).

На фиг. 4 приведен график, отражающий результаты репортерного анализа, где одновременное привлечение AGEN1884.H3 (IgG₁) к целевым клеткам (путем связывания CTLA-4) и эффекторным клеткам (путем связывания FcγRIIIA) запускает экспрессию люциферазы клетками эффекторной линии. Активность люциферазы представляет собой суррогатный маркер FcγRIIIA-сигнализации. Приведен график зависимости кратности ответа в виде значений RLU от диапазона концентраций антитела AGEN1884.H3 (IgG₁) и изотипического контрольного антитела (IgG₁).

На фиг. 5A-5D приведены гистограммы проточной цитометрии, показывающие экспрессирующие CTLA-4 клетки Jurkat, инкубированные с антителом против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁), AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/I332E), AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E) или AGEN1884.H3 (IgG₁

L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L), или изотипическим контрольным антителом. Связывание антител детектировали с применением конъюгированного с флуорохромом вторичного антитела.

На фиг. 6А и 6В приведены графики, отражающие блокирование связывания между CTLA-4 человека и его лигандами, CD80 и CD86, соответственно, антителом AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E). Клетки Jurkat, сконструированные для конститутивной экспрессии CTLA-4 человека, инкубировали с антителом против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁-S239D/A330E/I332E), референсным антителом против CTLA-4 или изотипическим контрольным антителом (IgG₁), а затем окрашивали заданным флуоресцентно меченым лигандом. Затем связывание лигандов оценивали с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 7А-7С приведены графики, отражающие продуцирование ИЛ-2 первичными МКПК человека, культивированными при субоптимальной стимуляции суперантигеном SEA в отсутствие или в присутствии изотипического контрольного антитела (IgG₁) или антитела против CTLA-4. На фиг. 7А и 7В приведены графики, отражающие продуцирование ИЛ-2, стимулированное либо однократной дозой, либо титрованными дозами изотипического контрольного антитела (IgG₁) или антител против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁), AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/I332E), AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E) и AGEN1884.H3 (IgG₁ L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L). В исследовании, представленном на фиг. 7В, помимо изотипического контрольного антитела (IgG₁) или антитела против CTLA-4, клетки в каждом образце также инкубировали с изотипическим контрольным антителом IgG₄ S228P. На фиг. 7С приведен график, отражающий продуцирование ИЛ-2, стимулированное титрованными дозами изотипического контрольного антитела (IgG₁) или антител против CTLA-4 AGEN1884 (IgG₁), AGEN1884 (IgG₁ S239D/I332E), AGEN1884 (IgG₁ S239D/A330L/I332E) и афукозилированного AGEN1884 (IgG₁).

На фиг. 8А представлен иммуноблот-анализ для фосфорилированной ZAP70 (Y493) в МКПК человека после стимуляции 50 нг/мл суперантигена SEA и 10 мкг/мл изотипического контрольного антитела (IgG₁) или антител против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁), AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E) или AGEN1884.H3 (IgG₁ N297A). На фиг. 8В представлена диаграмма, отражающая нормированный денситометрический анализ данных, представленных на фиг. 8А.

На фиг. 9А-9D приведены графики, отражающие противоопухолевую эффективность и внутриопухолевое истощение по регуляторным Т-клеткам (Treg), индуцированное Fc-вариантами антитела мыши против CTLA-4 9D9. На фиг. 9А показан рост опухоли у мышей CT26 после лечения однократной дозой антитела мыши против CTLA-4 9D9 (mIgG2a), варианта антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a-N297A) с "молчащим" Fc, Fc-варианта антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) или изотипического контрольного антитела (mIgG2a). На верхней панели показана зависимость медианного объема опухоли от времени для каждой группы лечения. На остальных панелях показана зависимость объема опухоли от времени для индивидуальных животных в каждой группе лечения. На фиг. 9В показан эффект лечения антителом против CTLA-4 на популяции Т-клеток из опухолевых инфильтратов, собранных от мышей, получавших лечение однократными дозами антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a), антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a-N297A), антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) или изотипического контрольного антитела (mIgG2a). Опухолевые инфильтраты собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии в заданных точках времени после инъекции антитела. Проанализированные популяции клеток включают: FoxP3⁺ Treg (верхняя левая панель), CD45⁺ лейкоциты (верхняя правая панель), и CD4⁺ не-регуляторные Т-клетки (нижняя левая панель). На нижней правой панели приведено отношение CD8⁺ Т-клеток к Treg, наблюдаемое в опухолевых инфильтратах. На фиг. 9С показана зависимость популяций FoxP3⁺ Treg от времени в дренирующих опухоль лимфатических узлах, собранных у мышей, получавших лечение, описанное для фиг. 9В. На фиг. 9D показана кратность изменений количества селезеночных FoxP3⁺ Treg через 72 ч после лечения согласно описанию для фиг. 9В.

На фиг. 10 приведен ряд графиков, отражающих противоопухолевую эффективность антител мыши против CTLA-4 в комбинации с противоопухолевой вакциной, происходящей из ВПЧ+ опухоли (вирусные антигены E6/E7). Показана зависимость объема опухоли от времени для индивидуальных мышей, не получавших лечения, получавших изотипическое контрольное антитело (mIgG2a), антитело против CTLA-4 9D9 (mIgG2a) или Fc-вариант антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E). На графиках в верхнем ряду показаны результаты для животных, которым при лечении вводили только указанное антитело. На графиках в нижнем ряду показаны результаты для животных, которым при лечении вводили указанное антитело в комбинации с противоопухолевой вакциной.

На фиг. 11А и 11В приведены графики, отражающие генную экспрессию и CpG-метилирование в популяциях Т-клеток человека. CD4⁺ CD25^{hi} FOXP3⁻ не-регуляторные Т-клетки (Teff) и CD4⁺ CD25^{hi} FOXP3⁺ регуляторные Т-клетки (Treg) выделяли из периферической крови здоровых доноров, размножали и активировали. На фиг. 11А показаны уровни FOXP3, внутриклеточного CTLA-4 и мембранного CTLA-4 в каждой активированной популяции Т-клеток, определенные с помощью проточной цитометрии. На фиг. 11В показан уровень CpG-метилирования в CpG-областях в пределах локусов FOXP3 (верхняя панель) и CTLA4 (нижняя панель) в необученных Т-клетках, активированных эффекторных Т-клетках и активированных регуляторных Т-клетках, полученных от одного и того же донора.

На фиг. 12А и 12В приведены графики, отражающие временную динамику антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) целевых клеток, положительных по CTLA-4 человека, после инкубации с антителом против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁) или его Fc-вариантами. Клетки NK-92 (экспрессирующие FcγRIIIA V158) культивировали совместно с CTLA-4+ целевыми клетками, которые инкубировали с разными Fc-вариантами антител против CTLA-4 или изотипическим контролем IgG₁ (10 мкг/мл). Затем применяли многопараметрический микроскопический анализ активации каспазы 3/7 для количественного определения активности АЗКЦ. На фиг. 12А показана активность АЗКЦ в клетках Jurkat, сконструированных для экспрессии CTLA-4 на поверхности клеток, при инкубации с AGEN1884.H3 (IgG₁), AGEN1884.H3 (IgG₁ N297A), AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E), AGEN1884.H3 (IgG₁ S267E/L328F), афукозилированным AGEN1884.H3 (IgG₁) или изотипическим контрольным антителом (IgG₁). На фиг. 12В показана активность АЗКЦ в первичных активированных эффекторных Т-клетках человека (левая панель) или регуляторных Т-клетках (правая панель) при инкубации с указанными антителами.

На фиг. 13А-13D приведены графики, отражающие эффекты вариантов антитела против CTLA-4 на функцию Т-клеток при введении по отдельности или в комбинации с антителом против PD-1. Выделяли МКПК человека от двух доноров и инкубировали в стимулирующих условиях культивирования с антителом против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁), Fc-вариантом антитела против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E) или изотипическим контрольным антителом (IgG₁) в комбинации с референсным антителом против PD-1 или изотипическим контрольным антителом (IgG₄), согласно указанному. Для каждого из перечисленных условий лечения использовали титрованные дозы антитела из перечисленных первых антител и фиксированную концентрацию (5 мкг/мл) антитела из вторых перечисленных антител. Указанный эксперимент проводили два раза, с получением в общей сложности двух повторностей для каждого донора. Уровни продуцирования ИЛ-2, индуцированного каждой из комбинаций антител, на МКПК, собранных у первого донора, показаны на фиг. 13А (повторность 1) и фиг. 13В (повторность 2). Уровни продуцирования ИЛ-2, индуцированного каждой из комбинаций антител, на МКПК, собранных у второго донора, показаны на фиг. 13С (повторность 1) и фиг. 13D (повторность 2).

На фиг. 14А-14С представлен ряд выравниваний последовательностей. На фиг. 14А представлено выравнивание последовательностей CTLA-4 человека (SEQ ID NO: 33), CTLA-4 макака-крабеода (SEQ ID NO: 40), CTLA-4 мыши (SEQ ID NO: 41) и CTLA-4 крысы (SEQ ID NO: 42). Точками отмечены остатки, идентичные соответствующим остаткам человека. Символом "*" (звездочка) обозначены положения, содержащие единственный полностью консервативный остаток. Символом ":" (двоеточие) обозначена консервативность в группах с выраженным сходством свойств. Символом "." (точка) обозначена консервативность в группах со слабым сходством свойств. На фиг. 14В и 14С представлены выравнивания последовательностей CTLA-4 человека (остатки 1-144 и остатки 145-223 SEQ ID NO: 33, соответственно), CTLA-4 макака-крабеода (остатки 1-144 и остатки 145-223 SEQ ID NO: 40, соответственно), CD28 человека (остатки 1-127 и остатки 128-220 SEQ ID NO: 43, соответственно), ICOS человека (остатки 1-124 и остатки 125-199 SEQ ID NO: 44, соответственно), BTLA человека (остатки 1-125 и остатки 126-289 SEQ ID NO: 45, соответственно) и PD-1 человека (остатки 1-143 и остатки 144-288 SEQ ID NO: 46, соответственно). На фиг. 14А-14С выделены подчеркиванием две области, демонстрирующие выраженное снижение поглощение дейтерия при связывании CTLA-4 человека с AGEN1884-Fab: остатки 80-82 (QVT, SEQ ID NO: 39) и остатки 135-149 (YPPYYLIGINGTQI, SEQ ID NO: 37), пронумерованные в соответствии с SEQ ID NO: 33.

Подробное описание изобретения

Согласно настоящему изобретению предложены антитела, которые специфически связываются с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) и антагонизируют функцию CTLA-4, например, опосредованное CTLA-4 подавление иммунитета. Также предложены фармацевтические композиции, содержащие указанные антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие указанные антитела, экспрессионные векторы и клетки-хозяева для получения указанных антител; и способы лечения субъекта с применением указанных антител. Антитела, описанные в настоящем документе, в частности, подходят для усиления активации Т-клеток в ответ на антиген (например, опухолевый антиген или антиген инфекционного заболевания) и, следовательно, для лечения рака у субъекта, или лечения или предотвращения инфекционного заболевания у субъекта. Во всех случаях "выделенные антитела", описанные в настоящем документе, дополнительно включают антитела, которые могут быть, однако необязательно являются выделенными. Во всех случаях "выделенные полинуклеотиды", описанные в настоящем документе, дополнительно включают полинуклеотиды которые могут быть, однако необязательно являются выделенными. Во всех случаях "антитела", описанные в настоящем документе, дополнительно включают антитела, которые могут быть, однако необязательно являются выделенными. Во всех случаях "полинуклеотиды", описанные в настоящем документе, дополнительно включают полинуклеотиды, которые могут быть, однако необязательно являются выделенными.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что остаток аминокислоты глутамат (E) или глутамин (Q) на N-конце варибельной области тяжелой цепи и/или варибельной области легкой цепи любого из антител, описанных в настоящем документе (например, антитела против CTLA4) может, в

определенных условиях, спонтанно превращаться в пироглутамат за счет посттрансляционной циклизации свободной аминогруппой с образованием лактама. Соответственно, согласно определенным вариантам реализации всех без исключения способов, применений, фармацевтических композиций или наборов, описанных в настоящем документе, N-концевой остаток аминокислоты одной или более из тяжелых цепей переменных областей и/или легких цепей переменных областей антитела был преобразован в пироглутамат (например, в результате посттрансляционной циклизации свободной аминогруппы N-концевого остатка E или Q).

Определения.

В настоящем документе термины "примерно" и "приблизительно" при использовании для модификации численного значения или диапазона численных значений показывают, что отклонения указанного значения или диапазона от 5 до 10% в большую сторону (например, до 5-10% в большую сторону) и от 5 до 10% в меньшую сторону (например, до 5-10% в меньшую сторону) входят в предполагаемый объем доминирующего значения или диапазона.

В настоящем документе термин "CTLA-4" относится к цитотоксическому Т-лимфоцит-ассоциированному белку 4. В настоящем документе термин "CTLA-4 человека" относится к белку CTLA-4 человека, кодируемому геном CTLA-4 человека дикого типа, например, с номером доступа GenBank™ NM_005214.4 или NM_001037631.2. Пример незрелой последовательности аминокислот CTLA-4 человека представлен SEQ ID NO: 33.

В настоящем документе термины "антитело" и "антитела" включают полноразмерные антитела, антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных антител, и молекулы, содержащие области CDR, области VH или области VL антител. Примеры антител включают моноклональные антитела, рекомбинантным способом полученные антитела, моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (в том числе биспецифические антитела), антитела человека, гуманизированные антитела, химерные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, содержащие две молекулы тяжелых цепей и две молекулы легких цепей, мономер легкой цепи антитела, мономер тяжелой цепи антитела, димер легкой цепи антитела, димер тяжелой цепи антитела, пару из легкой цепи антитела и тяжелой цепи антитела, интратела, гетероконъюгатные антитела, конъюгаты антител с лекарственными средствами, однодоменные антитела, моновалентные антитела, одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), камелизированные антитела, аффитела, Fab-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, связанные дисульфидными связями Fv (sdFv), антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, антитела к анти-Id-антителам), а также антигенсвязывающие фрагменты любых из вышеперечисленных антител. Согласно некоторым вариантам реализации антитела, описанные в настоящем документе, относятся к популяциям поликлональных антител. Антитела могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY), любого класса (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂) или любого подкласса (например, IgG_{2a} или IgG_{2b}) молекул иммуноглобулинов. Согласно некоторым вариантам реализации антитела, описанные в настоящем документе, представляют собой IgG-антитела, или относятся к их классу (например, IgG₁ или IgG₄ человека) или подклассу. Согласно конкретному варианту реализации указанное антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело. Согласно другому конкретному варианту реализации указанное антитело представляет собой моноклональное антитело человека.

В настоящем документе термины "область VH" и "область VL" относятся к одиночным переменным областям тяжелых и легких цепей антитела, соответственно, содержащим FR (каркасные области) 1, 2, 3 и 4, и CDR (определяющие комплементарность области) 1, 2 и 3 (см. источник: Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (NIH Publication No. 91-3242, Bethesda), который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки).

В настоящем документе термин "CDR" или "определяющая комплементарность область" означает не являющиеся непрерывными антигенсвязывающие сайты, обнаруживаемые в переменной области полипептидов как тяжелых, так и легких цепей. Указанные конкретные области были описаны в источниках: Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) и Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991), Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) и MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки, при этом указанные определения включают при сравнении друг с другом перекрывающиеся остатки или подгруппы остатков аминокислот. Согласно некоторым вариантам реализации термин "CDR" представляет собой CDR согласно определению по Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) и Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991). Согласно некоторым вариантам реализации термин "CDR" относится к CDR согласно определению по Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987). Согласно некоторым вариантам реализации термин "CDR" относится к CDR согласно определению по MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) и Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," в источнике: Antibody Engineering, Rontermann and Dübel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001).

В настоящем документе термин "каркасные (FR) остатки аминокислот" относится к аминокислотам в каркасной области цепи иммуноглобулина. Термин "каркасная область" или "область FR" в настоящем

документе включает остатки аминокислот, входящие в состав вариабельной области, однако не входящие в состав областей CDR (например, при использовании определения CDR по Kabat или Chothia).

В настоящем документе термины "вариабельная область" и "вариабельный домен" используются взаимозаменяемо и общеизвестны в данной области техники. Вариабельная область, как правило, относится к части антитела, обычно части легкой или тяжелой цепи, как правило, включающей приблизительно 110-125 аминоконцевых аминокислот в зрелой тяжелой цепи и приблизительно 90-115 аминокислот в зрелой легкой цепи, последовательность которых сильно отличается у разных антител и участвует в связывании и специфичности конкретного антитела в отношении конкретного антигена. Вариабельность последовательности сконцентрирована в областях, называемых определяющими комплементарность областями (CDR), тогда как более высококонсервативные области вариабельного домена называют каркасными областями (FR). Без связи с каким-либо конкретным механизмом или какой-либо конкретной теорией считается, что области CDR легких и тяжелых цепей в первую очередь отвечают за взаимодействие антитела с антигеном и специфичность антитела в отношении антигена. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вариабельная область представляет собой вариабельную область человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вариабельная область содержит области CDR грызуна или мыши и каркасные области (FR) человека. Согласно конкретным вариантам реализации указанная вариабельная область представляет собой вариабельную область примата (например, не являющегося человеком примата). Согласно некоторым вариантам реализации указанная вариабельная область содержит области CDR грызуна или мыши и каркасные области (FR) примата (например, не являющегося человеком примата).

Термины "VL" и "VL домен" используются взаимозаменяемо и относятся к вариабельной области легкой цепи антитела.

Термины "VH" и "домен VH" используются взаимозаменяемо и относятся к вариабельной области тяжелой цепи антитела.

В настоящем документе термины "константная область" и "константный домен" являются взаимозаменяемыми и общеизвестны в данной области техники. Константная область представляет собой часть антитела, например, карбоксиконцевую часть легкой и/или тяжелой цепи, которая прямо не вовлечена в связывание антитела с антигеном, но может демонстрировать различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором (например, рецептором Fc-гамма). Константная область молекулы иммуноглобулина обычно содержит более консервативную последовательность аминокислот по сравнению с вариабельным доменом иммуноглобулина.

В настоящем документе термин "тяжелая цепь" при использовании в отношении антитела может относиться к любому из обособленных типов, например, альфа (α), дельта (δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), основанных на последовательности аминокислот константного домена, которые дают начало классам антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно, в том числе подклассам IgG, например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄.

В настоящем документе термин "легкая цепь" при использовании в отношении антитела может относиться к любому из обособленных типов, например, каппа (κ) или лямбда (λ), основанных на последовательности аминокислот константных доменов. Последовательности аминокислот легких цепей хорошо известны в данной области техники.

В настоящем документе термин "система нумерации EU" относится к принятой нумерации EU для константных областей антитела, согласно описанию в источниках: Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969) и Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

"Аффинность связывания" обычно относится к силе совокупных нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером для связывания (например, антигеном). Если не указано иное, в настоящем документе "аффинность связывания" относится к истинной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y может, как правило, быть представлена константой диссоциации (K_D). Аффинность может быть измерена и/или выражена несколькими известными в данной области техники способами, в том числе, но не ограничиваясь перечисленным, через равновесную константу диссоциации (K_D) и равновесную константу связывания (K_A). K_D вычисляют как частное k_{off}/k_{on} , а K_A вычисляют как частное k_{on}/k_{off} . k_{on} относится к константе скорости связывания, например, антитела с антигеном, а k_{off} относится к константе скорости диссоциации, например, антитела с антигеном. k_{on} и k_{off} могут быть определены с применением методик, известных специалисту в данной области техники, таких как BIAcore® или KinExA. В настоящем документе "более низкая аффинность" относится к большей K_D .

В настоящем документе термины "специфически связывает", "специфически распознает", "иммуноспецифически связывает" и "иммуноспецифически распознает" являются аналогичными в контексте антител и относятся к молекулам, которые связываются с антигеном (например, эпитопом или иммун-

ным комплексом), в том смысле, в котором такое связывание понимает специалист в данной области техники. Например, молекула, которая специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами, обычно с более низкой аффинностью по оценке с применением, например, иммунологических анализов, ВІАсоге®, инструмента KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Бойсе, Айдахо) или других анализов, известных в данной области техники. Согласно конкретному варианту реализации молекулы, которые специфически связываются с антигеном, связываются с указанным антигеном с K_A , по меньшей мере на 2 логарифмических порядка (т.е. в 10 раз), 2,5 логарифмических порядка, 3 логарифмических порядка, 4 логарифмических порядка или более превышающей K_A при неспецифическом связывании указанных молекул с другим антигеном.

Согласно другому конкретному варианту реализации молекулы, которые специфически связываются с антигеном, не вступают в перекрестные реакции с другими белками в аналогичных условиях связывания. Согласно другому конкретному варианту реализации молекулы, которые специфически связываются с CTLA-4, не вступают в перекрестные реакции с другими, не являющимися CTLA-4 белками. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело которое связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) с большей аффинностью по сравнению с другим неродственным антигеном. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) с 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или большей аффинностью по сравнению с другим, неродственным антигеном по оценке с применением, например, радиоиммунологического анализа, поверхностного плазмонного резонанса или анализа кинетического исключения. Согласно конкретному варианту реализации степень связывания антитела против CTLA-4, описанного в настоящем документе, с неродственным, не являющимся CTLA-4 белком составляет менее чем 10%, 15% или 20% от связывания указанного антитела с белком CTLA-4 по оценке с применением, например, радиоиммунологического анализа.

В настоящем документе термин "афукозилирование" или "афукозилированный" в контексте Fc относится к отсутствию по существу фукозы, ковалентно присоединенной, прямо или непрямо, к остатку 297 Fc-области IgG₁ человека в соответствии с системой нумерации EU, или к соответствующему остатку иммуноглобулинов, не являющихся IgG₁ или не являющихся IgG₁ человека. Соответственно, в композиции, содержащей множество афукозилированных антител, по меньшей мере 70% указанных антител не фукозилировано, прямо или непрямо (например, посредством промежуточных Сахаров), по остатку 297 Fc-области указанных антител, и, согласно некоторым вариантам реализации, по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% не фукозилировано, прямо или непрямо, по остатку 297 Fc-области.

В настоящем документе термин "эпитоп" соответствует известному в данной области техники термину и относится к локализованной области антигена, с которой антитело может специфически связываться. Эпитоп может представлять собой, например, непрерывные аминокислоты полипептида (линейный или непрерывный эпитоп), или эпитоп может, например, быть составлен двумя или более не являющимися непрерывными областями полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или несмежный эпитоп). Согласно некоторым вариантам реализации эпитоп, с которым связывается антитело, может быть определен с применением, например, ЯМР-спектроскопии, исследований методом рентгеновской дифракционной кристаллографии, анализов ИФА ELISA, обмена водорода на дейтерий, сопряженного с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии с электрораспылением), анализов методом олигопептидного сканирования на чипах (например, ограничения пептидов с применением технологии CLIPS ("Chemical Linkage of Peptides onto Scaffolds") для картирования прерывистых или конформационных эпитопов) и/или картирования с помощью мутагенеза (например, картирования с помощью сайт-специфического мутагенеза). При рентгеновской кристаллографии кристаллизация может осуществляться с применением любых известных в данной области техники способов (например, см. источники: Giegé R et al., (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50 (Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Кристаллы антитело:антиген могут быть исследованы с применением хорошо известных методик рентгеновской дифракции, и их структура может быть уточнена с применением компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Йельский университет, 1992, распространяется Molecular Simulations, Inc.; см., например, *Meth Enzymol* (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW et al.; U.S. 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49 (Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P et al., (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 10): 1316-1323), каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Исследования с картированием с помощью мутагенеза могут осуществляться с применением любого способа, известного специалисту в данной области техники; см., например, описание методик мутагенеза, в том числе аланинового сканирования, в источнике: Champe M et al., (1995) *J Biol Chem* 270: 1388-1394 и Cunningham BC & Wells JA (1989) *Science* 244: 1081-1085, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. CLIPS ("Chemical Linkage of Peptides onto Scaffolds") представляет собой технологию представления одного или более пеп-

тидов в структурно ограниченной конфигурации, ведущих себя как функциональные миметики комплексных белковых доменов; см., например, источники: публикации США US 2008/0139407 A1 и № US 2007/099240 A1, и патент США № 7972993, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно конкретному варианту реализации эпитоп антитела определяют в исследовании с применением мутагенеза методом аланинового сканирования. Согласно конкретному варианту реализации эпитоп антитела определяют с применением обмена водорода на дейтерий, сопряженного с масс-спектрометрией. Согласно конкретному варианту реализации эпитоп антитела определяют с применением технологии картирования эпитопов CLIPS от Pepscan Therapeutics.

В настоящем документе термин "эпитоп, локализованный в области CTLA-4 человека", состоящий из конкретной последовательности аминокислот или группы остатков аминокислот, относится к эпитопу, содержащему один или более из остатков аминокислот заданной области, причем указанная заданная область включает первый заданный остаток аминокислоты и последний заданный остаток аминокислоты области CTLA-4 человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный эпитоп содержит каждый из остатков аминокислот, локализованных в заданной области. Согласно некоторым вариантам реализации один или более дополнительных остатков аминокислот CTLA-4 человека вне заданной области связываются с антителом совместно с эпитопом, локализованным в заданной области.

В настоящем документе термины "Т-клеточный рецептор" и "TCR" используются взаимозаменяемо и относятся к полноразмерным гетеродимерным $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$ TCR, антигенсвязывающим фрагментам полноразмерных TCR и молекулам, содержащим области CDR или вариабельные области TCR. Примеры TCR включают, не ограничиваясь перечисленными, полноразмерные TCR, антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных TCR, растворимые TCR, не содержащие трансмембранных и цитоплазматических областей, одноцепочечные TCR, содержащие вариабельные области TCR, прикрепленные гибким линкером, цепи TCR, соединенные сконструированной дисульфидной связью, моноспецифические TCR, мультиспецифические TCR (в том числе биспецифические TCR), слитые TCR, TCR человека, гуманизированные TCR, химерные TCR, полученные рекомбинантным способом TCR и синтетические TCR. Термин охватывает TCR дикого типа и генетически сконструированные TCR (например, химерный TCR, содержащий химерную цепь TCR, которая включает первую часть из TCR первого вида и вторую часть из TCR второго вида).

В настоящем документе термины "главный комплекс гистосовместимости" и "MHC" используются взаимозаменяемо и относятся к молекуле MHC класса I и/или молекуле MHC класса II.

В настоящем документе термин "комплекс пептида с MHC" относится к молекуле MHC (MHC класса I или MHC класса II), с которой связан пептид в известном в данной области техники связывающем кармане указанной молекулы MHC.

В настоящем документе термины "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к терапевтическим или профилактическим мерам, описанным в настоящем документе. Способы "лечения" задействуют введение антитела субъекту с заболеванием или расстройством, или предрасположенному к такому заболеванию или расстройству, для предотвращения, излечения, задержке, снижения тяжести или облегчения одного или более симптомов указанного заболевания или расстройства, или рецидивирующего заболевания или расстройства, или для продления выживания субъекта за пределы ожидаемого в отсутствие такого лечения периода.

В настоящем документе термин "эффективное количество" в контексте проведения терапии у субъекта относится к уровню терапии, обеспечивающему достижение требуемого профилактического или терапевтического эффекта.

В настоящем документе, применительно к ответу рака на терапию, термины "рефрактерный" и "резистентный" имеют известные в данной области техники значения и используются взаимозаменяемо.

В настоящем документе термин "субъект" включает человека или любое не являющееся человеком животное. Согласно одному варианту реализации указанный субъект представляет собой человека или не являющееся человеком млекопитающее. Согласно одному варианту реализации указанный субъект представляет собой человека.

Определение "процента идентичности" между двумя последовательностями (например, последовательностями аминокислот или последовательностями нуклеиновых кислот) может осуществляться с применением математического алгоритма. Специфический неограничивающий пример математического алгоритма для сравнения двух последовательностей представлен алгоритмом из источника Karlin S & Altschul SF (1990) PNAS 87: 2264-2268, модифицированный согласно источнику Karlin S & Altschul SF (1993) PNAS 90: 5873-5877; каждый из указанных источников включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST согласно Altschul SF et al., (1990) J Mol Biol 215: 403, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Поиск нуклеотидов в BLAST может быть выполнен с использованием набора параметров программы NBLAST для нуклеотидов, например, где вес=100, длина слова=12, с получением последовательностей нуклеотидов, гомологичных молекулам нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе. Поиск белков BLAST может быть выполнен с использованием набора параметров программы XBLAST, например, где вес=50, длина слова=3, с получением последовательностей аминокислот, гомо-

логичных молекуле белка, описанной в настоящем документе. Для получения выравниваний с пропусками для целей сравнения может быть использована Gapped BLAST согласно описанию в источнике: Altschul SF et al., (1997) *Nuc Acids Res* 25: 3389-3402, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Как вариант, PSI BLAST может применяться для выполнения итерационного поиска, который детектирует отдаленные взаимосвязи между молекулами (там же). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI Blast могут применяться устанавливаемые по умолчанию параметры соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (см., например, сайт Национального центра биотехнологической информации (NCBI) во всемирной сети, ncbi.nlm.nih.gov). Другой специфический неограничивающий пример математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, представлен алгоритмом из источника: Myers and Miller, 1988, *CABIOS* 4:11-17, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая входит в пакет программного обеспечения для выравнивания последовательностей GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения последовательностей аминокислот могут применяться таблица весов замен остатков PAM120, штраф за продление пропуска, равный 12, и штраф за пропуск в последовательности, равный 4.

Процент идентичности двух последовательностей может быть определен с применением методов, аналогичных описанным выше, с разрешенными пропусками или без пропусков. При вычислении процента идентичности, как правило, подсчитывают только точные совпадения.

Антитела против CTLA-4.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложены антитела, которые специфически связываются с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) и антагонизируют функцию CTLA-4.

Последовательности аминокислот примеров антител приведены в табл. 1-4 в настоящем документе.

Таблица 1

Последовательности аминокислот примеров антител против CTLA-4*

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность аминокислот
1	AGEN1884_VH	EVQLVESGGGLV ^K PGGSLRLS ^{CAASGFTFSSYS} MNW VRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMN ^{SLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIW} GQGTMTVTVSS
2	AGEN1884_M102F_VH	EVQLVESGGGLV ^K PGGSLRLS ^{CAASGFTFSSYS} MNW VRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMN ^{SLRAEDTAVYYCARVGLFGPFDIW} GQGTMTVTVSS
3	AGEN1884_M113L_VH	EVQLVESGGGLV ^K PGGSLRLS ^{CAASGFTFSSYS} MNW VRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMN ^{SLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIW} GQGT ^{LV} TVSS
4	AGEN1884_D62E_VH	EVQLVESGGGLV ^K PGGSLRLS ^{CAASGFTFSSYS} MNW VRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYA ^{ES} VKGRFTISR DNAKNSLYLQMN ^{SLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIW} GQGTMTVTVSS

5	AGEN1884_M102F_M11 3L VH	EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLS CAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSIS SSSSSYIYYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARVGLFGPFDIW GQGT LTVTVSS
6	AGEN1884_D62E_M102 F VH	EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLS CAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSIS SSSSSYIYYAESVKGRFTISR DNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARVGLFGPFDIW GQGT MVTVSS
7	AGEN1884_D62E_M113 L VH	EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLS CAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSIS SSSSSYIYYAESVKGRFTISR DNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDI W GQGT LTVTVSS
8	AGEN1884_D62E_M102 F_M113L VH	EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLS CAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSIS SSSSSYIYYAESVKGRFTISR DNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARVGLFGPFDIW GQGT LTVTVSS
9	AGEN1884 VL	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSC RASQSVSRYL GWY QQKPGQAPRL LIYGASTRATG IPDRFSGSGS GTDFT LTITRLEPEDFA VYYCQQYGSS PWTFGQGTKVEIK
10	CDRH1	YSMN
11	CDRH2	SIS SSSSSYIYYADSVK G
12	CDRH2	SIS SSSSSYIYYAESV K
13	CDRH3	VGLMGPFDI
14	CDRH3	VGLFGPFDI
15	CDRL1	RASQSVSRYL G
16	CDRL2	GASTRAT
17	CDRL3	QQYGSSPWT
18	Консенсусная последовательность CDRH2	SIS SSSSSYIYYAXSVK G, где: X представляет собой E или D
19	Консенсусная последовательность CDRH3	VGLXGPFDI, где: X представляет собой F или M

20	Консенсусная последовательность VN	EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYAX ₁ SVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLX ₂ GPFDIW GQGTX ₃ VTVSS, где: X ₁ представляет собой E или D, X ₂ представляет собой F или M, и X ₃ представляет собой L или M.
23	Тяжелая цепь AGEN1884.H3 (IgG ₁)	EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYAESVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLFGPFDIW GQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG
24	Тяжелая цепь AGEN1884.H3 (IgG ₁ S239D/I332E)	EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYAESVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLFGPFDIW GQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG

25	Тяжелая цепь AGEN1884.H3 (IgG ₁ S239D/A330L/I332E)	EVQLVESGGGLV ^K PGGSLRLS ^{CAASGFTFSSYS} MNWL VRQAPGK ^{GLEWVSSIS} SSSSSYIYYAESV ^{KGRFTISR} DNAKNSLYLQ ^{MNSLRAEDTAVYYCARVGLFGPF} DIW GQGT ^{LVTVSSASTKGPSVF} FLAPSSK ^{STSGGTAALG} CLVKDYFPEP ^{VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL} YSLSSV ^{TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK} VDKRV EPKSCDK ^{THTCPPCPAPELGGPDVFLFPPKPK} DTL MISRTPEV ^{TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA} KTKPREEQ ^{YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV} SNKALP ^{LPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT} KNQVSL ^{TCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYK} TTP PVLDS ^{DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV} FSCSVMHEA LHNHYT ^{QKSLSLSPG}
26	Тяжелая цепь AGEN1884.H3 (IgG ₁ L235V/F243L/R292P/ Y300L/P396L)	EVQLVESGGGLV ^K PGGSLRLS ^{CAASGFTFSSYS} MNWL VRQAPGK ^{GLEWVSSIS} SSSSSYIYYAESV ^{KGRFTISR} DNAKNSLYLQ ^{MNSLRAEDTAVYYCARVGLFGPF} DIW GQGT ^{LVTVSSASTKGPSVF} FLAPSSK ^{STSGGTAALG} CLVKDYFPEP ^{VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL} YSLSSV ^{TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK} VDKRV EPKSCDK ^{THTCPPCPAPELVGGPSVFLFPPKPK} DTL MISRTPEV ^{TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA} KTKPPEE ^{QYNSTLRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV} SNKALP ^{APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT} KNQVSL ^{TCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYK} TTP LVLD ^{SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV} FSCSVMHEA LHNHYT ^{QKSLSLSPG}

47	Тяжелая цепь AGEN1884.H3 (IgG ₁ N297A)	EVQLVESGGGLV _K PGGSLRLS _{CAASGFTFSSYS} MN _W VRQAPGK _{GLEWVSSIS} SSSSSYI _{YYAESV} KGRFTISR DNAKNSLYLQ _{MNSLRAEDTAVYYCARVGLFGP} FDIW GQGT _{LVTVSSASTKGPSV} FPLAPSSK _{STSGGTAALG} CLVKDYFPEP _{VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL} YSLSSV _{TVPSSSLGTQTYICNVN} HKPSNTK _{VDKRV} EPKSCDK _{THTCPPCPAPEL} LGGPSV _F LFPK _{PKDTL} MISRTPEV _{TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA} KTKPREEQ _{YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV} SNKALPAP _{IEKTI} SKAKGQ _{PREPQVYTLPPSREEMT} KNQVSL _{TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK} TP PVLDS _{DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV} FSCS _V MHEA LHNHYTQ _{KSL} SLSPG
48	Тяжелая цепь AGEN1884.H3 (IgG ₁ S267E/L328F)	EVQLVESGGGLV _K PGGSLRLS _{CAASGFTFSSYS} MN _W VRQAPGK _{GLEWVSSIS} SSSSSYI _{YYAESV} KGRFTISR DNAKNSLYLQ _{MNSLRAEDTAVYYCARVGLFGP} FDIW GQGT _{LVTVSSASTKGPSV} FPLAPSSK _{STSGGTAALG} CLVKDYFPEP _{VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL} YSLSSV _{TVPSSSLGTQTYICNVN} HKPSNTK _{VDKRV} EPKSCDK _{THTCPPCPAPEL} LGGPSV _F LFPK _{PKDTL} MISRTPEV _{TCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA} KTKPREEQ _{YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV} SNKAFPAP _{IEKTI} SKAKGQ _{PREPQVYTLPPSREEMT} KNQVSL _{TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK} TP PVLDS _{DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV} FSCS _V MHEA LHNHYTQ _{KSL} SLSPG
27	Легкая цепь AGEN1884.H3	EIVLTQSPG _{TLSLSPGERATL} SCRASQ _S VSRYL _{GWY} QQKPGQAP _{RLLIYG} ASTRATGIP _{DRFSGSGSGTDFT} LTITRLEP _{EDFAVYYCQQY} GSSP _{WTFGQGTKVEIKR} TVAAPSV _{FIFPPSDEQLKSGTASV} VCLLN _{FYPREA} KVQWK _{VDNALQSGNSQESVTEQDSK} DSTY _{LS} SL _{STLT} LSKADY _E KHKVYACEV _{THQGL} SSP _V TKS _{FNR} GEC

28	IgG ₁	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHT CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
29	IgG ₁ S239D/I332E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHT CPPCPAPPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEE KTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
30	IgG ₁ S239D/A330L/I332E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHT CPPCPAPPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEE KTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
31	IgG ₁ L235V/F243L/R292P/ Y300L/P396L	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHT CPPCPAPELVGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYN STLRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPLVLDSGGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
32	Константная область легкой цепи	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

* Области CDR определены в соответствии с системой нумерации Kabat.

Таблица 2

Последовательности аминокислот CDR тяжелых цепей примеров антител против CTLA-4*

VH (SEQ ID NO:)	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)
AGEN1884 VH (1)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYADSV KG (11)	VGLMGPFDI (13)
AGEN1884_M102F VH (2)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYADSV KG (11)	VGLFGPFDI (14)
AGEN1884_M113L VH (3)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYADSV KG (11)	VGLMGPFDI (13)
AGEN1884_D62E VH (4)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYAESV KG (12)	VGLMGPFDI (13)
AGEN1884_M102F_M113L VH (5)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYADSV KG (11)	VGLFGPFDI (14)
AGEN1884_D62E_M102F VH (6)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYAESV KG (12)	VGLFGPFDI (14)
AGEN1884_D62E_M113L VH (7)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYAESV KG (12)	VGLMGPFDI (13)
AGEN1884_D62E_M102F_ M113L VH (8)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYAESV KG (12)	VGLFGPFDI (14)

* Определены в соответствии с системой нумерации Kabat.

Таблица 3

Последовательности аминокислот CDR легких цепей примеров антител против CTLA-4*

VL (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
AGEN1884 VL (9)	RASQSVSRYLG (15)	GASTRAT (16)	QQYGSSPWT (17)

* Определены в соответствии с системой нумерации Kabat.

Таблица 4

Примеры антител против CTLA-4

Антитело	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
AGEN1884	AGEN1884 VH	1	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H1.1	AGEN1884_M102F VH	2	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H1.2	AGEN1884_M113L VH	3	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H1.3	AGEN1884_D62E VH	4	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H2.1	AGEN1884_M102F_M113L VH	5	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H2.2	AGEN1884_D62E_M102F VH	6	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H2.3	AGEN1884_D62E_M113L VH	7	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H3	AGEN1884_D62E_M102F_ M113L VH	8	AGEN1884 VL	9

Таблица 5

Ближайшие гены зародышевой линии

SEQ ID NO:	Ближайший ген зародышевой линии	Последовательность аминокислот
21	IGHV3-21*01	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
22	IGKV3-20*01	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGSPP

Таблица 6

Примеры последовательностей CTLA-4 и представителей семейства

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность аминокислот
33	Незрелый белок CTLA-4 человека (P16410)	MACLGFQRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKA MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVL RQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQ VNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLGI GNGTQ IYVIDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVS LSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN
34	Эпитоп CTLA-4	YLG I
35	Эпитоп CTLA-4	YPPPYLGI
36	Эпитоп CTLA-4	YLG I GNGTQ I
37	Эпитоп CTLA-4	YPPPYLGI GNGTQ I
38	Эпитоп CTLA-4	MYPPPY
39	Эпитоп CTLA-4	QVT
40	CTLA-4 макака-крабоеда (G7PL88)	MACLGFQRHKARLNLATRTRPYTLFLSLLFIPVFSKA MHVAQPAVVLANSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVL RQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQ VNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYMG I GNGTQ IYVIDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVS LSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN
41	CTLA-4 мыши (P09793)	MACLGLRRYKAQLQLPSRTWPFVALLTLLFIPVFSEA IQVTQPSVVLASSHGVA SFCEYSPSHNTDEV RVTVL RQTNDQMTEVCATTFTEKNTVGFLDYPFCSGTFNESR VNLTIQGLRAVD TGLYLCKVELMYPPPYFVGMGNGTQ IYVIDPEPCPDSDFLLWILVAVSLGLFFYSFLVSAVS LSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN

42	CTLA-4 крысы (Q62859)	MACLGLQRYKTHLQLPSRTWPFVLLSLLFIPIFSEA IQVTQPSVVLASSHGVASFPCEYASSHNTDEVVRVTVL RQTNDQVTEVCATTFVTKNTLGFLLDDPFCSGTFNESR VNLTIQGLRAADTGLYFCKVELMYPPPYFVGMGNGTQ IYVIDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLVTAVS LNRTLKKRSPLTTGVYVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN
43	CD28 человека (P10747)	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVN LSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVYGNYSQ QLQVYSKTGFNC DGKLGNESVTFFYLQNLVYNQTDIYF CKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPG PSKPFWVLVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSR LLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
44	ICOS человека (Q9Y6W8)	MKSGLWYFFLFCRLIKVLTGEINGSANYEMFIHNGG VQILCKYPDIVQQFKMQLKGGQILCDLTKTKGSGNT VSIKSLKFCHS QLSNNSVSFFLYNLDSHANYFCNL SIFDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQLKFWLPIGCA AFVVVICILGCILICWLTKKKYSSVHDPNGEYMFMR VNTAKKSRLTDVTL
45	BTLA человека (Q7Z6A9)	MKTLPAMLGTGKLFWVFFLIPLYLDIWNHIGKESCDVQ LYIKRQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWCKL NGTTCVKLEDRQTSWKEEKNISFFILHFEPVLPNDNG SYRCSANFQSNLIESHSTTLYVTDVKSASERPSKDEM ASRPWLLYRLPLGGLPLLIITTCFLFCCLRRHQGKQ NELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSE TGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYAS LNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS
46	PD-1 человека (Q15116)	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTF SPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWRMSPSN QTDKLAAFPEDRSQPGQDCFRVTVQLPNGRDFHMSVV RARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTER AEVPTAHPSPPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLV WVLAVICSRARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFVSD YGELDFQWREKTPPEPPVPCVPEQTEYATIVFSPGMGT SSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), содержащее домен VH, содержащий одну, две или все три области CDR домена VH, представленных в табл. 1 в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит CDRH1 одного из доменов VH, представленных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит CDRH2 одного из доменов VH, представленных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит CDRH3 одного из доменов VH, представленных в табл. 1.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), содержащее домен VL, содержащий одну, две или все три области CDR домена VL, приведенные в табл. 1 в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит CDRL1 одного из доменов VL, представленных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит CDRL2 одного из доменов VL, представленных в таблице 1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит CDRL3 одного из доменов VL, представленных в табл. 1.

Согласно некоторым вариантам реализации области CDR антитела могут быть определены в соответствии с источниками: Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) и Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest (1991), каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации области CDR антитела могут быть определены в соответствии со схемой нумерации Chothia, которая относится к локализации структурных петель иммуноглобулинов (см., например, источники: Chothia C & Lesk AM, (1987), *J Mol Biol* 196: 901-917; Al-Lazikani B et al., (1997) *J Mol Biol* 273: 927-948; Chothia C et al., (1992) *J Mol Biol* 227: 799-817; Tramontano A et al., (1990) *J Mol Biol* 215(1): 17 5-82; и патент США № 7709226, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Как правило, при использовании принятой нумерации по Kabat, петля CDRH1 по Chothia расположена на аминокислотах тяжелой цепи 26-32, 33 или 34, петля CDRH2 по Chothia расположена на аминокислотах тяжелой цепи 52-56, петля CDRH3 по Chothia расположена на аминокислотах тяжелой цепи 95-102, а петля CDRL1 по Chothia расположена на аминокислотах легкой цепи 24-34; петля CDRL2 по Chothia расположена на аминокислотах легкой цепи 50-56 и петля CDRL3 по Chothia расположена на аминокислотах легкой цепи 89-97. Конец петли CDRH1 по Chothia, при применении принятой нумерации по Kabat, варьирует от H32 до H34 в зависимости от длины петли (это обусловлено тем, что в схеме нумерации по Kabat инсерции располагаются в положениях H35A и H35B; при отсутствии и 35A, и 35B петля заканчивается в положении 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается в положении 33; если присутствуют и 35A, и 35B, петля заканчивается в положении 34).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), содержащие области CDR VH по Chothia, из VH, приведенных в табл. 1 в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), содержащее области CDR VL по Chothia, из VL, приведенных в табл. 1 в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), содержащее области CDR VH антитела по Chothia и области CDR VL антитела по Chothia, приведенные в табл. 1 в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации антитела, которые специфически связываются с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), содержат одну или более областей CDR, при этом области CDR по Chothia и Kabat имеют одну и ту же последовательность аминокислот. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) и содержит комбинации областей CDR по Kabat и областей CDR по Chothia.

Согласно некоторым вариантам реализации области CDR антитела могут быть определены в соответствии с системой нумерации IMGT согласно описанию в источниках: Lefranc M-P, (1999) *The Immunologist* 7: 132-136 и Lefranc M-P et al., (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 209-212, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антитела, которые специфически связываются с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) и содержат области CDR антитела, приведенные в табл. 1 в настоящем документе, при применении системы нумерации IMGT, например, согласно описанию в источниках: Lefranc M-P (1999), выше, и Lefranc M-P et al., (1999), выше.

Согласно некоторым вариантам реализации области CDR антитела могут быть определены в соответствии со схемой нумерации AbM, которая относится к гипервариабельным областям AbM, представляющим собой компромисс между областями CDR по Kabat и структурными петлями по Chothia, и используются в программном обеспечении для моделирования антител AbM от Oxford Molecular's (Oxford Molecular Group, Inc.), включенном в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложены антитела, которые специфически связываются с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) и содержат области CDR антитела, приведенные в табл. 1 в настоящем документе, при применении схемы нумерации AbM.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности аминокислот областей CDRH1, CDRH2 и CDRH3 домена VH, представленные в SEQ ID NO: 2, 4, 5, 6, 7 или 8, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности аминокислот областей CDRL1, CDRL2 и CDRL3 домена VL, представленные в SEQ ID NO: 9, причем каждый CDR определен по MacCallum, по Kabat, по Chothia, в соответствии с комбинацией определений по Kabat и по Chothia, в соответствии с системой нумерации IMGT или определением CDR согласно AbM.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), содержащее:

- (a) CDRH1, содержащую последовательность аминокислот SYSMN (SEQ ID NO: 10); и/или
- (b) CDRH2, содержащую последовательность аминокислот SSSSSSYIYYAXSVRG (SEQ ID NO: 18), где X представляет собой E или D; и/или
- (c) CDRH3, содержащую последовательность аминокислот VGLXGPFDI (SEQ ID NO: 19), где X представляет собой F или M; и/или
- (d) CDRL1, содержащую последовательность аминокислот RASQSVSRYLG (SEQ ID NO: 15); и/или

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное анти-тело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую последовательность аминокислот, происходящую из последовательности IGHV3-21 зародышевой линии человека (например, IGHV3-21*01, например, с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 21), и переменную область легкой цепи, имеющую последовательность аминокислот, происходящую из последовательности зародышевой линии человека, выбранной из группы, состоящей из IGKV3-2 0 (например, IGKV3-20*01, например, с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 22).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное анти-тело, которое перекрестно конкурирует за связывание с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) с антителом, содержащим последовательности аминокислот переменных областей тяжелой и легкой цепей, представленные в SEQ ID NO: 2 и 9; 4 и 9; 5 и 9; 6 и 9; 7 и 9; или 8 и 9, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное анти-тело, которое перекрестно конкурирует за связывание с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) с антителом, содержащим последовательности аминокислот переменных областей тяжелой и легкой цепей, представленные в SEQ ID NO: 3 и 9, соответственно.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное анти-тело, которое связывается с тем же или перекрывающимся эпитопом CTLA-4 (например, эпитопом CTLA-4 человека), что и антитело, описанное в настоящем документе, например, антитело, содержащее последовательности аминокислот переменных областей тяжелой и легкой цепей, представленные в SEQ ID NO: 2 и 9; 4 и 9; 5 и 9; 6 и 9; 7 и 9; или 8 и 9, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное анти-тело, которое связывается с тем же или перекрывающимся эпитопом CTLA-4 (например, эпитопом CTLA-4 человека), что и антитело, описанное в настоящем документе, например, антитело, содержащее последовательности аминокислот переменных областей тяжелой и легкой цепей, представленные в SEQ ID NO: 3 и 9, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации указанный эпитоп антитела может быть определен с применением, например, ЯМР-спектроскопии, поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore®), исследований методом рентгеновской дифракционной кристаллографии, анализов ИФА ELISA, обмена водорода на дейтерий, сопряженного с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии с электрораспылением), анализов методом олигопептидного сканирования на чипах и/или картирования с помощью мутагенеза (например, картирования с помощью сайт-специфического мутагенеза). При рентгеновской кристаллографии кристаллизация может осуществляться с применением любых известных в данной области техники способов (например, см. источники: Giegé R et al., (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50 (Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Кристаллы антитело:антиген могут быть исследованы с применением хорошо известных методик рентгеновской дифракции, и их структура может быть уточнена с применением компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Йельский университет, 1992, распространяется Molecular Simulations, Inc.; см., например, источники: *Meth Enzymol* (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW et al.; заявка на патент США № 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49 (Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P et al., (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 10): 1316-1323, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Исследования с картированием с помощью мутагенеза могут осуществляться с применением любого способа, известного специалисту в данной области техники; см., например, описание методик мутагенеза, в том числе методик мутагенеза с аланиновым сканированием, в источниках: Champe M et al., (1995), выше, и Cunningham BC & Wells JA (1989), выше. Согласно конкретному варианту реализации эпитоп антитела определяют, проводя исследования с применением мутагенеза с аланиновым сканированием. Кроме того, антитела, которые распознают и связывают те же или перекрывающиеся эпитопы CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), могут быть идентифицированы с применением рутинных методик, таких как иммунологический анализ, например, путем демонстрации способности одного антитела блокировать связывание другого антитела с целевым антигеном, т.е. анализа конкурентного связывания. Анализы конкурентного связывания также могут применяться для определения того, обладают ли два антитела аналогичной специфичностью связывания эпитопа. Конкурентное связывание может быть определено в анализе, где тестируемый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание референсного антитела с общим антигеном, таким как CTLA-4 (например, CTLA-4 человека). Известно множество типов анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммунологический анализ (РИА), твердофазный прямой или непрямой ферментный иммунологический анализ (ИФА), конкурентный сэндвич-анализ (см. Stahl C et al., (1983) *Methods Enzymol* 9: 242-253); твердофазный прямой ИФА с биотином-авидином (см. Kirkland TN et al., (1986) *J Immunol* 137: 3614-9); твердофазный прямой анализ с мечением, твердофазный прямой сэндвич-анализ с мечением (см. Harlow E & Lane D, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный прямой РИА с меткой 1-125 (см. Morel GA et al., (1988) *Mol*

Immunol 25(1): 7-15); твердофазный прямой ИФА с биотином-авидином (см. Cheung RC et al., (1990) *Virology* 176: 546-52); и прямой РИА с мечением (см. Moldenhauer G et al., (1990) *Scand J Immunol* 32: 77-82), каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Как правило, такой анализ включает применение очищенного антигена (например, CTLA-4, такого как CTLA-4 человека), связанного с твердой поверхностью, или клеток, несущих один из указанных Ig, немеченого тестируемого иммуноглобулина и меченого референсного иммуноглобулина. Конкурентное ингибирование может быть измерено путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клетками в присутствии тестируемого иммуноглобулина. Обычно тестируемый иммуноглобулин присутствует в избытке. Обычно при присутствии в избытке конкурирующего антитела оно ингибирует специфическое связывание референсного антитела с общим антигеном по меньшей мере на 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или более. Конкурентный анализ связывания может быть выполнен в большом числе различных форматов с применением либо меченого антигена, либо меченого антитела. В общей версии указанного анализа антиген иммобилизуют на 96-луночном планшете. Способность немеченых антител к блокированию связывания меченых антител с антигеном затем измеряют с применением радиоактивных или ферментных меток. Дополнительную подробную информацию можно найти, например, в источниках: Wagener C et al., (1983) *J Immunol* 130: 2308-2315; Wagener C et al., (1984) *J Immunol Methods* 68: 269-274; Kuroki M et al., (1990) *Cancer Res* 50: 4872-4879; Kuroki M et al., (1992) *Immunol Invest* 21: 523-538; Kuroki M et al., (1992) *Hybridoma* 11: 391-407; и *Antibodies: A Laboratory Manual*, Ed Harlow E & Lane D editors, выше, стр. 386-389, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 23, 24, 25 или 26. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 24. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 26.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), содержащее легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 27.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 23, и легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 27. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 27.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 25 и легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 27. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 26, и легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 27.

Любая константная область Ig может быть использована в антителах, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанная область Ig представляет собой молекулу иммуноглобулина человека IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY, молекулу иммуноглобулина любого класса (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂) или любого подкласса (например, IgG_{2a} и IgG_{2b}).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), содержащее константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 28, 29, 30 или 31. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), содержащее константную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 32.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), содержащее константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, содержащее мутацию, выбранную из группы, состоящей из S239D, I332E и их комбинаций в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область

тяжелой цепи IgG₁, содержащую мутации S239D и I332E в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 29.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), содержащее константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁, или ее фрагмент, содержащие мутацию, выбранную из группы, состоящей из S239D, A330L, I332E и их комбинаций в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG₁, содержащую мутации S239D, A330L, и I332E в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 30.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), содержащее константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, содержащие мутацию, выбранную из группы, состоящей из L235V, F243L, R292P, Y300L, P396L и их комбинаций в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG₁, содержащую мутации L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 31.

Согласно некоторым вариантам реализации области IgG антител, описанных в настоящем документе, обладают повышенной аффинностью в отношении FcγR3A, например, по сравнению с антителом, содержащим Fc-область дикого типа, например, IgG₁ Fc. Изменения последовательностей, которые приводят к повышенной аффинности в отношении FcγR3A, известны в данной области техники, см., например, источники: Kellner et al., *Methods* 65: 105-113 (2014), Lazar et al., *Proc Natl Acad Sci* 103: 4005-4010 (2006), Shields et al., *J Biol Chem.* 276 (9): 6591-6604 (2001), каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, содержащие мутацию, выбранную из группы, состоящей из G236A, S239D, F243L, T256A, K290A, R292P, S298A, Y300L, V305I, A330L, I332E, E333A, K334A, A339T и P396L, а также их комбинаций, в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, содержащие S239D в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, содержащие T256A в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, содержащие K290A в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, содержащие S298A в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, содержащие I332E в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, содержащие E333A в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, содержащие K334A в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, содержащие A339T в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, содержащие S239D и I332E в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, содержащие S239D, A330L и I332E в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, содержащие S298A, E333A, и K334A в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, содержащие G236A, S239D, и I332E в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, например, константную область IgG₁ или ее фрагмент, содержащие F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L в соответствии с системой нумерации EU.

Согласно некоторым вариантам реализации антитела, описанные в настоящем документе, демонстрируют антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ-активность). Согласно некоторым вариантам реализации антитела, описанные в настоящем документе, инициируют опосредованное естественными клетками-киллерами истощение клеток. Согласно некоторым вариантам реализации антитела, описанные в настоящем документе, используют для лечения опухоли, инфильтрованной естественными клетками-киллерами. Согласно некоторым вариантам реализации антитела, описанные в настоящем документе, демонстрируют антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ-активность). Согласно некоторым вариантам реализации антитела, описанные в настоящем документе, инициируют опосредованное макрофагами истощение клеток. Согласно некоторым вариантам реализации антитела, описанные в настоящем документе, используют для лечения опухоли, инфильтрованной макрофагами. Согласно некоторым вариантам реализации антитела, описанные в настоящем документе, селективно истощают внутриопухолевые регуляторные Т-клетки.

Согласно некоторым вариантам реализации антитела, описанное в настоящем документе, представляет собой активируемое антитело, которое в активированном состоянии связывает белок CTLA-4 человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанное активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент, который ингибирует связывание указанного антитела в нерасщепленном состоянии с белком CTLA-4 человека, и по меньшей мере один расщепляемый фрагмент, сопряженный с указанным антителом, при этом, например, указанный расщепляемый фрагмент представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата протеазы, которой обогащено микроокружение опухоли. Примеры активируемых антител описаны, например, в патентах США № 8513390 и № 8518404, и в опубликованных заявках на патент США US 2014/0255313, US 2014/0010810, US 2014/0023664, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации указанное активируемое антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG человека, которая представляет собой вариант константной области тяжелой цепи IgG человека дикого типа, причем указанный вариант константной области тяжелой цепи IgG человека связывается с человека FcγR1IIIA с большей аффинностью по сравнению с аффинностью связывания константной области тяжелой цепи IgG человека дикого типа с FcγR1IIIA человека.

Согласно некоторым вариантам реализации одну, две или более мутаций (например, замены аминокислот) вводят в Fc-область антитела, описанного в настоящем документе (например, домен CH2 (остатки 231-340 IgG₁ человека), и/или домен CH3 (остатки 341-447 IgG₁ человека), и/или шарнирную область в соответствии с системой нумерации EU), для изменения одного или более функциональных свойств указанного антитела, таких как время полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание Fc-рецептора и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность.

Согласно некоторым вариантам реализации одну, две или более мутаций (например, замен аминокислот) вводят в шарнирную область Fc-области (домен CH1) таким образом, чтобы изменить число остатков цистеина в шарнирной области (например, увеличить или уменьшить) согласно описанию, например, в патенте США № 5677425, включенном в настоящий документ полностью посредством ссылки. Число остатков цистеина в шарнирной области домена CH1 может быть изменено, например, для облегчения сборки легких и тяжелых цепей, или для изменения (например, увеличения или уменьшения) стабильности антитела.

Согласно конкретному варианту реализации одну, две или более мутаций аминокислот (например, замен, инсерций или делеций) вводят в константный домен IgG или его связывающий FcRn фрагмент (предпочтительно фрагмент домена Fc или шарнира-Fc) для изменения (например, уменьшения или увеличения) времени полужизни антитела *in vivo*; см., например, международные публикации №№ WO 02/060919; WO 98/23289; и WO 97/34631; и патенты США № 5869046, № 6121022, № 6277375 и № 6165745, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки, с примерами мутаций, которые изменяют (например, уменьшения или увеличения) время полужизни антитела *in vivo*. Согласно некоторым вариантам реализации одну, две или более мутаций аминокислот (например, замен, инсерций, или делеций) вводят в константный домен IgG или его связывающий FcRn фрагмент (предпочтительно, фрагмент домена Fc или шарнира-Fc) для уменьшения времени полужизни антитела *in vivo*. Согласно другим вариантам реализации одну, две или более мутаций аминокислот (например, замен, инсерций или делеций) вводят в константный домен IgG или его связывающий FcRn фрагмент (предпочтительно фрагмент домена Fc или шарнира-Fc) для увеличения времени полужизни антитела *in vivo*. Согласно конкретному варианту реализации указанные антитела могут содержать одну или более мутаций аминокислот (например, замен) во втором константном (CH2) домене (остатки 231-340 IgG₁ человека) и/или третьем константном (CH3) домене (остатки 341-447 IgG₁ человека) в соответствии с системой нумерации EU. Согласно конкретному варианту реализации константная область IgG₁ антитела, описанного в настоящем документе, содержит замену метионина (M) на тирозин (Y) в положении 252, замену серина (S) на треонин (T) в положении 254 и замену треонина (T) на глутаминовую кислоту (E) в положении 256 в соответствии с системой нумерации EU; см. патент США № 7658921, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Указанный тип мутантного IgG, назы-

ваемый "мутантом YTE", как было показано, демонстрирует 4-кратно увеличенное время полужизни по сравнению с вариантами дикого типа того же антитела (см. источник: Dall'Acqua WF et al., (2006) *J Biol Chem* 281: 23514-24, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Согласно некоторым вариантам реализации антитело содержит константный домен IgG, содержащий одну, две, три или более замен остатков аминокислот в положениях 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436 в соответствии с системой нумерации EU.

Согласно некоторым вариантам реализации одна, две или более мутаций (например, замен аминокислот) вводят в Fc-область антитела, описанного в настоящем документе (например, в домен CH2 (остатки 231-340 IgG₁ человека), и/или домен CH3 (остатки 341-447 IgG₁ человека), и/или шарнирную область в соответствии с системой нумерации EU, для увеличения или уменьшения аффинности указанного антитела в отношении Fc-рецептора (например, активированного Fc-рецептора) на поверхности эффекторной клетки. Мутации в Fc-области антитела, которые уменьшают или увеличивают аффинность антитела в отношении Fc-рецептора, и методики введения таких мутаций в область Fc или ее фрагмент известны специалисту в данной области техники. Примеры мутаций в области Fc антитела, которые могут быть осуществлены для изменения аффинности антитела в отношении Fc-рецептора, описаны, например, в источниках: Smith P et al., (2012) *PNAS* 109: 6181-6186, в патенте США № 6737056 и международных публикациях WO 02/060919; WO 98/23289; и WO 97/34631, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно дополнительному варианту реализации одну, две или более замен аминокислот вводят в Fc-область из константных доменов IgG для изменения эффекторной функции или функций антитела. Например, одна или более аминокислот, выбранных из остатков аминокислот 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322 в соответствии с системой нумерации EU, могут быть заменены другим остатком аминокислоты, таким образом, что аффинность антитела в отношении эффекторного лиганда изменяется, но оно сохраняет антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность в отношении которого изменяется, может представлять собой, например, Fc-рецептор или компонент C1 комплемента. Указанный подход подробнее описан в патентах США № 5624821 и № 5648260, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации делеция или инактивация (путем точечных мутаций или применения других способов) домена константной области могут снижать связывание Fc-рецептора циркулирующим антителом, с увеличением таким образом локализации в опухоли; см., например, патенты США № 5585097 и № 8591886, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки, где описаны мутации, которые делетируют или инактивируют константный домен и таким образом увеличивают локализацию в опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации одна или более замен аминокислот могут быть введены в Fc-область антитела, описанного в настоящем документе, для удаления потенциальных сайтов гликозилирования в Fc-области, которые могут снижать связывание Fc-рецептора (см., например, источник: Shields RL et al., (2001) *J Biol Chem* 276: 6591-604, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Согласно различным вариантам реализации могут быть осуществлены одна или более следующих мутаций в константной области антитела, описанного в настоящем документе: замена N297A; замена N297Q; замена L235A и замена L237A; замена L234A и замена L235A; замена E233P; замена L234V; замена L235A; делеция C236; замена P238A; замена D265A; замена A327Q; или замена P329A в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации мутация, выбранная из группы, состоящей из D265A, P329A и их комбинации в соответствии с системой нумерации EU, может быть осуществлена в константной области антитела, описанного в настоящем документе.

Согласно конкретному варианту реализации антитело, описанное в настоящем документе, содержит константный домен IgG₁ с заменой аминокислоты N297Q или N297A в соответствии с системой нумерации EU. Согласно одному варианту реализации антитело, описанное в настоящем документе, содержит константный домен IgG₁ с мутацией, выбранной из группы, состоящей из D265A, P329A и их комбинации в соответствии с системой нумерации EU. Согласно другому варианту реализации антитело, описанное в настоящем документе, содержит константный домен IgG₁ с мутацией, выбранной из группы, состоящей из L234A, L235A и их комбинации в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации остатки аминокислот в константной области антитела, описанного в настоящем документе, в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG₁ человека в соответствии с системой нумерации EU, не являются L, L и D, соответственно. Указанный подход подробно описан в международной публикации WO 14/108483, которая включена в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно конкретному варианту реализации аминокислоты, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG₁ человека, представляют собой F, E и A; или A, A и A, соответственно, в соответствии с системой нумерации EU.

Согласно некоторым вариантам реализации одна или более аминокислот, выбранных из остатков аминокислот 329, 331 и 322 в константной области антитела, описанного в настоящем документе, в соответствии с системой нумерации EU, могут быть заменены другим остатком аминокислоты таким образом, чтобы обеспечить изменение связывания указанного антитела с C1q, и/или снижение или удаление

ние опосредованной им комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ). Указанный подход подробнее описан в патенте США № 6194551 (Idusogie et al.), который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации один или более остатков аминокислот изменяют, с изменением таким образом способности указанного антитела к фиксации комплемента, в пределах положений аминокислот 231-238 N-концевой области домена CH2 антитела, описанного в настоящем документе, в соответствии с системой нумерации EU. Указанный подход подробнее описан в международной публикации WO 94/29351, которая включена в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации Fc-область антитела, описанного в настоящем документе, модифицируют для увеличения способности указанного антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) и/или для увеличения аффинности указанного антитела в отношении Fc γ -рецептора, путем мутаций одной или более аминокислот (например, введения замен аминокислот) в следующих положениях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439 в соответствии с системой нумерации EU. Указанный подход подробнее описан в международной публикации WO 00/42072, которая включена в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело, описанное в настоящем документе, содержит константную область антитела IgG₄ и серин вместо пролина в положении остатка аминокислоты 228 тяжелой цепи в соответствии с системой нумерации EU.

Согласно некоторым вариантам реализации любая из мутаций или модификаций константной области, описанных в настоящем документе, может быть введена в одну или обе константные области тяжелых цепей антитела, описанного в настоящем документе, содержащего две константные области тяжелых цепей.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) и функционирует в качестве антагониста.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) и уменьшает активность CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе и/или известных специалисту в данной области техники, по сравнению с активностью CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) без какого-либо антитела или в присутствии неродственного антитела (например, антитела, которое специфически не связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека)). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) и уменьшает активность CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) по меньшей мере приблизительно 1,2-кратно, 1,3-кратно, 1,4-кратно, 1,5-кратно, 2-кратно, 2,5-кратно, 3-кратно, 3,5-кратно, 4-кратно, 4,5-кратно, 5-кратно, 6-кратно, 7-кратно, 8-кратно, 9-кратно, 10-кратно, 15-кратно, 20-кратно, 30-кратно, 40-кратно, 50-кратно, 60-кратно, 70-кратно, 80-кратно, 90-кратно или 100-кратно по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе и/или известных специалисту в данной области техники, по сравнению с активностью CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) без какого-либо антитела или в присутствии неродственного антитела (например, антитела, которое специфически не связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека)). Неограничивающие примеры активности CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) могут включать CTLA-4-сигнализацию (например, CTLA-4 человека), связывание CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) с лигандом CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) (например, CD80 или CD86) и ингибирование продуцирования цитокинов (например, ИЛ-2, ИФН- γ или ФНО- α). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) и дезактивирует, уменьшает или ингибирует активность CTLA-4 (например, CTLA-4 человека). Согласно конкретным вариантам реализации уменьшение активности CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) оценивают согласно описанию в примерах, ниже.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) и уменьшает связывание CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) с его лигандом (например, CD80 или CD86) по меньшей мере приблизительно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, по оценке с применением способов, известных специалисту в данной области техники, по сравнению со связыванием CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) с его лигандом (например, CD80 или CD86) без какого-либо антитела или в присутствии неродственного антитела (например, антитела, которое специфически не связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека)). Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело,

которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) и уменьшает связывание CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) с его лигандом (например, CD80 или CD86) по меньшей мере приблизительно 1,2-кратно, 1,3-кратно, 1,4-кратно, 1,5-кратно, 2-кратно, 2,5-кратно, 3-кратно, 3,5-кратно, 4-кратно, 4,5-кратно, 5-кратно, 6-кратно, 7-кратно, 8-кратно, 9-кратно, 10-кратно, 15-кратно, 20-кратно, 30-кратно, 40-кратно, 50-кратно, 60-кратно, 70-кратно, 80-кратно, 90-кратно или 100-кратно, по оценке с применением способов, известных специалисту в данной области техники, по сравнению со связыванием CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) с его лигандом (например, CD80 или CD86) без какого-либо антитела или в присутствии неродственного антитела (например, антитела, которое специфически не связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека)).

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) и увеличивает продуцирование цитокинов (например, ИЛ-2, ИФН- γ или ФНО- α) по меньшей мере приблизительно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. примеры, ниже) или известных специалисту в данной области техники, по сравнению с продуцированием цитокинов без какого-либо антитела или в присутствии неродственного антитела (например, антитела, которое специфически не связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека)). Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) и увеличивает продуцирование цитокинов (например, ИЛ-2, ИФН- γ или ФНО- α) по меньшей мере приблизительно 1,2-кратно, 1,3-кратно, 1,4-кратно, 1,5-кратно, 2-кратно, 2,5-кратно, 3-кратно, 3,5-кратно, 4-кратно, 4,5-кратно, 5-кратно, 6-кратно, 7-кратно, 8-кратно, 9-кратно, 10-кратно, 15-кратно, 20-кратно, 30-кратно, 40-кратно, 50-кратно, 60-кратно, 70-кратно, 80-кратно, 90-кратно или 100-кратно, по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. примеры, ниже) или известных специалисту в данной области техники, по сравнению с продуцированием цитокинов без какого-либо антитела или в присутствии неродственного антитела (например, антитела, которое специфически не связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека)).

Согласно некоторым вариантам реализации продуцирование ИЛ-2 мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) человека, стимулированными стафилококковым энтеротоксином А (SEA) в присутствии антитела, описанного в настоящем документе, которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), увеличивается по меньшей мере приблизительно 1,2-кратно, 1,3-кратно, 1,4-кратно, 1,5-кратно, 2-кратно, 2,5-кратно, 3-кратно, 3,5-кратно, 4-кратно, 4,5-кратно, 5-кратно, 6-кратно, 7-кратно, 8-кратно, 9-кратно, 10-кратно, 15-кратно, 20-кратно, 30-кратно, 40-кратно, 50-кратно, 60-кратно, 70-кратно, 80-кратно, 90-кратно или 100-кратно по сравнению с МКПК, стимулированными только SEA без какого-либо антитела или в присутствии неродственного антитела (например, антитела, которое специфически не связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека)), по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. примеры, ниже) или известных специалисту в данной области техники.

Фармацевтические композиции.

Согласно настоящему изобретению предложены композиции, содержащие антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, обладающее требуемой степенью чистоты, в физиологически приемлемом носителе, вспомогательном веществе или стабилизаторе (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях, и включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, в том числе аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензилхлорид аммония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем из приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (например, комплексы Zn с белком); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEENTM, плуроники (PLURONICSTM) или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Согласно конкретному варианту реализации фармацевтические композиции содержат антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, и, необязательно, один или более дополнительных профилактических или терапевтических агентов в фармацевтически приемлемом носителе. Согласно конкретному варианту реализации фармацевтические композиции содержат эффективное количество антитела, описанного в настоящем документе, или его антигенсвязывающего фрагмента и, необязательно, один или более дополнительных профилактических или терапевтических агентов в фармацевтически

приемлемом носителе. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой единственный активный ингредиент, включенный в фармацевтическую композицию. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут подходить для применения при ингибировании активности CTLA-4 и лечении такого состояния, как рак или инфекционное заболевание.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, для применения в качестве медикамента.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, для применения в способе лечения рака.

Фармацевтически приемлемые носители, используемые в парентеральных составах, включают водные основы, неводные основы, противомикробные агенты, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспензирующие и диспергирующие агенты, эмульгирующие агенты, секвестрирующие или хелатирующие агенты и другие фармацевтически приемлемые вещества. Примеры водных основ включают хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, изотонический раствор декстрозы для инъекций, стерильная вода для инъекций, и раствор Рингера с декстрозой и лактатом для инъекций. Неводные парентеральные основы включают нелетучие масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и арахисовое масло. В парентеральные составы, упакованные в многдозные контейнеры, могут быть добавлены противомикробные агенты в бактериостатических или фунгистатических концентрациях, которые включают фенолы или крезолы, ртуть-содержащие вещества, бензиловый спирт, хлорбутанол, метиловые и пропиловые сложные эфиры п-гидроксибензойной кислоты, тимеросал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. Изотонические агенты включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфат и цитрат. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. Местные анестетики включают гидрохлорид прокаина. Суспензирующие и диспергирующие агенты включают карбоксиметилцеллюлозу натрия, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон.

Эмульгирующие агенты включают Полисорбат 80 (TWEEN® 80). Секвестрирующий или хелатирующий ионы металлов агент включает ЭДТК. Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для смешивающихся с водой основ; и гидроксид натрия, соляную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для коррекции pH.

Фармацевтическая композиция может быть введена в состав для любого маршрута введения субъекту. Специфические примеры маршрутов введения включают интраназальный, пероральный, легочный, чрескожный, внутрикожный и парентеральный.

Парентеральное введение, характеризующееся подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекцией, также предусмотрено настоящим изобретением. Составы для инъекций могут быть получены в стандартной форме, либо в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, подходящих для растворения или суспензирования в жидкости перед инъекцией, либо в виде эмульсий. Составы для инъекций, растворы и эмульсии также содержат одно или более вспомогательных веществ. Подходящие вспомогательные вещества представляют собой, например, воду, солевой раствор, декстрозу, глицерин или этанол. Кроме того, если требуется, фармацевтические композиции для введения могут также содержать незначительные количества нетоксичных сопутствующих веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, pH-буферные агенты, стабилизаторы, усилители растворимости и другие такие агенты, такие как, например, ацетат натрия, сорбитанмонолаурат, триэтаноламинолеат и циклодекстрины.

Составы для парентерального введения антитела включают готовые стерильные растворы для инъекций, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые к комбинированию с растворителем непосредственно перед применением, в том числе таблетки для подкожного введения, готовые стерильные суспензии для инъекций, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые к комбинированию с основой непосредственно перед применением, и стерильные эмульсии. Указанные растворы могут быть либо водными, либо неводными.

При внутривенном введении подходящие носители включают физиологический солевой раствор или забуференный фосфатом солевой раствор (ФСБ), а также растворы, содержащие загущающие и солюбилизующие агенты, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль, а также их смеси.

Смеси для местного применения, содержащие антитело, получают согласно описанию для местного и системного введения. Итоговая смесь может представлять собой раствор, суспензию, эмульсию или т.п., и может быть введена в состав кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, эликсиров, лосьонов, суспензий, настоек, пасты, пены, аэрозолей, составов для орошения, спреев, суппозиторий, повязок, дермальных пластырей или любых других составов, подходящих для местного введения.

Антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, может быть введено в состав аэрозоля для местного применения, например, путем ингаляции (см., например, патенты США № 4044126,

№ 4414209 и № 4364923, где описаны аэрозоли для доставки стероида, подходящего для лечения воспалительных заболеваний, в частности, астмы и включены в настоящий документ полностью посредством ссылки). Указанные составы для введения в дыхательные пути могут принимать форму аэрозоля или раствора для небулайзера, или микродисперсного порошка для инсуффляций, по отдельности или в комбинации с инертным носителем, таким как лактоза. В таком случае частицы указанного состава имеют, согласно одному варианту реализации, диаметры менее чем 50 мкм, согласно одному варианту реализации - менее чем 10 мкм.

Антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, может быть введено в состав для локального или местного применения, например, для местного нанесения на кожу и слизистые мембраны, например, в глазах, в форме гелей, кремов и лосьонов, и для нанесения на глаза; или для интрацестерального или интраспинального применения. Местное введение предусматривает чрескожную доставку, а также введение в глаза или слизистую оболочку, или ингаляционную терапию. Также могут вводиться назальные растворы антитела по отдельности или в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

Чрескожные пластыри, в том числе ионтофоретические и электрофоретические устройства, хорошо известны специалистам в данной области техники, и могут применяться для введения антитела. Например, такие пластыри описаны в патентах США № 6267983, № 6261595, № 6256533, № 6167301, № 6024975, № 6010715, № 5985317, № 5983134, № 5948433 и № 5860957, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации фармацевтическая композиция, содержащая антитело, описанное в настоящем документе, или его антигенсвязывающий фрагмент, представляет собой лиофилизированный порошок, который может быть восстановлен для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Он может также быть восстановлен и введен в твердые составы или гели. Лيوфилизированный порошок получают, растворяя антитело, описанное в настоящем документе, или его антигенсвязывающий фрагмент, или его фармацевтически приемлемое производное в подходящем растворителе. Согласно некоторым вариантам реализации указанный лиофилизированный порошок стерилен. Растворитель может содержать вспомогательное вещество, которое повышает стабильность, или другой фармакологический компонент порошка или восстановленного раствора, полученного из указанного порошка. Подходящие для применения вспомогательные вещества включают, не ограничиваясь перечисленными, декстрозу, сорбит, фруктозу, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу или другой подходящий агент. Растворитель может также содержать буфер, такой как цитрат, фосфат натрия или калия или другой подобный буфер, известный специалистам в данной области техники, согласно одному варианту реализации имеющий приблизительно нейтральное значение pH. Последующая стерилизующая фильтрация раствора, за которой следует лиофилизация в стандартных условиях, известных специалистам в данной области техники, обеспечивает получение требуемого состава. Согласно одному варианту реализации итоговый раствор распределяют по сосудам для лиофилизации. Каждый сосуд содержит однократную дозу или несколько доз соединения. Лيوфилизированный порошок может храниться в подходящих условиях, например, от температуры приблизительно 4°C до комнатной. Восстановление указанного лиофилизированного порошка водой для инъекций обеспечивает получение состава для применения при парентеральном введении. Для восстановления лиофилизированный порошок добавляют в стерильную воду или другой подходящий носитель. Точное количество зависит от выбранного соединения. Такое количество может быть определено эмпирическим путем.

Антитела против CTLA-4, описанные в настоящем документе, и другие композиции, предложенные согласно настоящему изобретению, могут также быть введены в состав для нацеливания на конкретную ткань, рецептор или другую область организма субъекта, подлежащего лечению. Многие такие способы нацеливания хорошо известны специалистам в данной области техники. Все такие способы нацеливания предусмотрены настоящим изобретением для применения в предложенных композициях. Неограничивающие примеры способов нацеливания описаны, например, в патентах США № 6316652, № 6274552, № 6271359, № 6253872, № 6139865, № 6131570, № 6120751, № 6071495, № 6060082, № 6048736, № 6039975, № 6004534, № 5985307, № 5972366, № 5900252, № 5840674, № 5759542 и № 5709874, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно конкретному варианту реализации антитело, описанное в настоящем документе, или его антигенсвязывающий фрагмент нацелен(о) на опухоль.

Композиции для введения *in vivo* могут быть стерильными. Стерильность может быть легко обеспечена путем фильтрации через, например, мембраны для стерилизующей фильтрации.

Способы и варианты применения

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта с применением антитела против CTLA-4, описанного в настоящем документе. Лечение любого заболевания или расстройства у субъекта, при котором будет благоприятным ингибирование функции CTLA-4, может быть проведено с применением антитела против CTLA-4, описанного в настоящем документе. Антитела против CTLA-4, описанные в настоящем документе, в частности, подходят для ингибирования толерантности иммунной системы в отношении опухолей и, соответственно, могут применяться в качестве имму-

нотерапии для субъектов, страдающих раком. Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества антитела против CTLA-4 или содержащей его фармацевтической композиции согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ лечения рака у субъекта, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества антитела или фармацевтической композиции согласно описанию в настоящем документе.

Виды рака, лечение которых может быть проведено с применением антител, терапевтических комбинаций или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, включают, без ограничения, солидный рак (например, рецидивировавший или рефрактерный солидный рак, и распространенный или метастатический солидный рак), карциному, саркому, меланому (например, меланому III стадии или IV стадии), мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, уротелиальный рак, рак яичников, рак предстательной железы (например, метастатический гормонально-рефрактерный рак предстательной железы и прогрессирующий метастатический рак предстательной железы), рак поджелудочной железы, рак молочной железы (например, HER2⁺ рак молочной железы (например, рецидивирующий/рефрактерный HER2⁺ рак молочной железы)), рак головы и шеи (например, рецидивирующую/рефрактерную плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC)), глиому, злокачественную глиому, мультиформную глиобластому, метастазы в головной мозг, рак из клеток Меркеля, рак желудка, гастроэзофагеальный рак, почечноклеточный рак, увеальную меланому, рак толстой кишки, рак шейки матки, лимфому (например, рецидивировавшую или рефрактерную лимфому), неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, лейкоз и множественную миелому.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак лечат путем внутриопухолевого введения антитела, терапевтической комбинации или фармацевтической композиции, описанных в настоящем документе. Виды рака, лечение которых может быть проведено путем внутриопухолевого введения антител, терапевтических комбинаций или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, включают, без ограничения, солидные опухоли (например, распространенные или метастатические солидные опухоли), рак головы и шеи (например, рецидивирующую/рефрактерную плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC)) и рак молочной железы (например, HER2⁺ рак молочной железы (например, рецидивирующий/рефрактерный HER2⁺ рак молочной железы)).

Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой солидную опухоль. Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой метастатический или местнораспространенный рак (например, метастатическую или местнораспространенную солидную опухоль). Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак лечат в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, в качестве первой противораковой терапии после диагностирования указанной метастатической или местнораспространенной опухоли (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования). Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак лечат в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, в качестве первой противораковой терапии после диагностирования прогрессирующей опухоли (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования прогрессирующей опухоли), которое произошло несмотря на предшествующее лечение указанной опухоли с применением другой противораковой терапии, при этом необязательно способ, описанный в настоящем документе, применяют в качестве второй применяемой противораковой терапии. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак лечат в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, в качестве первой противораковой терапии после диагностирования токсичности другой противораковой терапии (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования токсичности другой противораковой терапии), при этом необязательно способ, описанный в настоящем документе, применяют в качестве второй применяемой противораковой терапии. Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой метастатический или местнораспространенный рак (например, солидную опухоль), доступная стандартная терапия для лечения которого отсутствует. Согласно другим вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой метастатический или местнораспространенный рак (например, солидную опухоль), лечение которого с применением стандартной терапии было неуспешным (т.е. указанный рак прогрессировал после проведения стандартной терапии). Согласно некоторым вариантам реализации терапия является неуспешной, если рак рефрактерен к указанной терапии. Согласно некоторым вариантам реализации терапия является неуспешной, если рак рецидивирует после ответа, полного или частичного, на указанную терапию. Согласно некоторым вариантам реализации метастатический или местнораспространенный рак (например, солидную опухоль) был подтвержден гистологически или цитологически.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой солидную опухоль.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак (например, солидная опухоль) экспрессирует PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце рака (например, солидной опухоли), которые демонстрируют детектируемую экспрессию (например, частичную или полную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 1% (например, по меньшей мере 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%). Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце рака (например, солидной опухоли), которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 1% (например, по меньшей мере 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%). Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце рака (например, солидной опухоли), которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 1%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце рака (например, солидной опухоли), которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 5%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце рака (например, солидной опухоли), которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 25%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце рака (например, солидной опухоли), которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 50%.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный метастатический или местнораспространенный рак (например, солидная опухоль) экспрессирует PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатического или местнораспространенного рака (например, солидной опухоли), которые демонстрируют детектируемую экспрессию (например, частичную или полную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 1% (например, по меньшей мере 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%). Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатического или местнораспространенного рака (например, солидной опухоли), которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 1% (например, по меньшей мере 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%). Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатического или местнораспространенного рака (например, солидной опухоли), которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 1%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатического или местнораспространенного рака (например, солидной опухоли), которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 5%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатического или местнораспространенного рака (например, солидной опухоли), которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 25%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатического или местнораспространенного рака (например, солидной опухоли), которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 50%.

Для всех и каждого из способов, описанных в настоящем документе, требующих, чтобы определенный процент клеток в образце проявлял детектируемую экспрессию (например, мембранную экспрессию, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, экспрессия PD-L1 может быть детектирована любым способом, хорошо известным в данной области техники, в том числе, но не ограничиваясь указанным, путем иммуногистохимического исследования.

Примеры иммуногистохимических анализов для измерения экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках предложены в источниках: Hirsch et al. (2017, *J. Thoracic Oncol.* 12(2): 208-222), Rimm et al. (2017, *JAMA Oncol.* 3(8): 1051-1058), и Diggs and Hsueh (2017, *Biomarker Res.* 5:12), которые включены посредством ссылки в настоящий документ полностью.

Согласно некоторым вариантам указанный рак, который лечат в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, представляет собой метастатический или местнораспространенный немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, представляет собой метастатический немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, представляет собой метастатический или местнораспространенный НМРЛ IV стадии. Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способом, описанным в настоящем документе представляет собой метастатический НМРЛ IV стадии. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце

метастатического или местнораспространенного НМРЛ, которые проявляют детектируемую экспрессию (например, частичную или полную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатического или местнораспространенного НМРЛ, которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатического или местнораспространенного НМРЛ, которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 1%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатического или местнораспространенного НМРЛ, которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 5%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатического или местнораспространенного НМРЛ, которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 25%. Согласно некоторым вариантам реализации процент опухолевых клеток в образце метастатического или местнораспространенного НМРЛ, которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 50%. Согласно некоторым вариантам реализации указанный метастатический или местнораспространенный НМРЛ не характеризуется геномными опухолевыми абберациями рЭФР или ALK. Согласно некоторым вариантам реализации указанный метастатический или местнораспространенный НМРЛ не характеризуется сенситизирующей мутацией рЭФР (например, мутацией, которая поддается лечению ингибитором тирозинкиназы, включая эрлотиниб, gefitinib или афатиниб) или транслокацией ALK. Согласно некоторым вариантам реализации субъект, страдающий метастатическим или местнораспространенным НМРЛ, ранее не получал системного химиотерапевтического лечения метастатического или местнораспространенного НМРЛ. Согласно некоторым вариантам реализации указанный метастатический или местнораспространенный НМРЛ лечат в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, в качестве первой противораковой терапии после диагностирования (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования) метастатического или местнораспространенного НМРЛ. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает лечение субъекта, страдающего НМРЛ (например, метастатическим или местнораспространенным НМРЛ IV стадии), с применением антитела против CTLA-4, описанного в настоящем документе, например, AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E), или фармацевтической композиции, содержащей такое антитело против CTLA-4, при этом процент опухолевых клеток в образце НМРЛ, которые демонстрируют детектируемую мембранную экспрессию (например, частичную или полную мембранную экспрессию) PD-L1, составляет по меньшей мере 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%, и при этом указанный способ предложен в качестве первой противораковой терапии после диагностирования рака шейки матки (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования).

Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой рак шейки матки. Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой метастатическую или местнораспространенную нерезектабельную плоскоклеточную карциному, железисто-плоскоклеточную карциному или аденокарциному шейки матки. Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой нерезектабельный или метастатический рак шейки матки. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак шейки матки прогрессировал после стандартной терапии (например, рецидивировал после указанной стандартной терапии или рефрактерен к указанной стандартной терапии). Согласно некоторым вариантам реализации указанная стандартная терапия включает платиносодержащую химиотерапию. Согласно некоторым вариантам реализации указанная платиносодержащая химиотерапия выбрана из группы, состоящей из цисплатина, карбоплатина, оксалиплатина, недаплатина, сатраплатина, пикоплатина, триплатина, фенантриплатина, ипроплатина, лобоплатина, гептаплатина, липоплатина и их комбинации. Согласно некоторым вариантам реализации указанная стандартная терапия дополнительно включает вторую химиотерапию. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вторая химиотерапия выбрана из группы, состоящей из аналога нуклеотида (например, гемцитабина), антиметаболита фолатов (например, пеметрекседа) и таксана (например, паклитаксела). Согласно некоторым вариантам реализации указанная стандартная терапия представляет собой двухкомпонентную химиотерапию на основе платины (РТ-ДК) (также известную как двухкомпонентная платиносодержащая химиотерапия), известную в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации указанная РТ-ДК включает цисплатин и гемцитабин, цисплатин и пеметрексед, цисплатин и паклитаксел, карбоплатин и паклитаксел, или цисплатин и топотекан. Стандартная терапия (например, включающая

РТ-ДК) может необязательно дополнительно включать один или более дополнительных видов терапии, таких как бевацизумаб. Согласно некоторым вариантам реализации указанная стандартная терапия включает паклитаксел и топотекан. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак шейки матки является ВПЧ-положительным. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак шейки матки ассоциирован с микросателлитной нестабильностью. Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой метастатическую или местнораспространенную нерезектабельную плоскоклеточную карциному, железисто-плоскоклеточную карциному или аденокарциному шейки матки, которая рецидивировала после двухкомпонентной платиносодержащей химиотерапии, проведенной для лечения распространенного (рецидивирующего, нерезектабельного или метастатического) заболевания. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак шейки матки лечат в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, в качестве первой противораковой терапии после диагностирования рака шейки матки (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования). Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак шейки матки лечат в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, в качестве первой противораковой терапии после диагностирования прогрессирующей опухоли (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования прогрессирующей опухоли), которое произошло несмотря на предшествующее лечение рака шейки матки с применением другой противораковой терапии, при этом необязательно способ, описанный в настоящем документе, применяют в качестве второй применяемой противораковой терапии. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак шейки матки лечат в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, в качестве первой противораковой терапии после диагностирования токсичности другой противораковой терапии (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования токсичности другой противораковой терапии), при этом необязательно способ, описанный в настоящем документе, применяют в качестве второй применяемой противораковой терапии. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает лечение субъекта, страдающего раком шейки матки (например, метастатической или местнораспространенной нерезектабельной плоскоклеточной карциномой, железисто-плоскоклеточной карциномой или аденокарциномой шейки матки), с применением антитела против CTLA-4, описанного в настоящем документе, например, AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E), или фармацевтической композиции, содержащей такое антитело против CTLA-4, при этом указанный способ предложен в качестве первой противораковой терапии после диагностирования рака шейки матки (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования). Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает лечение субъекта, страдающего раком шейки матки (например, метастатической или местнораспространенной нерезектабельной плоскоклеточной карциномой, железисто-плоскоклеточной карциномой или аденокарциномой шейки матки), с применением антитела против CTLA-4, описанного в настоящем документе, например, AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E), или фармацевтической композиции, содержащей такое антитело против CTLA-4, при этом указанный способ применяют после диагностирования прогрессирующей опухоли (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования прогрессирующей опухоли), которое произошло несмотря на предшествующее лечение рака шейки матки с применением другой противораковой терапии, или применяют после диагностирования токсичности другой противораковой терапии (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования токсичности другой противораковой терапии), и при этом способ, описанный в настоящем документе, предложен в качестве второй применяемой противораковой терапии.

Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой кожную плоскоклеточную карциному (cSCC). Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой кожную плоскоклеточную карциному (cSCC) IV стадии. Согласно некоторым вариантам реализации указанная cSCC (например, cSCC IV стадии) не излечима с помощью лучевой терапии. Согласно некоторым вариантам реализации указанную cSCC IV стадии диагностируют гистологически или цитологически в соответствии с 8-м изданием руководства по стадированию рака Американского объединенного онкологического комитета (AJCC-8). Согласно некоторым вариантам реализации указанную cSCC (например, cSCC IV стадии) лечат в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, в качестве первой противораковой терапии после диагностирования указанной cSCC (например, cSCC IV стадии) (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования). Согласно некоторым вариантам реализации указанную cSCC (например, cSCC IV стадии) лечат в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, в качестве первой противораковой терапии после диагностирования прогрессирующей опухоли (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования прогрессирующей опухоли), которое произошло не-

смотря на предшествующее лечение указанной cSCC (например, cSCC IV стадии) с применением другой противораковой терапии, при этом необязательно способ, описанный в настоящем документе, применяются в качестве второй применяемой противораковой терапии. Согласно некоторым вариантам реализации указанную cSCC (например, cSCC IV стадии) лечат в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, в качестве первой противораковой терапии после диагностирования токсичности другой противораковой терапии (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 недель; или 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 месяцев после диагностирования токсичности другой противораковой терапии), при этом необязательно способ, описанный в настоящем документе, применяются в качестве второй применяемой противораковой терапии.

Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой В-клеточную лимфому (например, В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз, В-клеточную неходжкинскую лимфому, кожную В-клеточную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому), базально-клеточную карциному, рак мочевого пузыря, бластома, метастазы в головной мозг, рак молочной железы, лимфому Беркитта, карциному (например, аденокарциному (например, гастроэзофагеального соединения)), рак шейки матки, рак толстой кишки, рак ободочной и прямой кишки (рак толстой кишки и рак прямой кишки), карциному эндометрия, рак пищевода, саркому Юинга, фолликулярную лимфому, рак желудка, карциному гастроэзофагеального соединения, рак желудочно-кишечного тракта, глиобластома (например, мультиформную глиобластома, например, впервые диагностированную или рецидивирующую), глиому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточную карциному головы и шеи), метастазы в печень, лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому, рак почки (например, почечноклеточный рак и опухоли Вильмса), рак гортани, лейкоз (например, хронический миелоцитарный лейкоз, лейкоз ворсистых клеток), рак печени (например, карциному печени и гепатому), рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого и мелкоклеточный рак легкого), лимфобластную лимфому, лимфому, мантийноклеточную лимфому, метастатическую опухоль головного мозга, метастатический рак, миелому (например, множественную миелому), нейробластома, меланому глаза, рак ротоглотки, остеосаркому, рак яичников, рак поджелудочной железы (например, протоковую аденокарциному поджелудочной железы), рак предстательной железы (например, гормонально-рефрактерный (например, кастрационно-резистентный), метастатический, метастатический гормонально-рефрактерный (например, кастрационно-резистентный андроген-независимый)), почечноклеточный рак (например, метастатический), карцинома слюнной железы, саркому (например, рабдомиосаркому), рак кожи (например, меланому (например, метастатическую меланому)), саркому мягких тканей, солидную опухоль, плоскоклеточную карциному, синовиальную саркому, рак яичка, рак щитовидной железы, переходно-клеточный рак (рак из уротелиальных клеток), увеальную меланому (например, метастатическую), веррукозную карциному, рак вульвы и макроглобулинемию Вальденстрема.

Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой саркому или карциному человека, например, фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, хордому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточную карциному, базально-клеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечноклеточный рак (например, метастатический), гепатому, карциному желчного протока, хориокарциному, семиному, эмбриональную карциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, карциному легкого, мелкоклеточную карциному легкого, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, мультиформную глиобластома, астроцитому, медуллобластома, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластома, акустическую неврину, олигодендроглиому, менингиому, меланому, нейробластома или ретинобластома.

Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой ангиосаркому.

Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой острый лимфоцитарный лейкоз или острый миелоцитарный лейкоз (например, миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз); хронический лейкоз (хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз); болезнь Ходжкина; неходжкинскую болезнь; острый миелоидный лейкоз; В-клеточную лимфому; Т-клеточную лимфому; анапластическую крупноклеточную лимфому; интраклеточную лимфому; фолликулярную лимфому; лимфому тонкого кишечника; или лимфому маргинальной зоны селезенки.

Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, стромальные опухоли ЖКТ, рак головы и/или шеи (например, плоскоклеточную карциному гортаноглотки, плоскоклеточную карциному гортани, клеточную карцино-

му ротоглотки, или веррукозную карциному гортани), эндометриальную стромальную саркому, тучноклеточную саркому, саркому мягких тканей взрослого возраста, саркому матки, карциному из клеток Меркеля, уротелиальную карциному, меланому с метастазами в головной мозг, увеальную меланому, увеальную меланому с метастазами в печень, немелкоклеточный рак легкого, рак прямой кишки или миелодиспластический синдром. Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии с указанными способами, является метастатическим.

Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой рак предстательной железы, рак молочной железы, рак легкого, рак ободочной и прямой кишки, меланому, рак бронхов, рак мочевого пузыря, рак головного мозга или центральной нервной системы, рак периферической нервной системы, рак матки или эндометрия, рак ротовой полости или глотки, неходжкинскую лимфому, рак щитовидной железы, рак почки, рак желчных протоков, рак тонкой кишки или аппендикса, рак слюнной железы, рак щитовидной железы, рак надпочечников, плоскоклеточный рак, мезотелиому, остеосаркому, тимому/карциному вилочковой железы, глиобластому, миелодиспластический синдром, саркому мягких тканей, диффузную опухоль стволовых клеток мозга DIPG, аденокарциному, остеосаркому, хондросаркому, лейкоз или рак поджелудочной железы. Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, включает карциному (например, аденокарциному), лимфому, бластому, меланому, саркому или лейкоз.

Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак желудочно-кишечного тракта, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рак поджелудочной железы, глиобластому, глиому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени (например, карциному печени и гепатому), рак мочевого пузыря, рак молочной железы, воспалительный рак молочной железы, карциному из клеток Меркеля, рак толстой кишки, рак ободочной и прямой кишки, рак желудка, рак мочевого пузыря, карциному эндометрия, миелому (например, множественную миелому), слюнную железу, карциному, рак почки (например, почечноклеточный рак и опухоли Вильмса), базально-клеточную карциному, меланому, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, рак яичка, рак пищевода, серозную аденокарциному или различные типы рака головы и шеи. Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, включает десмопластическую меланому, воспалительный рак молочной железы, тимому, рак прямой кишки, рак анального канала; или поддающуюся хирургическому лечению или не поддающуюся хирургическому лечению глиому ствола мозга. Согласно конкретному варианту реализации указанный рак представляет собой солидную опухоль. Согласно другому конкретному варианту реализации указанный рак представляет собой мультиформную глиобластому. Согласно некоторым вариантам реализации указанная мультиформная глиобластома является рецидивирующей. Согласно некоторым вариантам реализации указанная мультиформная глиобластома впервые диагностирована. Согласно некоторым вариантам реализации указанная мультиформная глиобластома наблюдается у субъекта с метилированными промоторами MGMT. Согласно некоторым вариантам реализации указанная мультиформная глиобластома рефрактерна к терапии бевацизумабом. Согласно некоторым вариантам реализации указанная мультиформная глиобластома наблюдается у субъекта, который не получал терапию бевацизумабом.

Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой метастатическую меланому (например, резистентную метастатическую меланому), метастатический рак яичников или метастатический почечноклеточный рак. Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой меланому, резистентную к ипилимумабу. Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой меланому, резистентную к ниволумабу или пембролизумабу. Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой меланому, резистентную к ипилимумабу и ниволумабу или пембролизумабу.

Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой рак молочной железы (например, герцептин-резистентный рак молочной железы и трастузумаб-DM1-резистентный (T-DM1-резистентный) рак молочной железы), рак предстательной железы, мультиформную глиобластому, рак ободочной и прямой кишки, саркома, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, ВПЧ-ассоциированный рак, рак влагалища, рак вульвы, рак полового члена, рак ануса, рак прямой кишки, рак ротоглотки, множественную миелому, почечноклеточный рак, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак, рак эндометрия, рак поджелудочной железы, лимфому и лейкоз (например, поздний лейкоз, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и поздний ОМЛ).

Согласно некоторым вариантам реализации рак, который лечат в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой метастатическую злокачественную меланому (на-

пример, кожную или интраокулярную злокачественную меланому), раковое заболевание почек (например, светлоклеточную карциному), рак предстательной железы (например, гормонально-рефрактерную аденокарциному предстательной железы), рак молочной железы, рак толстой кишки, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого), рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, рак матки, рак яичников, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак яичка, рак матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркома мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, хронические или острые лейкозы, в том числе острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, солидные опухоли детского возраста, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почек или мочеточника, карциному почечной лоханки, новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоль позвоночника, глиому ствола мозга, глиому, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, рак, индуцированный факторами окружающей среды, в том числе индуцированный асбестом, рак пищевода, рак печени, рефрактерные или рецидивирующие злокачественные образования, метастатический рак, рак, экспрессирующий PD-L1, и комбинации указанных видов рака.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект ранее получал иммунотерапию. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект ранее не получал какую-либо иммунотерапию. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой распространенный или метастатический рак.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ предотвращения или лечения инфекционного заболевания у субъекта, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества антитела против CTLA-4 или содержащей его фармацевтической композиции, согласно описанию в настоящем документе. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены способы предотвращения и/или лечения инфекции (например, вирусной инфекции, бактериальной инфекции, грибной инфекции, протозойной инфекции или паразитарной инфекции). Инфекция, предотвращение и/или лечение которой проводят в соответствии с указанными способами, может быть вызвана инфекционным агентом, идентифицированным в настоящем документе. Согласно конкретному варианту реализации антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, или содержащая его композиция представляет собой единственный активный агент, который вводят субъекту. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, или содержащую его композицию применяют в комбинации с противовоспалительным вмешательством (например, противовирусными, антибактериальными, антимикотическими или антигельминтными средствами) для лечения инфекционных заболеваний.

Инфекционные заболевания, для лечения и/или предотвращения которых могут применяться антитела против CTLA-4 или фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, вызывают инфекционные агенты, в том числе, не ограничиваясь перечисленными, бактерии, паразиты, грибы, простейшие и вирусы. Согласно конкретному варианту реализации инфекционное заболевание, для лечения и/или предотвращения которого применяют антитела против CTLA-4 или фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, вызывает вирус. Вирусные заболевания или вирусные инфекции, предотвращение и/или лечение которых может осуществляться в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленными, вызываемые вирусом гепатита типа А, гепатита типа В, гепатита типа С, гриппа (например, гриппа А или гриппа В), вирусом ветряной оспы, аденовирусом, вирусом простого герпеса типа I (HSV-I), вирусом простого герпеса типа II (HSV-II), вирусом чумы рогатого скота, риновирусом, эховирусом, ротавирусом, респираторно-синцитиальным вирусом, папилломавирусом, паповавирусом, цитомегаловирусом, эхиновирусом, арбовирусом, хантавирусом, вирусом Коксаки, вирусом эпидемического паротита, вирусом кори, вирусом краснухи, полиовирусом, вирусом натуральной оспы, вирусом Эпштейна-Барр, вирусом иммунодефицита человека тип I (HIV-I), вирусом иммунодефицита человека II типа (HIV-II) и агентами вирусных заболеваний, таких как вирусный менингит, энцефалит, лихорадка денге или натуральная оспа.

Бактериальные инфекции, предотвращение и/или лечение которых может быть осуществлено, включают инфекции, вызываемые *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* и *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериальные заболевания, вызываемые бактериями (например, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* и *Pseudomonas aeruginosa*), предотвращение и/или лечение которых может быть осуществлено в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленными, вызываемые *Mycobacteria rickettsia*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* (болезнь Лайма), *Bacillus anthracis* (сибирская язва), столбняк; вызываемые стрептококком, стафилококком, микобактериями; коклюш, холеру, чуму, дифтерию, хламидиоз; вызываемые *S. aureus* и легионеллой.

Протозойные заболевания или протозойные инфекции, вызываемые простейшими, предотвращение и/или лечение которых может быть осуществлено в соответствии со способами, описанными в настоя-

шем документе, включают, не ограничиваясь перечисленными, лейшманиоз, кокцидиоз, трипаносомоз, шистосомоз или малярию. Паразитарные заболевания или паразитарные инфекции, вызываемые паразитами, предотвращение и/или лечение которых может быть осуществлено в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленными, вызываемые хламидиями и риккетсиями.

Грибные заболевания или грибные инфекции, предотвращение и/или лечение которых может быть осуществлено в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленными, вызываемые *Candida* инфекции, зигомикоз, вызываемый *Candida* мастит, прогрессирующий диссеминированный трихоспороноз с латентной трихоспорономией, диссеминированный кандидоз, легочный паракокцидиоидомикоз, легочный аспергиллез, вызываемая *Pneumocystis carinii* пневмония, криптококковый менингит, кокцидиоидный менингоэнцефалит и цереброспинальный васкулит, инфекцию *Aspergillus niger*, *Fusarium keratitis*, микозы околоносовых пазух, вызываемый *Aspergillus fumigatus* эндокардит, дисхондроплазию большеберцовой кости, вызываемый *Candida glabrata* вагинит, орофарингеальный кандидоз, хроническую гранулематозную болезнь с X-сцепленным типом наследования, дерматофитию стоп, кожный кандидоз, микотический плацентит, диссеминированный трихоспороноз, аллергический бронхолегочный аспергиллез, микозный кератит, инфекцию *Cryptococcus neoformans*, микотический перитонит, инфекцию *Curvularia geniculata*, стафилококковый эндофтальмит, споротрихоз и дерматофитию.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное инфекционное заболевание является острым. Согласно некоторым вариантам реализации указанный инфекционное заболевание является хроническим. Согласно некоторым вариантам реализации указанное инфекционное заболевание вызывает флавивирус, например, вирус лихорадки Западного Нила, вирус энцефалита Сент-Луис, вирус Повассан, вирус клещевого энцефалита, вирус лихорадки денге, вирус Зика, вирус болезни Кьясанурского леса, вирус желтой лихорадки и вирус чикунгунья. Согласно некоторым вариантам реализации указанное инфекционное заболевание вызывает вирус Эбола. Согласно некоторым вариантам реализации инфекционное заболевание вызывает вирус гриппа. Согласно некоторым вариантам реализации указанное инфекционное заболевание вызывает вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус гепатита В (HBV) или вирус гепатита С (HCV). Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против CTLA-4 или содержащая его фармацевтическая композиция согласно описанию в настоящем документе способствует вирусному контролю. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против CTLA-4 или содержащая его фармацевтическая композиция согласно описанию в настоящем документе элиминирует вирусные резервуары.

Настоящее изобретение относится, согласно одному аспекту, к антителу против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, содержащей антитело против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, для применения в качестве медикамента.

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

Настоящее изобретение относится, согласно одному аспекту, к антителу против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, содержащей антитело против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, для применения в способе лечения рака.

Настоящее изобретение относится, согласно одному аспекту, к антителу против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, содержащей антитело против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, для применения в способе ингибирования толерантности иммунной системы к опухолям и/или для иммунотерапии у субъектов, страдающих раком.

Настоящее изобретение относится, согласно одному аспекту, к антителу против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, содержащей антитело против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, для применения в способе лечения инфекционного заболевания.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе вводят в качестве монотерапии.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы дополнительно включают введение дополнительного терапевтического агента указанному субъекту. Согласно некоторым вариантам реали-

зации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтическое средство или нацеленный на контрольные точки агент. Согласно некоторым вариантам реализации указанный нацеленный на контрольные точки агент выбран из группы, состоящей из антитела-антагониста против PD-1, антитела-антагониста против PD-L1, антитела-антагониста против PD-L2, антитела-антагониста против CTLA-4, антитела-антагониста против TIM-3, антитела-антагониста против LAG-3, антитела-антагониста против CEACAM1, антитела-агониста против GITR, антитела-агониста против OX40, антитела-агониста против CD137, антитела-агониста против DR3, антитела-агониста против TNFSF14 и антитела-агониста против CD27. Согласно некоторым вариантам реализации указанный нацеленный на контрольные точки агент представляет собой антитело-антагонист против PD-1. Согласно некоторым вариантам реализации указанный нацеленный на контрольные точки агент представляет собой антитело-антагонист против PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации указанный нацеленный на контрольные точки агент представляет собой антитело-антагонист против LAG-3. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой агонист представителя семейства рецепторов факторов некроза опухоли или представителя семейства факторов некроза опухоли.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение относится к (а) антителу против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, содержащей антитело против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество; и (b) дополнительному терапевтическому агенту для применения в качестве медикамента. Согласно предпочтительному варианту реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтическое средство или нацеленный на контрольные точки агент.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение относится к (а) антителу против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, содержащей антитело против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество; и (b) дополнительному терапевтическому агенту, для применения в способе лечения рака.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение относится к (а) антителу против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, содержащей антитело против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество; и (b) дополнительному терапевтическому агенту, для применения в способе лечения инфекционного заболевания.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, вводят субъекту в комбинации с соединением, нацеливающим иммуномодулирующий фермент или ферменты, такие как ИДО (индоламин-(2,3)-диоксигеназа) и/или ТДО (триптофан 2,3-диоксигеназа). Согласно некоторым вариантам реализации такое соединение выбрано из группы, состоящей из эпикадостата (Incyte Corp; см., например, WO 2010/005958, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки), F001287 (Flexus Biosciences), индоксимода (NewLink Genetics) и NLG919 (NewLink Genetics). Согласно одному варианту реализации указанное соединение представляет собой эпикадостат. Согласно другому варианту реализации указанное соединение представляет собой F001287. Согласно другому варианту реализации указанное соединение представляет собой индоксимод. Согласно другому варианту реализации указанное соединение представляет собой NLG919.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение относится к (а) антителу против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, содержащей антитело против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество; и (b) соединению, нацеливающему иммуномодулирующий фермент, для применения в качестве медикамента. Согласно предпочтительному варианту реализации указанное соединение нацеливает ИДО и/или ТДО.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение относится к (а) антителу против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, содержащей антитело против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество; и (b) соединению, нацеливающему иммуномодулирующий фермент, для применения в способе лечения рака. Согласно предпочтительному варианту реализации указанное соединение нацеливает ИДО и/или ТДО.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, вводят субъекту в комбинации с вакциной. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вакцина представляет собой противоопухолевую вакцину на основе белка теплового шока или вакцину против патогена на основе белка теплового шока. Согласно конкретному варианту реализации антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, вводят субъекту в комбинации с противоопухолевой вакциной на основе белка теплового шока. Белки теплового шока (HSP) представляют собой семейство высококонсервативных белков, широко распространенных у разных видов. Значительно более высокие уровни их экспрессии могут быть выражено индуцированы в результате теплового шока или

других форм стресса, в том числе воздействия токсинов, окислительного стресса или глюкозной депривации. В соответствии с молекулярной массой было классифицировано пять семейств: HSP-110, -90, -70, -60 и -28. HSP доставляет иммуногенные пептиды через путь перекрестной презентации в антигенпрезентирующих клетках (АПК), таких как макрофаги и дендритные клетки (ДК), что приводит к активации Т-клеток. HSP функционируют в качестве шаперонов-носителей опухолеассоциированных антигенных пептидов, образуя комплексы, способные индуцировать опухолеспецифический иммунитет. При высвобождении из умирающих опухолевых клеток комплексы HSP-антиген поглощают антигенпрезентирующие клетки (АПК), при этом указанные антигены преобразуются в пептиды, которые связывают молекулы МНС класса I и класса II, что приводит к активации противоопухолевых CD8+ и CD4+ Т-клеток. Иммунитет, вызванный комплексами HSP, происходящими из опухолевых составов, направлен специфическим образом на уникальный репертуар антигенных пептидов, экспрессируемых раком у каждого из субъектов.

Комплекс белка теплового шока с пептидом (HSPPC) представляет собой белково-пептидный комплекс, состоящий из белка теплового шока, нековалентно связанного в комплекс с антигенными пептидами. HSPPC вызывают как врожденный, так и адаптивный иммунный ответ. Согласно конкретному варианту реализации указанный антигенный пептид или указанные антигенные пептиды проявляют антигенность в отношении рака, лечение которого проводится. АПК эффективно захватывают HSPPC посредством мембранных рецепторов (в основном CD91) или посредством связывания с Toll-подобными рецепторами.

Интернализация HSPPC приводит к функциональному созреванию АПК с продуцированием хемокинов и цитокинов, что приводит к активации естественных клеток-киллеров (NK), моноцитов, а также опосредованному Th1 и Th-2 иммунному ответу. Согласно некоторым вариантам реализации HSPPC, применяемые в способах, описанных в настоящем документе, содержат один или более белков теплового шока из семейства стресс-белков hsp60, hsp70 или hsp90 в комплексе с антигенными пептидами. Согласно некоторым вариантам реализации HSPPC содержат hsc70, hsp70, hsp90, hsp110, grp170, grp96, кальрекуллин или комбинации из двух или более перечисленных белков.

Согласно конкретному варианту реализации антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, вводят субъекту в комбинации с комплексом белка теплового шока с пептидом (HSPPC), например, комплексом белка теплового шока с пептидом-96 (HSPPC-96), для лечения рака. HSPPC-96 содержит белок теплового шока (Hsp) размером 96 кДа, grp96, в комплексе с антигенными пептидами. HSPPC-96 представляет собой средство для иммунотерапии рака, полученное из опухоли субъекта, и содержит антигенный "отпечаток" указанного рака. Согласно некоторым вариантам реализации указанный отпечаток содержит уникальные антигены, которые присутствуют только в специфических раковых клетках указанного конкретного субъекта, и инъекция вакцины предназначена для стимуляции иммунной системы субъекта к распознаванию и атаке на любые клетки, несущие отпечаток специфического рака.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный HSPPC, например, HSPPC-96, получают из опухолевой ткани субъекта. Согласно конкретному варианту реализации указанный HSPPC (например, HSPPC-96) получают из опухоли того типа рака или его метастазов, лечение которого проводят. Согласно другому конкретному варианту реализации указанный HSPPC (например, HSPPC-96) аутологичен для субъекта, лечение которого проводят. Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухолевая ткань является не-некротической опухолевой тканью. Согласно некоторым вариантам реализации для получения вакцины для режима лечения используют по меньшей мере 1 грамм (например, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 граммов) не-некротической опухолевой ткани. Согласно некоторым вариантам реализации после хирургической резекции не-некротическую опухолевую ткань замораживают до применения при приготовлении вакцины. Согласно некоторым вариантам реализации указанный HSPPC, например, HSPPC-96, выделяют из опухолевой ткани с применением методик очищения, фильтруют и подготавливают для инъекции вакцины. Согласно некоторым вариантам реализации субъекту вводят 6-12 доз указанного HSPPC, например, HSPPC-96. Согласно таким вариантам реализации дозы указанного HSPPC, например, HSPPC-96, могут вводиться еженедельно для первых 4 доз, а затем один раз в две недели для 2-8 дополнительных доз.

Дополнительные примеры HSPPC, которые могут применяться в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, описаны в следующих патентах и патентных заявках, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылок: патенты США № 6391306, № 6383492, № 6403095, № 6410026, № 6436404, № 6447780, № 6447781 и № 6610659, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение относится к (а) антителу против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, содержащей антитело против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество; и (b) вакцине,

для применения в качестве медикамента. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная вакцина представляет собой противоопухолевую вакцину на основе белка теплового шока или вакцину против патогена на основе белка теплового шока. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная вакцина представляет собой противовирусную вакцину на основе белка теплового шока.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение относится к (а) антителу против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, содержащей антитело против CTLA-4 согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество; и (b) вакцине, для применения в способе лечения рака. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная вакцина представляет собой противоопухолевую вакцину на основе белка теплового шока.

Указанное антитело против CTLA-4 и дополнительный терапевтический агент (например, химиотерапевтическое средство, нацеленный на контрольные точки агент, ингибитор ИДО и/или вакцина) могут быть введены по отдельности, последовательно или одновременно в виде отдельных лекарственных форм. Согласно одному варианту реализации антитело против CTLA-4 вводят парентерально, а ингибитор ИДО вводят перорально.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, вводят субъекту внутрь опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, вводят субъекту внутрь опухоли в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент вводят системно. Согласно некоторым вариантам реализации у указанного субъекта имеются солидные опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект страдает плоскоклеточной карциномой головы и шеи (HNSCC). Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект страдает HER2⁺ раком молочной железы. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент, который вводят системно, представляет собой антитело против PD-1 (например, пембролизумаб или ниволумаб). Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент, который вводят системно, представляет собой антитело против рЭФР (например, цетуксимаб). Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент, который вводят системно, представляет собой антитело против HER2 (например, трастузумаб). Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент, который вводят системно, представляет собой химиотерапевтический агент (например, гемцитабин). Согласно некоторым вариантам реализации у указанного субъекта имеются солидные опухоли, а дополнительный терапевтический агент, который вводят системно, представляет собой антитело против PD-1 (например, пембролизумаб или ниволумаб). Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-1 представляет собой пембролизумаб, который вводят в количестве 200 мг каждые три недели. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект страдает плоскоклеточной карциномой головы и шеи (HNSCC), а дополнительный терапевтический агент, который вводят системно, представляет собой антитело против рЭФР (например, цетуксимаб). Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект страдает HER2⁺ раком молочной железы, а дополнительный терапевтический агент, который вводят системно, представляет собой антитело против HER2 (например, трастузумаб). Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект дополнительно получал химиотерапевтический агент (например, гемцитабин). Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к антителу против CTLA-4 и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению и, необязательно, дополнительному терапевтическому агенту, для применения в способе лечения рака, причем указанное антитело против CTLA-4 и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят внутрь опухоли указанному субъекту. Согласно одному предпочтительному варианту реализации дополнительный терапевтический агент вводят указанному субъекту, более предпочтительно, дополнительный терапевтический агент вводят указанному субъекту системно.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело против PD-1 применяют в способах, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-1 представляет собой ниволумаб, также известный как BMS-936558 или MDX1106, разработанный Bristol-Myers Squibb. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-1 представляет собой пембролизумаб, также известный как ламбролизумаб или MK-3475, разработанный Merck & Co. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-1 представляет собой пидолизумаб, также известный как CT-011, разработанный CureTech. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-1 представляет собой MEDI0680, также известный как AMP-514, разработанный Medimmune. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-1 представляет собой PDR001, разработанный Novartis Pharmaceuticals. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-1 представляет собой REGN2810, разработанный Regeneron Pharmaceuticals. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-1 представляет собой PF-06801591, разработанный Pfizer. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-1 представляет собой BGB-A317, разработанный BeiGene. Согласно некоторым ва-

риантам реализации указанное антитело против PD-1 представляет собой TSR-042, разработанный AnaplysBio и Tesaro. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-1 представляет собой SHR-1210, разработанный Hengrui.

Дополнительные неограничивающие примеры антител против PD-1, которые могут применяться в способах лечения, описанных в настоящем документе, описаны в следующих патентах и патентных заявках, которые включены в настоящий документ полностью посредством ссылок для любых целей: патент США № 6808710; патент США № 7332582; патент США № 7488802; патент США № 8008449; патент США № 8114845; патент США № 8168757; патент США № 8354509; патент США № 8686119; патент США № 8735553; патент США № 8747847; патент США № 8779105; патент США № 8927697; патент США № 8993731; патент США № 9102727; патент США № 9205148; публикация США US 2013/0202623 A1; публикация США US 2013/0291136 A1; публикация США US 2014/0044738 A1; публикация США US 2014/0356363 A1; публикация США US 2016/0075783 A1; и PCT-публикация WO 2013/033091 A1; PCT-публикация WO 2015/036394 A1; PCT-публикация WO 2014/179664 A2; PCT-публикация WO 2014/209804 A1; PCT-публикация WO 2014/206107 A1; PCT-публикация WO 2015/058573 A1; PCT-публикация WO 2015/085847 A1; PCT-публикация WO 2015/200119 A1; PCT-публикация WO 2016/015685 A1; и PCT-публикация WO 2016/020856 A1.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело против PD-L1 применяют в способах, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-L1 представляет собой атезолизумаб, разработанный Genentech. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-L1 представляет собой дурвалумаб, разработанный AstraZeneca, Celgene и Medimmune. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-L1 представляет собой авелумаб, также известный как MSB0010718C, разработанный Merck Serono и Pfizer. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-L1 представляет собой MDX-1105, разработанный Bristol-Myers Squibb. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-L1 представляет собой AMP-224, разработанный Amplimmune и GSK.

Неограничивающие примеры антител против PD-L1, которые могут применяться в способах лечения, описанных в настоящем документе описаны в следующих патентах и патентных заявках, которые включены в настоящий документ полностью посредством ссылок для любых целей: патент США № 7943743; патент США № 8168179; патент США № 8217149; патент США № 8552154; патент США № 8779108; патент США № 8981063; патент США № 9175082; публикация США US 2010/0203056 A1; публикация США US 2003/0232323 A1; публикация США US 2013/0323249 A1; публикация США US 2014/0341917 A1; публикация США US 2014/0044738 A1; публикация США US 2015/0203580 A1; публикация США US 2015/0225483 A1; публикация США US 2015/0346208 A1; публикация США US 2015/0355184 A1; и PCT-публикация WO 2014/100079 A1; PCT-публикация WO 2014/022758 A1; PCT-публикация WO 2014/055897 A2; PCT-публикация WO 2015/061668 A1; PCT-публикация WO 2015/109124 A1; PCT-публикация WO 2015/195163 A1; PCT-публикация WO 2016/000619 A1; и PCT-публикация WO 2016/030350 A1.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело против LAG-3 применяют в способах, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против LAG-3 представляет собой BMS-986016, разработанный Bristol-Myers Squibb. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против LAG-3 представляет собой LAG525, разработанный Novartis. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против LAG-3 представляет собой GSK2831781, разработанный GSK.

Неограничивающие примеры антител против LAG-3, которые могут применяться в способах лечения, описанных в настоящем документе, описаны в следующих патентах и патентных заявках, которые включены в настоящий документ полностью посредством ссылок для любых целей: патент США № 9244059; публикация США US 2011/0150892 A1; публикация США US 2014/0093511 A1; публикация США US 2014/0286935 A1; публикация США US 2015/0259420 A1; и PCT-публикация WO 2015/042246 A1; PCT-публикация WO 2015/116539 A1; PCT-публикация WO 2015/200119 A1; и PCT-публикация WO 2016/028672 A1.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело против рЭФР применяют в способах, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против рЭФР представляет собой цетуксимаб, разработанный Bristol-Myers Squibb и ImClone, панитумумаб, разработанный Abgenix и Amgen, нимотузумаб, разработанный CMI Cuba и YM BioSciences, нецитумумаб, разработанный ImClone, залутумумаб, разработанный Genmab, матузумаб, разработанный Takeda, Sym004, разработанный Merck Serono и Symphogen, имгатузумаб, разработанный Glycart и Roche, дулиготумаб, разработанный Genentech и Roche, депатуксизумаб, разработанный Abbott, депатуксизумаб мафодотин, разработанный Abbvie, MM-151, разработанный Adimab и Merrimack, GC1118, разработанный Green Cross, AMG 595, разработанный Amgen и ImmunoGen, CetuGEX, разработанный Glycotore, лапри-туксимаб эмтанзин, разработанный ImmunoGen, JNJ-61186372, разработанный Genmab и Janssen Biotech, SCT200, разработанный Sinocelltech, LY3164530, разработанный Lilly, HLX07, разработанный Shanghai Henlius; или SYN004, разработанный Synermore.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело против HER2 применяют в способах, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против HER2 представляет собой трастузумаб, разработанный Genentech и Roche, трастузумаб эмтанзин, разработанный Genentech и Roche, пертузумаб, разработанный Genentech, эртумаксумаб, разработанный Fresenius, маргетуксимаб, разработанный MacroGenics, MM-111, разработанный Merrimack, CT-P06, разработанный Celltrion, PF-05280014, разработанный Pfizer, MM-302, разработанный Merrimack, SB3, разработанный Merck & Co, CMAB302, разработанный Shanghai CP Guojian, TrasGEX, разработанный Glycotope, ARX788, разработанный Ambrx и Zhejiang Medicine, SYD985, разработанный Synthron, FS102, разработанный Bristol-Myers Squibb и F-star, BCD-022, разработанный Biocad, ABP 980, разработанный Amgen, DS-8201a, разработанный Daiichi Sankyo, HLX02, разработанный Shanghai Henlius; или CANMAb, разработанный Biocron и Mylan.

Антитело или фармацевтическая композиция, описанные в настоящем документе, могут быть доставлены субъекту различными маршрутами. Указанные маршруты включают, не ограничиваясь перечисленными, парентеральный, интраназальный, интритрахеальный, пероральный, внутрикожный, местный, внутримышечный, внутривенный, внутримышечный, внутривенный, внутривенный, конъюнктивальный и подкожный. Может также быть использовано легочное введение, например, с применением ингалятора или небулайзера, и введение в состав с аэрозольным агентом для применения в качестве спрея. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или указанную фармацевтическую композицию, описанные в настоящем документе, доставляют подкожно или внутривенно. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или указанную фармацевтическую композицию, описанные в настоящем документе, доставляют внутрь опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе доставляют в дренирующей опухоли лимфатический узел. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или указанную фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе доставляют посредством локализованного введения (например, подкожного введения). Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе доставляют системно. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе доставляют локально.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к антителу против CTLA-4 и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, и, необязательно, дополнительному терапевтическому агенту, для применения в способе лечения рака, отличающемся тем, что указанное антитело против CTLA-4 и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению доставляют внутрь опухоли указанному субъекту, доставляют в дренирующей опухоли лимфатический узел субъекта, или доставляют посредством локализованного введения (например, подкожного введения) субъекту.

Количество антитела или композиции, которое будет эффективным для лечения и/или предотвращения состояния, зависит от природы заболевания, и может быть определено с применением стандартных клинических методик.

Точная доза для использования в композиции также зависит от маршрута введения и тяжести инфекции или вызываемого ей заболевания, и должна определяться в соответствии с оценкой практикующего врача и обстоятельствами, связанными с каждым субъектом. Например, эффективные дозы могут также варьировать в зависимости от способа введения, целевого сайта, физиологического состояния пациента (в том числе возраста, массы тела и состояния здоровья), от того, представляет ли пациент собой человека или животное, других вводимых медикаментов или того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно пациент представляет собой человека, однако не являющиеся человеком млекопитающие, в том числе трансгенные млекопитающие, могут также получать лечение. Дозировки для лечения оптимальным образом титруют для оптимизации безопасности и эффективности.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе вводят субъекту (например, путем внутривенной инъекции) в дозе 0,01 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, 6 мг/кг, 10 мг/кг, приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг или приблизительно 10 мг/кг. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе вводят субъекту (например, путем внутривенной инъекции) каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели, каждые четыре недели, каждые шесть недель, каждые восемь недель, каждые 12 недель, каждый месяц, каждые два месяца, каждые три месяца, каждые четыре месяца, каждые пять месяцев, каждые шесть месяцев, каждые восемь месяцев и каждый год, например, в дозах, описанных выше. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе вводят субъекту (например, путем внутривенной инъекции) каждые три недели в дозах, описанных выше.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к антителу против CTLA-4 и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, и, необязательно, дополнительному те-

опухолевой инъекции в дозе 0,1 мг/кг или приблизительно 0,1 мг/кг каждые три недели. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе вводят субъекту путем внутриопухолевой инъекции в дозе 0,3 мг/кг или приблизительно 0,3 мг/кг каждые три недели. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе вводят субъекту путем внутриопухолевой инъекции в дозе 1 мг/кг или приблизительно 1 мг/кг каждые три недели. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе вводят субъекту путем внутриопухолевой инъекции в дозе 3 мг/кг или приблизительно 3 мг/кг каждые три недели.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе вводят субъекту посредством локализованного введения (например, подкожного введения) в дозе 0,01 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,03 мг/кг, приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг или приблизительно 3 мг/кг. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CTLA-4 или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе вводят субъекту посредством локализованного введения (например, подкожного введения) каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели, каждые четыре недели, каждые шесть недель, каждые восемь недель, каждые 12 недель, каждый месяц, каждые два месяца, каждые три месяца, каждые четыре месяца, каждые пять месяцев, каждые шесть месяцев, каждые восемь месяцев и каждый год, например, в дозах, описанных выше.

Согласно некоторым вариантам реализации указанную терапевтическую комбинацию вводят субъекту на протяжении по меньшей мере 3, 6, 9, 12, 18 или 24 месяцев. Согласно некоторым вариантам реализации указанную терапевтическую комбинацию вводят субъекту на протяжении периода до 3, 6, 9, 12, 18 или 24 месяцев.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, страдающего ангиосаркомой, включающий введение указанному субъекту (например, внутривенно, внутрь опухоли или подкожно) эффективного количества антитела против CTLA-4 или фармацевтической композиции согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, страдающего ангиосаркомой, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту внутривенно антитела, которое специфически связывается с CTLA-4 человека, в дозе 0,01 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,03 мг/кг, приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг или приблизительно 3 мг/кг, необязательно еженедельно, каждые две или каждые три недели. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, страдающего ангиосаркомой, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту внутривенно антитела, которое специфически связывается с CTLA-4 человека, в дозе 0,1 мг/кг один раз каждые три недели. Согласно некоторым вариантам реализации указанного антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 9. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 23; и легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 27. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 24; и легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 27. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 25; и легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 27. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 26; и легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 27.

Антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, может также применяться для анализа уровней белка CTLA-4 в биологическом образце с применением классических иммуногистологических методов, известных специалистам в данной области техники, в том числе таких иммунологических анализов, как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммунопреципитация или вестерн-блоттинг. Подходящие метки для анализов с антителами известны в данной области техники и включают ферментные метки, такие как глюкозооксидаза; радиоизотопы, такие как йод (^{125}I , ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{121}In) и технеций (^{99}Tc); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, а также биотин. Такие метки могут применяться для мечения антитела, описанного в настоящем документе, или его антигенсвязывающего фрагмента. Как вариант, второе антитело, которое распознает антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, или его антигенсвязывающий фрагмент может быть помечен(о) и использован(о) в комбинации с антителом против CTLA-4 или его антигенсвязывающим фрагментом для детекции уровней белка CTLA-4. Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к применению анти-

тела против CTLA-4 согласно настоящему изобретению для анализа и/или детекции уровней белка CTLA-4 в биологическом образце *in vitro*.

Предусмотрено включение в анализ уровня экспрессии белка CTLA-4 качественного или количественного измерения, или расчета уровня белка CTLA-4 в первом биологическом образце, либо прямого (например, путем определения или расчета абсолютного уровня белка), либо сравнительного (например, путем сравнения с уровнем ассоциированного с заболеванием белка во втором биологическом образце). Уровень экспрессии полипептида CTLA-4 в первом биологическом образце может быть измерен или рассчитан, и сравнен со стандартным уровнем белка CTLA-4, определенным во втором биологическом образце, полученном от индивидуума, не страдающего указанным расстройством, или определенным на основании усреднения уровней в популяции индивидуумов, не страдающих указанным расстройством. Как будет понятно специалистам в данной области техники, после того, как стал известен "стандартный" уровень полипептида CTLA-4, он может быть использован многократно в качестве стандарта для сравнения.

В настоящем документе термин "биологический образец" относится к любому биологическому образцу, полученному от субъекта, из линии клеток, ткани или другого источника клеток, потенциально экспрессирующих CTLA-4. Способы получения биоптатов тканей и жидкостей организма животных (например, человека) хорошо известны в данной области техники. Биологические образцы включают периферический мононуклеарные клетки крови.

Антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, или его антигенсвязывающий фрагмент может применяться для прогнозирования, диагностики, мониторинга и скрининга, в том числе для вариантов применения *in vitro* и *in vivo*, хорошо известных и стандартных для специалиста, и основанных на настоящем описании. Прогностические, диагностические, мониторинговые и скрининговые анализы и наборы для оценки и определения *in vitro* статуса иммунной системы и/или иммунного ответа могут быть использованы для прогнозирования, диагностики и мониторинга при оценке образцов от пациента, в том числе от пациентов, по имеющимся данным или предположительно страдающим дисфункцией иммунной системы, или применительно к ожидаемому или требуемому ответу иммунной системы, ответу на антиген или ответу на вакцину. Оценка и определение статуса иммунной системы и/или иммунного ответа также полезны при определении пригодности пациента для участия в клиническом испытании лекарственного средства или для введения конкретного химиотерапевтического агента, либо антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в том числе их комбинаций, в сравнении с другим агентом, либо другим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Уже практикуется указанный тип прогностического и диагностического мониторинга и оценки, задействующий антитела против белка HER2 при раке молочной железы (Herceptest™, Dako), при этом указанный анализ используют также для определения пациентов для терапии антителами с применением Герцептина®. Варианты применения *in vivo* включают направленную клеточную терапию и модуляцию иммунной системы, а также радиовизуализацию иммунного ответа.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к антителу против CTLA-4 и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения в качестве диагностического средства.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к антителу против CTLA-4 и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения в способе прогнозирования, диагностики и/или мониторинга дисфункции иммунной системы и/или рака.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к применению антитела против CTLA-4, предложенного согласно настоящему изобретению, для прогнозирования, диагностики и/или мониторинга дисфункции иммунной системы и/или рака у субъекта путем анализа и/или детекции уровней белка CTLA-4 в биологическом образце от указанного субъекта *in vitro*.

Согласно одному варианту реализации антитело против CTLA-4 или его антигенсвязывающий фрагмент может применяться при иммуногистохимическом исследовании биопсийных образцов. Согласно другому варианту реализации антитело против CTLA-4 или его антигенсвязывающий фрагмент могут применяться для детекции уровней CTLA-4 или уровней клеток, которые содержат CTLA-4 на поверхности мембран; причем указанные уровни могут затем быть связаны с определенными симптомами заболевания. Антитела против CTLA-4, описанные в настоящем документе, или их антигенсвязывающие фрагменты могут нести детектируемую или функциональную метку. При использовании флуоресцентных меток для идентификации и для количественного определения участников специфического связывания могут использоваться доступные в настоящее время микроскопические анализы и анализ методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS), или комбинация известных в данной области техники процедур из обоих методов. Антитела против CTLA-4, описанные в настоящем документе, или их антигенсвязывающие фрагменты могут нести флуоресцентную метку. Примеры флуоресцентных меток включают, например, реакционноспособные и конъюгированные зонды, например, аминокумарин, флуоресцеин и тexasский красный, красители Alexa Fluor, цианиновые красители и красители DyLight. Антитело против CTLA-4 или его антигенсвязывающий фрагмент может нести радиоак-

тивную метку, такую как изотопы ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{198}Au , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac и ^{186}Re . При использовании радиоактивных меток доступные в настоящее время процедуры подсчета, известные в данной области техники, могут использоваться для идентификации и количественного определения специфического связывания антитела против CTLA-4 или его антигенсвязывающего фрагмента с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека). В том случае, когда указанная метка представляет собой фермент, детекция может осуществляться с применением любых из используемых в настоящее время колориметрических, спектрофотометрических, флуороспектрофотометрических, амперометрических или газометрических методик, известных в данной области техники. Это может быть достигнуто путем приведения в контакт образца или контрольного образца с антителом против CTLA-4 или его антигенсвязывающим фрагментом в условиях, позволяющих обеспечить образование комплекса между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и CTLA-4. Любые комплексы, образующиеся между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и CTLA-4, детектируют и сравнивают в образце и в контроле. Учитывая специфическое связывание антител, описанных в настоящем документе, с CTLA-4, указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут применяться для детекции, в частности, экспрессии CTLA-4 на поверхности клеток. Указанные антитела, описанные в настоящем документе, или их антигенсвязывающие фрагменты, могут также применяться для очищения CTLA-4 иммуноаффинным способом. Также настоящим изобретением предусмотрена аналитическая система, которая может быть реализована в форме тестового набора для количественного анализа степени присутствия, например, CTLA-4 комплексов или CTLA-4/лиганда CTLA-4. Тестовая система или тестовый набор может содержать меченый компонент, например, меченое антитело, и один или более дополнительных иммунохимических реагентов.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к *in vitro* способу для анализа и/или детекции уровней белка CTLA-4 в биологическом образце, включающему (1) приведение образца и, необязательно, контрольного образца в контакт с антителом против CTLA-4 согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающим фрагментом в условиях, позволяющих обеспечить образование комплекса между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и CTLA-4; и (2) детекцию и сравнение комплексов, образующихся в образце и, необязательно, в контроле.

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

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены полинуклеотиды, содержащие последовательность нуклеотидов, кодирующую описанное в настоящем документе антитело или его фрагмент (например, вариабельную область легкой цепи и/или вариабельную область тяжелой цепи), которое(ый) специфически связывается с антигеном CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), а также векторы, например, векторы, содержащие такие полинуклеотиды для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (например, *E. coli* и клетках млекопитающих). Согласно настоящему изобретению предложены полинуклеотиды, содержащие последовательности нуклеотидов, кодирующие любые из антител, предложенных согласно настоящему изобретению, а также векторы, содержащие такие последовательности полинуклеотидов, например, экспрессионные векторы для их эффективной экспрессии в клетках-хозяевах, например, клетках млекопитающих.

В настоящем документе "выделенным" полинуклеотидом или "выделенной" молекулой нуклеиновой кислоты называется полинуклеотид или молекула нуклеиновой кислоты, отделенный(ая) от других молекул нуклеиновых кислот, которые присутствуют в естественном источнике (например, в организме мыши или человека) указанной молекулы нуклеиновой кислоты. Кроме того, "выделенная" молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула кДНК, может по существу не содержать другого клеточного материала или культуральной среды при получении с применением рекомбинантных методик, или по существу не содержит химических предшественников или других химических веществ, если она химически синтезирована. Например, выражение "по существу не содержащий" включает составы с полинуклеотидом или молекулой нуклеиновой кислоты, содержащие менее чем приблизительно 15%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% (в частности, менее чем приблизительно 10%) другого материала, например, клеточного материала, культуральной среды, других молекул нуклеиновых кислот, химических предшественников и/или других химических веществ. Согласно конкретному варианту реализации молекула или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующая(ие) антитело, описанное в настоящем документе, выделена или очищена.

Согласно конкретным аспектам настоящего изобретения предложены полинуклеотиды, содержащие последовательности нуклеотидов, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с полипептидом CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) и содержат последовательность аминокислот согласно описанию в настоящем документе, а также антитела, которые конкурируют с такими антителами за связывание с полипептидом CTLA-4 (например, дозозависимым образом) или связываются с тем же эпитопом, что и такие антитела.

Согласно определенным аспектам настоящего изобретения предложены полинуклеотиды, содержащие последовательности нуклеотидов, кодирующую легкую цепь или тяжелую цепь антитела, описанного в настоящем документе. Указанные полинуклеотиды могут содержать последовательности нуклеотидов, кодирующие легкую цепь, содержащую области FR и области CDR из VL антител, описанные в

настоящем документе (см., например, табл. 1).

Также согласно настоящему изобретению предложены полинуклеотиды, кодирующие антитело против CTLA-4, оптимизированные, например, путем оптимизации кодонов/РНК, замены сигнальных последовательностей на гетерологичные и элиминации элементов нестабильности мРНК. Способы получения оптимизированных для рекомбинантной экспрессии нуклеиновых кислот, кодирующих антитело против CTLA-4 или его фрагмент (например, легкую цепь, тяжелую цепь, домен VH или домен VL), путем введения изменений кодонов и/или элиминации ингибиторных областей в мРНК могут быть реализованы путем адаптации способов оптимизации, описанные, например, в патентах США № 5965726; № 6174666; № 6291664; № 6414132; и № 6794498, соответственно, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Например, потенциальные сайты сплайсинга и элементы нестабильности (например, богатые A/T или A/U элементы) в РНК могут быть мутированы без изменения аминокислот, кодируемых указанными последовательностями нуклеиновых кислот для повышения стабильности РНК для рекомбинантной экспрессии. При указанных изменениях используют вырожденность генетического кода, например, задействуют альтернативный кодон для идентичной аминокислоты. Согласно некоторым вариантам реализации может требоваться изменение одного или более кодонов для кодирования консервативной мутации, например, кодирования аналогичной аминокислоты с аналогичной химической структурой и свойствами, и/или функционирующей как оригинальная аминокислота. Такие способы могут повышать экспрессию антитела против CTLA-4 или его фрагмента по меньшей мере 1-кратно, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно, 5-кратно, 10-кратно, 20-кратно, 30-кратно, 40-кратно, 50-кратно, 60-кратно, 70-кратно, 80-кратно, 90-кратно или 100-кратно или более по сравнению с экспрессией антитела против CTLA-4, кодируемого полинуклеотидами, которые не были оптимизированы.

Согласно некоторым вариантам реализации оптимизированная последовательность полинуклеотидов, кодирующая антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, или его фрагмент (например, домен VL и/или домен VH), может гибридизоваться с антисмысловым (например, комплементарным) полинуклеотидом неоптимизированной последовательности полинуклеотидов, кодирующей антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, или его фрагмент (например, домен VL и/или домен VH). Согласно конкретным вариантам реализации оптимизированная последовательность нуклеотидов, кодирующая антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, или его фрагмент, гибридизуется в условиях очень высокой жесткости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной последовательности полинуклеотидов, кодирующей антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, или его фрагмент. Согласно конкретному варианту реализации оптимизированная последовательность нуклеотидов, кодирующая антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, или его фрагмент, гибридизуется в условиях гибридизации высокой, промежуточной или меньшей жесткости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной последовательности нуклеотидов, кодирующей антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, или его фрагмент. Информация относительно условий гибридизации была представлена, например, в опубликованной заявке на патент США US 2005/0048549 (например, параграфы 72-73), которая включена в настоящем документе посредством ссылки.

Указанные полинуклеотиды могут быть получены и последовательность нуклеотидов указанных полинуклеотидов определена любым способом, известным в данной области техники. Последовательности нуклеотидов, кодирующие антитела, описанные в настоящем документе, например, антитела, описанные в табл. 1, и модифицированные варианты указанных антител могут быть определены с применением способов, хорошо известных в данной области техники, т.е. происходит сборка нуклеотидных кодонов, которые, как известно, кодируют конкретные аминокислоты, таким образом, что образуется нуклеиновая кислота, которая кодирует указанное антитело. Такой полинуклеотид, кодирующий антитело, может быть собран из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, согласно описанию в источнике: Kutmeier G et al., (1994), *BioTechniques* 17: 242-6, полностью включенном посредством ссылки), что, вкратце, включает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей указанное антитело, аннелирование и лигирование указанных олигонуклеотидов с последующей амплификацией лигированных олигонуклеотидов посредством ПЦР.

Как вариант, полинуклеотид, кодирующий антитело, описанное в настоящем документе, может быть получено из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы) с применением способов, хорошо известных в данной области техники (например, ПЦР и других способов молекулярного клонирования).

Например, ПЦР-амплификация с применением синтетических праймеров, гибридизующихся с 3'- и 5'-концами известной последовательности, может быть выполнена с использованием геномной ДНК, полученной из гибридомных клеток, продуцирующих представляющее интерес антитело. Такие способы ПЦР-амплификации могут применяться для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела. Такие способы ПЦР-амплификации могут применяться для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую вариативную область легкой цепи и/или вариативную область тяжелой цепи антитела. Амплифицированные нуклеиновые кислоты могут быть клонированы в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и

дальнейшего клонирования, например, с получением химерных и гуманизированных антител.

Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретный антитело, недоступен, однако известна последовательность молекулы антитела, нуклеиновая кислота, кодирующая указанный иммуноглобулин, может быть химически синтезирована или получена из подходящего источника (например, библиотеки кДНК антител или библиотеки кДНК, полученной из любой ткани или клетки, или нуклеиновой кислоты, предпочтительно поли-А+ РНК, выделенной из любой ткани или клеток, экспрессирующих указанное антитело, таких как гибридомные клетки, отобранные по способности экспрессировать антитело, описанное в настоящем документе) путем ПЦР-амплификации с использованием синтетических праймеров, гибридизуемых с 3'- и 5'-концами последовательности, или путем клонирования с использованием олигонуклеотидного зонда, специфического для конкретной генной последовательности, для идентификации, например, клона кДНК из библиотеки кДНК, который кодирует указанное антитело. Амплифицированные нуклеиновые кислоты, полученные с помощью ПЦР, могут затем быть клонированы в реплицируемые клонирующие векторы с применением любого способа, хорошо известного в данной области техники.

ДНК, кодирующая антитела против CTLA-4, описанные в настоящем документе, может быть легко выделена и секвенирована с использованием стандартных процедур (например, с применением олигонуклеотидных зондов, которые способны к специфическому связыванию в генах, кодирующими тяжелые и легкие цепи указанного антитела против CTLA-4). Гибридомные клетки могут служить в качестве источника такой ДНК. После выделения указанная ДНК может быть помещена в экспрессионные векторы, которыми затем трансфицируют клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки обезьян COS, клетки яичника китайского хомячка (CHO) (например, клетки CHO экспрессионной системы CHO GS System™ (Lonza)), или клетки миеломы, которые у других обстоятельствах не продуцируют иммуноглобулиновый белок, для обеспечения синтеза антител против CTLA-4 в рекомбинантных клетках-хозяевах.

Для получения полных антител могут быть использованы ПЦР-праймеры, включающие последовательности нуклеотидов VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты сайта рестрикции, для амплификации последовательностей VH или VL в клонах scFv. С применением методик клонирования, известных специалистам в данной области техники, ПЦР-амплифицированные домены VH могут быть клонированы в векторы, экспрессирующие константную область тяжелой цепи, например, константную область гамма-4 человека, а ПЦР-амплифицированные домены VL могут быть клонированы в векторы, экспрессирующие константную область легкой цепи, например, константные области каппа или лямбда человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанные векторы для экспрессии доменов VH или VL содержат промотор EF-1 α , сигнал секреции, сайт клонирования для варибельной области, константные домены и селективный маркер, такой как неомицин. Домены VH и VL могут также быть клонированы в один вектор, экспрессирующий необходимые константные области. Векторами для конверсии тяжелых цепей и векторами для конверсии легких цепей затем совместно трансфицируют линии клеток для получения стабильных или транзientных линий клеток, которые экспрессируют полноразмерные антитела, например, IgG, с применением методик, известных специалистам в данной области техники.

Указанная ДНК также может быть модифицирована, например, путем замены последовательностей мыши кодирующей последовательностью константных доменов тяжелых и легких цепей человека, или путем ковалентного присоединения к кодирующей последовательности иммуноглобулина всей кодирующей последовательности не являющегося иммуноглобулином полипептида, или ее части.

Также предложены полинуклеотиды, которые гибридизуются в условиях гибридизации высокой, промежуточной или меньшей жесткости с полинуклеотидами, которые кодируют антитело, описанное в настоящем документе. Согласно конкретным вариантам реализации полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, гибридизуются в условиях гибридизации высокой, промежуточной или меньшей жесткости с кодирующими доменами VH и/или доменами VL полинуклеотидами согласно настоящему изобретению.

Условия гибридизации были описаны в данной области техники и известны специалисту в данной области техники. Например, гибридизация в жестких условиях может задействовать гибридизацию со связанной на фильтре ДНК в бх хлориде натрия/цитрате натрия (SSC) при приблизительно 45°C с последующим одним или более промываниями в 0,2 \times SSC/0,1% ДСН при приблизительно 50-65°C; гибридизация в очень жестких условиях может задействовать гибридизацию со связанной на фильтре нуклеиновой кислотой в 6 \times SSC при приблизительно 45°C с последующим одним или более промываниями в 0,1 \times SSC/0,2% ДСН при приблизительно 68°C. Гибридизация в других жестких условиях гибридизации известна специалистам в данной области техники и была описана, см., например, источник: Ausubel FM et al., eds., (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York, на стр. 6.3.1-6.3.6 и 2.10.3, включенный полностью посредством ссылки.

Согласно определенным аспектам настоящего изобретения предложены клетки (например, клетки-хозяева), экспрессирующие (например, рекомбинантным образом) антитела, описанные в настоящем документе (или их антигенсвязывающий фрагмент), которые специфически связываются с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), и родственные полинуклеотиды и экспрессионные векторы. Согласно настоящему

му изобретению предложены векторы (например, экспрессионные векторы), содержащие полинуклеотиды, содержащие последовательности нуклеотидов, кодирующие антитела против CTLA-4 или их фрагмент, для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, предпочтительно, в клетках млекопитающих. Также согласно настоящему изобретению предложены клетки-хозяева, содержащие такие векторы для рекомбинантной экспрессии антител против CTLA-4, описанных в настоящем документе (например, антитело человека или гуманизированное антитело). Согласно конкретному аспекту настоящего изобретения предложены способы получения антитела, описанного в настоящем документе, включающие экспрессию такого антитела клеткой-хозяином.

Рекомбинантная экспрессия антитела, описанного в настоящем документе (например, полноразмерного антитела, тяжелой и/или легкой цепи антитела, или одноцепочечного антитела, описанных в настоящем документе), которое специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), включает конструирование экспрессионного вектора, содержащего полинуклеотид, который кодирует указанное антитело. После получения полинуклеотида, кодирующего молекулу антитела, тяжелой и/или легкой цепи антитела или их фрагмента (например, переменных областей тяжелой и/или легкой цепи), описанных в настоящем документе, вектор для продуцирования указанной молекулы антитела может быть получен с использованием технологии рекомбинантной ДНК, с применением методик, хорошо известных в данной области техники. Соответственно, в настоящем документе описаны способы получения белка путем экспрессии полинуклеотида, содержащего последовательность нуклеотидов, кодирующую антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь). Для конструирования экспрессионных векторов, содержащих кодирующие последовательности антитела или фрагмента антитела (например, легкой цепи или тяжелой цепи) и подходящие сигналы контроля транскрипции и трансляции могут применяться способы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Указанные способы включают, например, *in vitro* методики рекомбинантной ДНК, синтетические методики и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Также предложены реплицируемые векторы, содержащие последовательность нуклеотидов, кодирующую молекулу антитела, описанного в настоящем документе, тяжелую или легкую цепь антитела, переменную область тяжелой или легкой цепи антитела или ее фрагмент, или CDR тяжелой или легкой цепи, функционально связанную с промотором. Такие векторы могут, например, включать последовательность нуклеотидов, кодирующую константную область молекулы антитела (см., например, международные публикации WO 86/05807 и WO 89/01036; и патент США № 5122464, которые включены в настоящий документ полностью посредством ссылок), а переменные области антитела могут быть клонированы в такой вектор для экспрессии полной тяжелой цепи, полной легкой цепи; или и полной тяжелой, и полной легкой цепей.

Экспрессионный вектор может быть перенесен в клетку (например, клетку-хозяина) с применением стандартных методик, и итоговые клетки могут затем быть культивированы с применением стандартных методик для получения антитела, описанного в настоящем документе, или его фрагмента. Соответственно, согласно настоящему изобретению предложены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий антитело, описанное в настоящем документе, или его фрагменты; либо его тяжелую или легкую цепь, или ее фрагмент; либо одноцепочечное антитело, описанное в настоящем документе, функционально связанное с промотором для экспрессии таких последовательностей в клетке-хозяине. Согласно некоторым вариантам реализации для экспрессии двуцепочечных антител, векторы, кодирующие как тяжелые, так и легкие цепи, индивидуально, могут быть совместно экспрессированы в клетке-хозяине для экспрессии полной молекулы иммуноглобулина, согласно подробному описанию ниже. Согласно некоторым вариантам реализации клетка-хозяин содержит вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий и тяжелую цепь, и легкую цепь антитела, описанного в настоящем документе, или их фрагмент. Согласно конкретным вариантам реализации клетка-хозяин содержит два разных вектора, первый из которых содержит полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем документе, или его фрагмента, а второй содержит полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела, описанного в настоящем документе, или его фрагмента. Согласно другим вариантам реализации первая клетка-хозяин содержит первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем документе, или его фрагмента, а вторая клетка-хозяин содержит второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела, описанного в настоящем документе. Согласно конкретным вариантам реализации тяжелая цепь/переменная область тяжелой цепи, экспрессируемые первой клеткой, связываются с легкой цепью/переменной областью легкой цепи второй клетки с образованием антитела против CTLA-4, описанного в настоящем документе, или его антигенсвязывающего фрагмента. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложена популяция клеток-хозяев, содержащая такую первую клетку-хозяина и такую вторую клетку-хозяина.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложена популяция векторов, содержащая первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь/переменную область легкой цепи антитела против CTLA-4, описанного в настоящем документе, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь/переменную область тяжелой цепи антитела

против CTLA-4, описанного в настоящем документе.

Различные системы хозяев/экспрессионных векторов могут быть использованы для экспрессии молекул антитела, описанного в настоящем документе (см., например, патент США № 5807715). Такие системы экспрессии хозяевами представлены основами, с помощью которых представляющие интерес кодирующие последовательности могут быть продуцированы и затем очищены, однако также представлены клетками, которые способны, после трансформации или трансфекции подходящими нуклеотидными кодирующими последовательностями, экспрессировать молекулу антитела, описанного в настоящем документе, *in situ*. Указанные клетки включают, не ограничиваясь перечисленными, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные рекомбинантными экспрессионными векторами с ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими кодирующие последовательности антитела; дрожжи (например, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми экспрессионными векторами, содержащими кодирующие последовательности антитела; системы клеток насекомых, инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, бакуловирусными), содержащими кодирующие последовательности антитела; системы клеток растений (например, зеленых водорослей, таких как *Chlamydomonas reinhardtii*), инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики, TMV) или трансформированных рекомбинантными плазмидными экспрессионными векторами (например, Ti-плазмидой), содержащими кодирующие последовательности антитела; или системы клеток млекопитающих (например, клеток COS (например, COS1 или COS), CHO, ВНК, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20 и BMT10), несущих рекомбинантные экспрессионные конструкции, содержащие промоторы, происходящие из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотioneина) или вирусов млекопитающих (например, поздний аденовирусный промотор; промотор вируса осповакцины размером 7,5 КДа). Согласно конкретному варианту реализации клетки для экспрессии антител, описанных в настоящем документе, или их антигенсвязывающего фрагмента представляют собой клетки CHO, например, клетки CHO из системы CHO GS System™ (Lonza). Согласно конкретному варианту реализации клетки для экспрессии антител, описанных в настоящем документе, представляют собой клетки человека, например, линии клеток человека. Согласно конкретному варианту реализации экспрессионный вектор млекопитающих представлен вектором рOrtIVEC™ или рDNA3.3. Согласно конкретному варианту реализации для экспрессии рекомбинантной молекулы антитела используют бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или эукариотические клетки (например, клетки млекопитающих), в частности, для экспрессии целой рекомбинантной молекулы антитела. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), в сочетании с вектором, таким как элемент основного промежуточно-раннего генного промотора цитомегаловируса человека, представляют собой эффективную экспрессионную систему для антител (Foecking MK & Hofstetter H (1986) *Gene* 45: 101-5; и Cockett MI et al., (1990) *Biotechnology* 8(7): 662-7, включенные в настоящий документ полностью посредством ссылки). Согласно некоторым вариантам реализации антитела, описанные в настоящем документе, продуцируют клетки CHO или клетки NS0. Согласно конкретному варианту реализации экспрессия последовательностей нуклеотидов, кодирующих антитела, описанные в настоящем документе, которые специфически связывают CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), регулирует конститутивный промотор, индуцируемый промотор или тканеспецифический промотор.

Бактериальные системы могут обеспечить преимущество, заключающееся в возможности выбора нескольких экспрессионных векторов в зависимости от предполагаемого использования экспрессируемой молекулы антитела. Например, если необходимо продуцировать значительное количество такого антитела, для получения фармацевтических композиций с молекулой антитела, могут требоваться векторы, направляющие экспрессию высоких уровней слитых белковых продуктов, которые легко очистить. Такие векторы включают, не ограничиваясь перечисленными, экспрессионный вектор *E. coli* рUR278 (источник: Ruether U & Mueller-Hill B (1983) *EMBO J* 2: 1791-1794, включенный в настоящий документ полностью посредством ссылки), отличающийся тем, что кодирующая последовательность антитела может быть индивидуально лигирована в вектор внутрь рамки с кодирующей областью *lac Z*, таким образом, что продуцируется слитый белок; векторы рIN (источники: Inouye S & Inouye M (1985) *Nuc Acids Res* 13: 3101-3109; Van Heeke G & Schuster SM (1989) *J Biol Chem* 24: 5503-5509, которые включены в настоящий документ полностью посредством ссылок); и т.п. Например, векторы рGEX могут также быть использованы для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых с глутатион-5-трансферазой (GST) белков. В общем случае такие слитые белки являются растворимыми и могут легко быть очищены из лизированных клеток путем адсорбции и связывания с глутатион-агарозными гранулами матрицы с последующей элюции в присутствии свободного глутатиона. Векторы рGEX разработаны таким образом, чтобы включать сайты протеазного расщепления тромбина или фактора Ха, так, чтобы клонированный генный продукт мог освободиться от фрагмента GST.

В системе клеток насекомых может применяться, например, вирус ядерного полиэдрома *Autographa californica* (AcNPV) в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов. Указанный вирус растет в

клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодированная последовательность антитела может быть клонирована индивидуально в не имеющие существенного значения области (например, ген полиэдрина) вируса и помещена под контроль промотора AcNPV (например, промотора полиэдрина).

В клетках-хозяевах млекопитающих может быть использован ряд экспрессионных систем на основе вирусов. В тех случаях, когда в качестве экспрессионного вектора используют аденовирус, кодирующая последовательность представляющего интерес антитела может быть лигирована в аденовирусный комплекс контроля транскрипции/трансляции, например, поздний промотор и трехкомпонентную лидерную последовательность. Указанный химерный ген может затем быть встроен в аденовирусный геном путем рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Инсерция в не имеющую существенного значения область вирусного генома (например, область E1 или E3) приводит к получению рекомбинантного вируса, жизнеспособного и способного экспрессировать молекулу антитела в инфицированном хозяине (например, см. источник: Logan J & Shenk T (1984) PNAS 81(12): 3655-9, включенный в настоящий документ полностью посредством ссылки). Специфические сигналы инициации могут также быть необходимы для эффективной трансляции инсертированных кодирующих последовательностей антитела.

Указанные сигналы включают иницирующий кодон ATG и смежные последовательности. Кроме того, указанный иницирующий кодон должен быть в фазе с рамкой считывания требуемой кодирующей последовательности для обеспечения трансляции инсерции целиком. Указанные экзогенные сигналы контроля трансляции и кодоны инициации могут быть различного происхождения, как естественные, так и синтетические. Эффективность экспрессии может быть повышена путем включения подходящих элементов - энхансеров транскрипции, терминаторов транскрипции и т.п. (см., например, источник: Bitter G et al., (1987) Methods Enzymol. 153: 516-544, включенный в настоящий документ полностью посредством ссылки).

Кроме того, может быть выбран штамм клеток-хозяев, который модулирует экспрессию инсертированных последовательностей, или модифицирует и процессирует генный продукт специфическим требуемым образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важны для функции белка. Разные клетки-хозяева обладают характерными специфическими механизмами посттрансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Могут быть выбраны подходящие линии клеток или системы хозяев для обеспечения корректных модификации и процессинга экспрессированного чужеродного белка. Для этого могут быть использованы эукариотические клетки-хозяева, обладающие клеточными механизмами для надлежащего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают, не ограничиваясь перечисленными, клетки CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NS0 (линия клеток миеломы мыши, эндогенно не продуцирующих каких-либо цепей иммуноглобулинов), CRL7030, COS (например, COS1 или COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 и HsS78Bst. Согласно некоторым вариантам реализации антитела против CTLA-4, описанные в настоящем документе, продуцируют в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO.

Согласно конкретному варианту реализации антитела, описанному в настоящем документе, или их антигенсвязывающие фрагменты отличаются пониженным содержанием фукозы или не содержат фукозы. Такие антитела могут быть получены с применением методик, известных специалисту в данной области техники. Например, антитела могут экспрессироваться в клетках, дефицитных по способности к фукозилированию или лишенных указанной способности. Согласно специфическому примеру для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов с пониженным содержанием фукозы могут быть использованы линии клеток с нокаутом обеих аллелей α -1,6-фукозилтрансферазы. Система Potelligent® (Lonza) представляет собой пример такой системы, которая может быть использована для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов с пониженным содержанием фукозы.

Для долгосрочного высокопродуктивного продуцирования рекомбинантных белков могут быть получены клетки для стабильной экспрессии. Например, могут быть сконструированы линии клеток, которые стабильно экспрессируют антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, или его антигенсвязывающий фрагмент. Согласно конкретным вариантам реализации клетка, предложенная согласно настоящему изобретению, стабильно экспрессирует легкую цепь/вариабельную область легкой цепи и тяжелую цепь/вариабельную область тяжелой цепи, которые связываются с образованием антитела, описанного в настоящем документе, или его антигенсвязывающего фрагмента.

Согласно определенным аспектам вместо применения экспрессионных векторов, которые содержат вирусные точки начала репликации, клетки-хозяева могут быть трансформированы ДНК, контролируемой подходящими элементами контроля экспрессии (например, промоторными, энхансерными последовательностями, терминаторами транскрипции, сайтами полиаденилирования и т.п.), и селективируемым маркером. После введения чужеродной ДНК/полинуклеотида сконструированные клетки могут быть оставлены для роста в течение 1-2 дней в обогащенной среде, а затем переведены на селективную среду. Селективируемый маркер в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость к селекции и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в хромосомы и расти с формированием очагов, которые, в свою очередь, могут быть клонированы и размножены в линии клеток. Применение указанного способа может

обеспечивать преимущество, заключающееся в конструировании линий клеток, которые экспрессируют антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, или его фрагмент. Такие сконструированные линии клеток могут, в частности, подходить для применения при скрининге и оценке композиции, которые взаимодействуют, прямо или непрямо, с молекулой антитела.

Может применяться ряд систем селекции, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler M et al., (1977) Cell 11(1): 223-32), гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (источник: Szybalska EH & Szybalski W (1962) PNAS 48(12): 2026-2034, включенный в настоящий документ полностью посредством ссылки) и аденинфосфорибозилтрансферазы (источник: Lowy I et al., (1980) Cell 22(3): 817-23, включенный в настоящий документ полностью посредством ссылки) в клетках tk-, hprt- или aprT-, соответственно. Также может быть использована устойчивость к антиметаболитам в качестве основы селекции по следующим генам: dhfr, придающему устойчивость к метотрексату (Wigler M et al., (1980) PNAS 77(6): 3567-70; O'Hare K et al., (1981) PNAS 78: 1527-31); gpt, придающему устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan RC & Berg P (1981) PNAS 78(4): 2072-6); neo, придающему устойчивость к аминогликозиду G-418 (Wu GY & Wu CH (1991) Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev P (1993) Ann Rev Pharmacol Toxicol 32: 573-596; Mulligan RC (1993) Science 260: 926-932; и Morgan RA & Anderson WF (1993) Ann Rev Biochem 62: 191-217; Nabel GJ & Feigner PL (1993) Trends Biotechnol 11(5): 211-5); и hygR, придающему устойчивость к гигромицину (Santerre RF et al., (1984) Gene 30(1-3): 147-56), каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Для выбора требуемого рекомбинантного клона могут обычным образом применяться способы, общеизвестные в области техники, к которой относится технология рекомбинантной ДНК; такие способы описаны, например, в источниках: Ausubel FM et al., (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler M, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); Dracopoli NC et al., (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994) (главы 12 и 13); Colbère-Garapin F et al., (1981) J Mol Biol 150: 1-14, которые полностью включены посредством ссылки в настоящий документ.

Уровни экспрессии молекулы антитела могут быть повышены за счет амплификации вектора (см. обзорную информацию в источнике: Bebbington CR & Hentschel CCG, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian клетки in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987), включенном в настоящий документ полностью посредством ссылки). Если маркер в векторной системе, экспрессирующей антитело, является амплифицируемым, при повышении уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина, увеличивается число копий указанного маркерного гена. Поскольку амплифицированная область ассоциирована с геном антитела, уровень продуцирования антитела также повысится (источник: Crouse GF et al., (1983) Mol Cell Biol 3: 257-66, включенный в настоящий документ полностью посредством ссылки).

Клетка-хозяин может быть котрансфицирована двумя или более экспрессионными векторами, описанными в настоящем документе, первый из которых кодирует происходящий из тяжелой цепи полипептид, а второй кодирует происходящий из легкой цепи полипептид. Указанные два вектора могут содержать идентичные селективируемые маркеры, что позволяет обеспечить одинаковую экспрессию полипептидов тяжелых и легких цепей. Клетки-хозяева могут быть котрансфицированы разными количествами двух или более экспрессионных векторов. Например, клетки-хозяева могут быть трансфицированы первым экспрессионным вектором и вторым экспрессионным вектором в любом из следующих соотношений: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 или 1:50.

Как вариант, может быть использован единственный вектор, который кодирует и способен экспрессировать полипептиды как тяжелых, так и легких цепей. В таких ситуациях легкая цепь должна размещаться перед тяжелой цепью, чтобы избежать избытка токсической свободной тяжелой цепи (источники: Proudfoot NJ (1986) Nature 322: 562-565; и Köhler G (1980) PNAS 77: 2197-2199, включенные в настоящий документ полностью посредством ссылок). Кодированные последовательности тяжелых и легких цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК. Указанный экспрессионный вектор может быть моноцистронным или мультицистронным. Мультицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может кодировать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более генов/последовательностей нуклеотидов, или 2-5, 5-10 или 10-20 генов/последовательностей нуклеотидов. Например, бицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может содержать, в указанном порядке, промотор, первый ген (например, тяжелую цепь антитела, описанного в настоящем документе) и второй ген (например, легкую цепь антитела, описанного в настоящем документе). В таком экспрессионном векторе транскрипцией обоих генов может управлять промотор, тогда как трансляция мРНК с первого гена может представлена кэп-зависимым механизмом сканирования, а трансляция мРНК с второго гена может быть представлена кэп-независимым механизмом, например, действующим IRES.

После получения молекулы антитела, описанного в настоящем документе, путем рекомбинантной экспрессии, она может быть очищена любым известным в данной области техники способом очищения молекулы иммуноглобулина, например, с применением хроматографии (например, ионообменной, аффинной, в частности, по аффинности к специфическому антигену после хроматографии с белком А, и колоночной хроматографии с распределением по размеру), центрифугирования, дифференциальной рас-

творимости или любой другой стандартной методики очищения белков. Кроме того, антитела, описанные в настоящем документе, могут быть слиты с гетерологичными последовательностями полипептидов, описанными в настоящем документе, или другими известными в данной области техники последовательностями для облегчения очищения.

Согласно конкретным вариантам реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, выделяют или очищают. Обычно выделенное антитело представлено антителом, по существу не содержащим других антител с антигенной специфичностью, отличающейся от специфичности выделенного антитела. Например, согласно конкретному варианту реализации состав с антителом, описанным в настоящем документе, по существу не содержит клеточного материала и/или химических предшественников. Выражение "по существу не содержащий клеточного материала" предусматривает составы с антителом, где антитело отделено от клеточных компонентов клеток, из которых оно выделено или в которых продуцировано рекомбинантным способом. Соответственно, антитело, которое по существу не содержит клеточного материала, включает составы с антителом, содержащие менее чем приблизительно 30%, 20%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% (по сухой массе) гетерологичного белка (также называемого в настоящем документе "загрязняющим белком"), и/или варианты антитела, например, иначе посттрансляционно модифицированные формы антитела или другие отличающиеся варианты антитела (например, фрагменты антитела). Если антитело получено рекомбинантным способом, оно также обычно по существу не содержит культуральной среды, т.е. культуральная среда составляет менее чем приблизительно 20%, 10%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% от объема белкового состава. При получении антитела путем химического синтеза оно обычно по существу не содержит химических предшественников или других химических веществ, т.е. отделено от химических предшественников или других химических веществ, которые вовлечены в синтез указанного белка. Соответственно, такие составы с антителом содержат менее чем приблизительно 30%, 20%, 10% или 5% (по сухой массе) химических предшественников или соединений, отличных от представляющего интерес антитела. Согласно конкретному варианту реализации антитела, описанные в настоящем документе, выделены или очищены.

Антитела или их фрагменты, которые специфически связываются с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), могут быть получены любым известным в данной области техники способом синтеза антител, например, путем химического синтеза или с применением методик рекомбинантной экспрессии. Способы, описанные в настоящем документе, задействуют, если не указано иное, стандартные методики молекулярной биологии, микробиологии, генетического анализа, рекомбинантной ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, олигонуклеотидного синтеза и модификации, гибридизации нуклеиновых кислот, а также родственные указанным методики, известные в данной области техники. Указанные методики описаны, например, в источниках, цитируемых в настоящем документе, и полностью объясняются в литературе; см., например, источники: Maniatis T et al., (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J et al., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J et al., (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (за 1987 г., с ежегодными обновлениями); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (за 1987 г., с ежегодными обновлениями) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B et al., (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно конкретному варианту реализации антитело, описанное в настоящем документе, представляет собой антитело (например, рекомбинантное антитело), полученное, экспрессированное, созданное или выделенное любым способом, который включает создание, например, путем синтеза, генетического конструирования, последовательностей ДНК. Согласно некоторым вариантам реализации такое антитело содержит последовательности (например, последовательности ДНК или последовательности аминокислот), которые в естественных условиях не присутствуют в репертуаре антител зародышевой линии животного или млекопитающего (например, человека) *in vivo*.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающегося с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), включающий культивирование клетки или клетки-хозяина, описанной в настоящем документе. Согласно определенному аспекту настоящего изобретения предложен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающегося с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), включающий экспрессию (например, рекомбинантную экспрессию) указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с использованием клетки или клетки-хозяина, описанной в настоящем документе (например, клетки или клетки-хозяина, содержащей полинуклеотиды, кодирующие антитело, описанное в настоящем документе). Согласно конкретному варианту реализации указанная клетка представляет собой выделенную клетку. Согласно конкретному варианту реализации в указанную клетку введены экзогенные полинуклеотиды. Согласно конкретному варианту реализации указанный способ дополнительно включает этап очищения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полученного из указанной клетки или клетки-хозяина. Предпочтительно, указанный способ реализуют *in vitro*.

Способы получения поликлональных антител известны в данной области техники (см., например, главу 11 источника: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5th Ed., Ausubel FM et al., eds., John Wiley and Sons, New York, включенную в настоящий документ полностью посредством ссылки).

Моноклональные антитела могут быть получены с применением широкого спектра методик, известных в данной области техники, в том числе с применением гибридомной и рекомбинантной технологии, а также технологии фагового дисплея, или их комбинации.

Например, моноклональные антитела могут быть получены с применением гибридомных методик, в том числе известных в данной области техники и описанных, например, в источниках: Harlow E & Lane D, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling GJ et al., в издании: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981), которые включены в настоящий документ полностью посредством ссылок. Термин "моноклональное антитело" в настоящем документе не ограничен антителами, получаемыми с помощью гибридомной технологии. Например, моноклональные антитела могут быть получены рекомбинантным способом из клеток-хозяев, экзогенно экспрессирующих антитело, описанное в настоящем документе, или его фрагмент, например, легкую цепь и/или тяжелую цепь такого антитела.

Согласно конкретным вариантам реализации "моноклональное антитело" в настоящем документе представляет собой антитело, продуцируемое единственной клеткой (например, гибридомной клеткой или клеткой-хозяином, продуцирующей рекомбинантное антитело), причем указанное антитело специфически связывается с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), по результатам проведения, например, ИФА ELISA или другого анализа связывания антигена или конкурентного связывания, известного в данной области техники или описанного в приведенных в настоящем описании примерах. Согласно конкретным вариантам реализации моноклональное антитело может представлять собой химерное антитело или гуманизированное антитело. Согласно некоторым вариантам реализации моноклональное антитело представляет собой моновалентное антитело или мультивалентное (например, бивалентное) антитело. Согласно конкретным вариантам реализации моноклональное антитело представляет собой моноспецифическое или мультиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело). Моноклональные антитела, описанные в настоящем документе, могут, например, быть получены с применением гибридомного способа согласно описанию в источнике: Kohler G & Milstein C (1975) *Nature* 256: 495, включенном в настоящий документ полностью посредством ссылки, или могут, например, быть выделены из фаговых библиотек, в том числе с применением методик согласно описанию в настоящем документе. Другие способы получения клональных линий клеток и экспрессируемых ими моноклональных антител хорошо известны в данной области техники (см., например, главу 11 источника: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5th Ed., Ausubel FM et al., выше).

Способы получения и скрининга специфических антител с применением гибридомной технологии распространены и хорошо известны в данной области техники. Например, в гибридомном способе мышь или другое подходящее животное-хозяина, например, овцу, козу, кролика, крысу, хомяка или обезьяну-макака, иммунизируют для активации лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, специфически связывающиеся с белком (например, CTLA-4 (например, CTLA-4 человека)), использованным для иммунизации. Как вариант, лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с клетками миеломы с применением подходящего агента для слияния, такого как полиэтиленгликоль, с получением гибридомной клетки (источник: Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986), включенный в настоящий документ полностью посредством ссылки). Кроме того, техника RIMMS (неоднократная иммунизация в нескольких сайтах) может быть использована для иммунизации животного (источник: Kilpatrick KE et al., (1997) *Hybridoma* 16:381-9, включенный в настоящий документ полностью посредством ссылки).

Согласно некоторым вариантам реализации мыши (или другие животные, такие как крысы, обезьяны, ослы, свиньи, овцы, хомяк или собака) могут быть иммунизированы антигеном (например, CTLA-4 (например, CTLA-4 человека)) и после детекции иммунного ответа, например, антитела, специфического в отношении указанного антигена, в сыворотке мыши, селезенки мышей собирают и выделяют спленоциты. Затем спленоциты сливают с применением хорошо известных методик с любыми подходящими клетками миеломы, например, клетками линии SP20, доступные в Американской коллекции типовых культур (ATCC®) (Манассас, Виргиния), с получением гибридом. Гибридомы выбирают и клонируют с применением метода ограниченных разведений. Согласно некоторым вариантам реализации собирают лимфатические узлы иммунизированных мышей и сливают с клетками миеломы NS0.

Полученные таким образом гибридомные клетки высевают и культивируют в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или более веществ, которые ингибируют рост или выживание неслитых исходных клеток миеломы. Например, если в исходных клетках миеломы отсутствует фермент гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT, или HPRT), культуральная среда для гибридом как правило, включает гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), вещества, предотвращающие рост дефицитных по HGPRT клеток.

В специфических вариантах реализации задействованы клетки миеломы, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильное продуцирование высоких уровней антитела выбранными антитело-

продуцирующими клетками, и чувствительны к среде, такой как среда HAT. К указанным линиям клеток миеломы относятся линии миеломы мышей, такие как линия клеток NS0, или происходящие из опухолей MOPC-21 и MPC-11 мыши, доступные в Центре клеток института Солка (Salk Institute Cell Distribution Center, Сан-Диего, Калифорния, США), и клетки SP-2 или X63-Ag8.653, доступные в Американской коллекции типовых культур, Роквилл, Мэриленд, США. Также были описаны линии клеток миеломы человека и гетеромиеломных клеток мышцы/человека, позволяющие получить моноклональные антитела человека (источники: Kozbor D (1984) *J Immunol* 133: 3001-5; Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987), включенные в настоящий документ полностью посредством ссылок).

Анализируют продуцирование моноклональных антител, направленных против CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), в культуральной среде, где культивируют гибридные клетки. Специфичность связывания моноклональных антител, продуцированных гибридными клетками, определяют с применением способов, известных в данной области техники, например, иммунопреципитации, или с применением анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммунологический анализ (РИА) или ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA).

После идентификации гибридных клеток, которые продуцируют антитела с требуемой специфичностью, аффинностью и/или активностью, указанные клоны могут быть субклонированы с помощью процедур ограниченного разведения и культивированы стандартными способами (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, выше). Подходящие для указанной цели культуральные среды включают, например, среду D-MEM или RPMI 1640. Кроме того, указанные гибридные клетки могут быть культивированы *in vivo* в виде асцитных опухолей у животного.

Моноклональные антитела, секретируемые указанными субклонами, подходящим способом отделяют от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки с применением стандартных процедур очищения иммуноглобулинов, таких как, например, очищение с белком А/на сефарозе, хроматография с гидроксипатитом, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

Антитела, описанные в настоящем документе, включают фрагменты антител, которые распознают специфический CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), и могут быть получены с применением любой методики, известной специалистам в данной области техники. Например, Fab- и F(ab')₂-фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть получены путем протеолитического расщепления молекул иммуноглобулина с применением таких ферментов, как папаин (для получения Fab-фрагментов) или пепсин (для получения F(ab')₂-фрагментов). Fab-фрагмент соответствует одному из двух идентичных плеч молекулы антитела и содержит полную легкую цепь, спаренную с доменами VH и CH1 тяжелой цепи. F(ab')₂-фрагмент содержит два антигенсвязывающих плеча молекулы антитела, соединенные дисульфидными связями в шарнирной области.

Кроме того, антитела, описанные в настоящем документе, или их антигенсвязывающие фрагменты могут также быть получены с применением различных способов фагового дисплея, известных в данной области техники. В способах фагового дисплея функциональные домены антитела экспонированы на поверхности фаговых частиц, которые несут кодирующие их последовательности полинуклеотидов. В частности, последовательности ДНК, кодирующие домены VH и VL амплифицируют из библиотек кДНК животных (например, библиотек кДНК пораженных тканей человека или мыши). ДНК, кодирующие домены VH и VL, рекомбинируют с линкером scFv с помощью ПЦР и клонируют в фагмидный вектор. Указанный вектор электропоруют в *E. coli* и *E. coli* инфицируют хелперным фагом. Фаг, используемый в указанных способах, как правило, представляет собой нитевидный фаг, в том числе fd и M13, а домены VH и VL обычно рекомбинантным способом сливают с фаговым геном III либо геном VIII. Фаг, экспрессирующий антигенсвязывающий домен, который связывается с конкретным антигеном, может быть выбран или идентифицирован с помощью антигена, например, с применением меченого антигена или антигена, связанного или захваченного на твердой поверхности или грануле. Примеры способов фагового дисплея, которые могут применяться для получения антител, описанных в настоящем документе, включают описанные в источниках: Brinkman U et al., (1995) *J Immunol Methods* 182: 41-50; Ames RS et al., (1995) *J Immunol Methods* 184: 177-186; Kettleborough CA et al., (1994) *Eur J Immunol* 24: 952-958; Persic L et al., (1997) *Gene* 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) *Advan Immunol* 57: 191-280; PCT-заявке PCT/GB91/001134; международных публикациях WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401 и WO 97/13844; и патентах США № 5698426, № 5223409, № 5403484, № 5580717, № 5427908, № 5750753, № 5821047, № 5571698, № 5427908, № 5516637, № 5780225, № 5658727, № 5733743 и № 5969108, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно описанию в перечисленных выше источниках после выбора фага кодирующие области антитела из фага могут быть выделены и использованы для получения целых антител, в том числе антител человека, или любого другого требуемого антигенсвязывающего фрагмента, и экспрессированы у любого требуемого хозяина, в том числе в клетках млекопитающих, клетках насекомых, клетках растений, дрожжей и бактерий, например, согласно приведенному ниже описанию. Могут также быть задействованы методики рекомбинантного получения фрагментов антител, таких как Fab-, Fab'- и (ab')₂-

фрагменты, с применением способов, известных в данной области техники, таких как описанные в источниках: PCT-публикация WO 92/22324; Mullinax RL et al., (1992) *BioTechniques* 12(6): 864-9; Sawai H et al., (1995) *Am J Reprod Immunol* 34: 26-34; и Better M et al., (1988) *Science* 240: 1041-1043, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации для получения целых антител могут быть использованы ПЦР-праймеры, включающие последовательности нуклеотидов VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты сайта рестрикции, для амплификации последовательностей VH или VL с матрицы, например, клонов scFv. С применением методик клонирования, известных специалистам в данной области техники, ПЦР-амплифицированные домены VH могут быть клонированы в векторы, экспрессирующие константную область VH, а ПЦР-амплифицированные домены VL могут быть клонированы в векторы, экспрессирующие константную область VL, например, константные области каппа или ламбда человека.

Домены VH и VL могут также быть клонированы в один вектор, экспрессирующий необходимые константные области. Векторами для конверсии тяжелых цепей и векторами для конверсии легких цепей затем котрансфицируют линии клеток для получения стабильных или транзистентных линий клеток, которые экспрессируют полноразмерные антитела, например, IgG, с применением методик, известных специалистам в данной области техники.

Химерное антитело представляет собой молекулу, разные части антитела в которой происходят из разных молекул иммуноглобулина. Например, химерное антитело может содержать переменную область моноклонального антитела мыши или крысы, слитую с константной областью антитела человека. Способы получения химерных антител известны в данной области техники; см., например, источники: Morrison SL (1985) *Science* 229: 1202-7; Oi VT & Morrison SL (1986) *BioTechniques* 4: 214-221; Gillies SD et al., (1989) *J Immunol Methods* 125: 191-202; и патенты США № 5807715, № 4816567, № 4816397 и № 6331415, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Гуманизированное антитело способно к связыванию с заранее заданным антигеном и содержит каркасную область, по существу содержащую последовательность аминокислот иммуноглобулина человека и области CDR, по существу имеющие последовательность аминокислот иммуноглобулина, не соответствующего Ig человека (например, иммуноглобулина мыши). Согласно конкретным вариантам реализации гуманизированное антитело также содержит по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Указанное антитело также может включать CH1, шарнир, области CH2, CH3 и CH4 тяжелой цепи. Гуманизированное антитело может быть выбрано из иммуноглобулинов любого класса, в том числе IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, в том числе IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. Гуманизированные антитела могут быть получены с применением различных методик, известных в данной области техники, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, прививания CDR (источники: европейский патент EP 239400; международная публикация WO 91/09967; и патенты США № 5225539, № 5530101 и № 5585089), маскировки или изменения поверхностных остатков (европейские патенты EP 592106 и EP 519596; Padlan EA (1991) *Mol Immunol* 28(4/5): 489-498; Studnicka GM et al., (1994) *Prot Engineering* 7(6): 805-814; и Roguska MA et al., (1994) *PNAS* 91: 969-973), перестановку цепей (патент США № 5565332) и методик, описанных, например, в патенте США № 6407213, патенте США № 5766886, международной публикации № WO 93/17105; и источниках: Tan P et al., (2002) *J Immunol* 169: 1119-25; Caldas C et al., (2000) *Protein Eng.* 13(5): 353-60; Morea V et al., (2000) *Methods* 20(3): 267-79; Vaca M et al., (1997) *J Biol Chem* 272(16): 10678-84; Roguska MA et al., (1996) *Protein Eng* 9(10): 895-904; Couto JR et al., (1995) *Cancer Res.* 55 (23 Supp): 5973s-5977s; Couto JR et al., (1995) *Cancer Res* 55(8): 1717-22; Sandhu JS (1994) *Gene* 150(2): 409-10 и Pedersen JT et al., (1994) *J Mol Biol* 235(3): 959-73, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки; см. также опубликованную заявку на патент США US 2005/0042664 A1 (от 24 февраля 2005 г.), которая включена в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Были описаны способы получения мультиспецифических (например, биспецифических антител), см., например, патенты США № 7951917; № 7183076; № 8227577; № 5837242; № 5989830; № 5869620; № 6132992 и № 8586713, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Однодоменные антитела, например, антитела с отсутствующими легкими цепями, могут быть получены с применением способов, хорошо известных в данной области техники; см. источники: Riechmann L & Muyldermans S (1999) *J Immunol* 231: 25-38; Nuttall SD et al., (2000) *Curr Pharm Biotechnol* 1(3): 253-263; Muyldermans S, (2001) *J Biotechnol* 74(4): 277-302; патент США № 6,005,079; и международные публикации WO 94/04678, WO 94/25591 и WO 01/44301, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Кроме того, антитела, которые специфически связываются с антигеном CTLA-4, могут, в свою очередь, быть использованы для получения антиидиотипических антител, которые "имитируют" антиген, с применением методик, хорошо известных специалистам в данной области техники. (См., например, источники: Greenspan NS & Bona CA (1989) *FASEB J* 7(5): 437-444; и Nissinoff A (1991) *J Immunol* 147(8): 2429-2438, которые включены в настоящий документ полностью посредством ссылок).

Согласно конкретным вариантам реализации антитело, описанное в настоящем документе, которое связывается с тем же эпитопом CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), что и антитело против CTLA-4, описанное в настоящем документе, представляет собой антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент. Согласно конкретным вариантам реализации антитело, описанное в настоящем документе, которое конкурентно блокирует (например, дозозависимым образом) связывание любого из антител, описанных в настоящем документе, с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), представляет собой антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент. Антитела человека могут быть получены с применением любого способа, известного в данной области техники. Например, могут быть использованы трансгенные мыши, неспособные экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, однако способные экспрессировать гены иммуноглобулина человека. В частности, генные комплексы тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов человека могут быть введены случайным образом или путем гомологичной рекомбинации в эмбриональные стволовые клетки мыши. Как вариант, варибельная область, константная область и D-область человека могут быть введены в эмбриональные стволовые клетки мыши наряду с генами тяжелых и легких цепей человека. Гены тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов мыши могут быть лишены функциональности отдельно или одновременно с введением иммуноглобулиновых локусов человека путем гомологичной рекомбинации. В частности, гомозиготная делеция J_H-области предотвращает продуцирование эндогенного антитела.

Модифицированные эмбриональные стволовые клетки размножают и микроинъектируют в бластоцисты для получения химерных мышей. Затем указанных химерных мышей скрещивают для получения гомозиготного потомства, экспрессирующего антитело человека. Трансгенных мышей иммунизируют обычным образом выбранным антигеном, например, полным антигеном или частью антигена (например, CTLA-4). Моноклональные антитела, направленные против указанного антигена, могут быть получены от иммунизированных трансгенных мышей с применением стандартной гибридомной технологии. Трансгены иммуноглобулинов человека, которые несут трансгенные мыши, проходят реаранжировку во время дифференцировки В-клеток, а затем подвергаются переключению классов и соматическим мутациям. Соответственно, при использовании такой методики возможно получение терапевтически полезных антител IgG, IgA, IgM и IgE; см. обзор указанной технологии получения антител человека в источнике: Lonberg N & Huszar D (1995) *Int Rev Immunol* 13:65-93, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Подробное описание указанной технологии получения антител человека и моноклональных антител человека, а также протоколов для получения таких антител, см., например, в международных публикациях WO 98/24893, WO 96/34096 и WO 96/33735; и патентах США № 5413923, № 5625126, № 5633425, № 5569825, № 5661016, № 5545806, № 5814318 и № 5939598. Примеры мышей, способных продуцировать антитела человека, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки, включают Xenomouse™ (Abgenix, Inc.; патенты США № 6075181 и № 6150184), HuAb-Mouse™ (Medarex, Inc./Gen Pharm; патенты США № 5545806 и № 5569825), Trans Chromo Mouse™ (Kirin) и KM Mouse™ (Medarex/Kirin).

Антитела человека, которые специфически связываются с CTLA-4 (например, CTLA-4 человека), могут быть получены различными способами, известными в данной области техники, в том числе способами фагового дисплея, описанными выше, с применением библиотек антител, происходящих из последовательностей иммуноглобулинов человека; см. также источники: патенты США № 4444887, № 4716111 и № 5885793; и международные публикации WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации человека антитела могут быть получены с применением гибридом мыши/человека. Например, лимфоциты периферической крови человека, трансформированные вирусом Эпштейна-Барр (EBV), могут быть слиты с клетками миеломы мыши для получения гибридом мыши/человека, секретирующих моноклональные антитела человека, и может быть проведен скрининг указанных гибридом мыши/человека для определения гибридом, которые секретируют моноклональные антитела человека, специфически связывающиеся с целевым антигеном (например, CTLA-4 (например, CTLA-4 человека)). Такие способы известны и описаны в данной области техники, см., например, источник: Shinmoto H et al., (2004) *Cytotechnology* 46: 19-23; Naganawa Y et al., (2005) *Human Antibodies* 14: 27-31, которые включены в настоящий документ полностью посредством ссылок.

Наборы.

Также предложены наборы, содержащие одно или более антител, описанных в настоящем документе, или фармацевтическую композицию с ними, или их конъюгаты. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен фармацевтический пакет или набор, содержащий один или более контейнеров, наполненных одним или более из ингредиентов фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, таких как одно или более антител, предложенных согласно настоящему изобретению, или антигенсвязывающий фрагмент такого антитела. Согласно некоторым вариантам реализации указанные наборы содержат фармацевтическую композицию, описанную в настоящем докумен-

те, и любой профилактический или терапевтический агент, такой как описанные в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанные наборы могут содержать Т-клеточный митоген, такой как, например, фитогемагглютинин (ФГА) и/или форболмиристатацетат (ФМА), или стимулирующее ТСР-комплекс антитело, такое как антитело против CD3 и антитело против CD28. С таким контейнером или контейнерами может быть необязательно ассоциировано уведомление в форме, установленной государственным агентством, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических средств или биологических продуктов, отражающее выданное указанным агентством одобрение на производство, применение или продажу для введения человеку.

Также предложены наборы, которые могут применяться в вышеописанных способах. Согласно одному варианту реализации набор содержит антитело, описанное в настоящем документе, предпочтительно, очищенное антитело, в одном или более контейнерах. Согласно конкретному варианту реализации наборы, описанные в настоящем документе, содержат по существу выделенный антиген CTLA-4 (например, CTLA-4 человека) в качестве контроля. Согласно другому конкретному варианту реализации наборы, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат контрольное антитело, которое не вступает в реакцию с антигеном CTLA-4. Согласно другому конкретному варианту реализации наборы, описанные в настоящем документе, содержат один или более элементов для детекции связывания антитела с антигеном CTLA-4 (например, указанное антитело может быть конъюгировано с детектируемым субстратом, таким как флуоресцентное соединение, субстрат фермента, радиоактивное соединение или люминесцентное соединение, или второе антитело, которое распознает первое антитело, может быть конъюгировано с детектируемым субстратом). Согласно конкретным вариантам реализации набор, предложенный согласно настоящему изобретению, может включать полученный рекомбинантным способом или химически синтезированный антиген CTLA-4. Входящий в набор антиген CTLA-4 может также быть присоединен к твердой подложке. Согласно более конкретному варианту реализации средства детекции из вышеописанного набора включают твердую подложку, к которой присоединен антиген CTLA-4. Такой набор может также включать неприсоединенное меченое репортером антитело против антител человека или против антител мыши/крысы. Согласно указанному варианту реализации связывание антитела с антигеном CTLA-4 может быть детектировано по связыванию указанного меченого репортером антитела.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к применению набора согласно настоящему изобретению для анализа и/или детекции *in vitro* CTLA-4 человека в биологическом образце.

Примеры

Примеры в указанном разделе (т.е. разделе 6) приведены для иллюстрации, а не для ограничения.

Пример 1. Определение характеристик новых антител против CTLA-4.

В указанном примере описано определение характеристик антител, которые связываются с CTLA-4 человека. В частности, в указанном примере описано определение характеристик антител, которые специфически связываются с CTLA-4 человека и ингибируют функцию CTLA-4. Информация о последовательностях переменных областей указанных антител представлена в табл. 4. Все указанные антитела экспрессировали в виде антител IgG₁ и анализировали в анализах согласно описанию ниже.

Связывание антител против CTLA-4 с экспрессирующими CTLA-4 клетками.

Клетки Jurkat, сконструированные для конститутивной экспрессии CTLA-4 человека (Promega), использовали для анализа связывания антител против CTLA-4. Вкратце, указанные клетки при плотности 5×10^5 клеток/лунку окрашивали с применением 2 мкг/мл антитела в 96-луночной планшете в течение 30 мин при 4°C. Клетки двукратно промывали и инкубировали в течение 20 мин при 4°C с вторичным антителом против IgG человека (Thermo Scientific, кат. № 31529). Клетки промывали и суспендировали в 50 мкл 2% параформальдегида (Alfa Aesar, кат. № 43368) в ФСБ. Данные собирали с помощью BD FACS Canto II.

Как показано на фиг. 1A-1G, все протестированные антитела против CTLA-4 связывались с экспрессирующими CTLA-4 клетками.

Эффект антитела против CTLA-4 на МКПК человека после стимуляции стафилококковым энтеротоксином А (SEA).

Функциональную активность антитела против CTLA-4.

AGEN1884.H3 (IgG₁) в отношении первичных МКПК человека оценивали после стимуляции стафилококковым энтеротоксином А (SEA). Вкратце, криоконсервированные МКПК стимулировали 100 нг/мл суперантигена SEA (Toxin Technologies, Кат. № at101red) в отсутствие или в присутствии 10 мкг/мл антитела против CTLA-4 или изотипического контрольного антитела (IgG₁) в течение 5 дней при 37°C и 5% CO₂. Концентрации ИЛ-2 в культуральном супернатанте анализировали с помощью AlphaLISA (Perkin Elmer, Кат. № AL221F).

Антитело против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁) повышало продуцирование ИЛ-2 в МКПК человека, стимулированных суперантигеном SEA (фиг. 2).

Эффект антитела против CTLA-4 на ИЛ-2-люциферазную репортерную линию клеток.

Далее, функциональную активность антитела против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁) дополнительно

анализировали с применением ИЛ-2-люциферазного репортерного анализа. Вкратце, была сконструирована линия Т-клеток человека (Jurkat), эндогенно экспрессирующих CD3 и CD28, для конститутивной экспрессии CTLA-4 на поверхности клеток и люциферазного репортерного гена, управляемого промото-ром ИЛ-2. Репортерную линию клеток Jurkat культивировали совместно с линией антигенпрезентирующих клеток (Raji), эндогенно экспрессирующих CD80 и CD86, и сконструированных для экспрессии фирменного активатора Т-клеток (Promega). Запуск Т-клеточных рецепторов (TCR) (сигнал 1) достигался за счет активатора Т-клеток; а костимулирующую сигнализацию (сигнал 2) обеспечивали транс-активным образом CD80 и CD86, экспрессируемые на клетках Raji. TCR-сигнализация в линии Т-клеток Jurkat запускала экспрессию ИЛ-2, что приводило к продуцированию люциферазы, суррогатного маркера активации Т-клеток. Совместное культивирование указанных двух линий клеток приводило к привлечению ингибиторного корцептора CTLA-4 (экспрессируемого на клетках Jurkat), с ингибированием его естественными лигандами CD80 и CD86 (экспрессируемыми на клетках Raji) активации Т-клеток, на которое указывает отсутствие экспрессии люциферазы. Добавление возрастающих концентраций блокирующих антител против CTLA-4 ослабляло указанное ингибирование. Экспрессию люциферазы количественно определяли с применением реагента Bio-Glo™, и использовали итоговые данные для определения значимости кратности ответа (кратность увеличения при применении AGEN1884.H3 (IgG₁) по сравнению с применением изотипического контрольного антитела (IgG₁)).

Как показано на фиг. 3, антитело против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁) дозозависимым образом устраняло опосредованное CTLA-4 ингибирование Т-клеток в указанном ИЛ-2-люциферазном репортерном анализе.

Эффект антитела против CTLA-4 на репортерную линию клеток с Fc-рецептором гамма IIIA.

Способность антитела против CTLA-4 к одновременному привлечению CTLA-4 и сигнала путем активации Fc-рецепторов гамма IIIA оценивали с использованием репортерной линии клеток, экспрессирующей Fc-рецептор гамма IIIA (FcγRIIIA) (Promega). Вкратце, конструировали клетки Jurkat для конститутивной экспрессии CTLA-4 человека на поверхности клеток. Указанные целевые клетки культивировали совместно с линией эффекторных клеток (Jurkat), сконструированных для экспрессии FcγRIIIA (вариант V158), расположенного перед элементом ответа NFAT (RE), управляющего экспрессией люциферазы светлячков. Титрованную дозу AGEN1884.H3 (IgG₁) или изотипического контрольного антитела (IgG₁) добавляли в совместную культуру и инкубировали при 37°C в течение ночи. Одновременное привлечение AGEN1884.H3 целевой линией клеток (связывание Fab-области CTLA-4) и линией эффекторных клеток (связывание Fc-области с FcγRIIIA) запускает активацию репортерного гена RE NFAT и экспрессию люциферазы. На следующий день в совместную культуру добавляли реагент Bio-Glo (Promega), измеряли люминесценцию с помощью планшет-ридера EnVison Multimode (Perkin Elmer), и регистрировали относительные световые единицы (RLU) для расчета значений кратности ответа (кратность увеличения при применении AGEN1884.H3 (IgG₁) по сравнению с применением изотипического контрольного антитела (IgG₁)).

При связывании с целевыми клетками, экспрессирующими CTLA-4 человека на поверхности клеток, антитело IgG₁ AGEN1884.H3 активировало FcγRIIIA-сигнализацию в эффекторных клетках (фиг. 4).

Пример 2. Определение характеристик антител против CTLA-4 с разными Fc-областями.

В указанном примере проанализировано влияние взаимодействия Fc/Fc-рецептора на функциональную активность антител против CTLA-4. AGEN1884.H3 экспрессировали в виде антител, содержащих Fc-область IgG₁ с мутациями S239D/I332E, S239D/A330L/I332E или L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L в соответствии с системой нумерации EU, и тестировали в функциональных анализах, описанных ниже. Антитело AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/I332E) содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 27. Антитело AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E) содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 25, и легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 27. Антитело AGEN1884.H3 (IgG₁ L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L) содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 26, и легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 27. Для сравнения AGEN1884 также экспрессировали в виде антитела IgG₁ дикого типа, содержащего мутации S239D/I332E или S239D/A330L/I332E в соответствии с системой нумерации EU, или афукозилированного антитела IgG₁, и тестировали в некоторых функциональных анализах.

Связывание антител против CTLA-4 с экспрессирующими CTLA-4 клетками.

Связывание антител против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/I332E), AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E) и AGEN1884.H3 (IgG₁ L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L) с экспрессирующими CTLA-4 клетками характеризовали аналогичным описанному выше образом. Вкратце, клетки Jurkat, сконструированные для экспрессии CTLA-4 человека (Promega), окрашивали сначала 5 мкг/мл антитела против CTLA-4 или изотипического контрольного антитела, а затем вторичным антителом к IgG человека (Thermo Scientific, Кат.№ 31529). Клетки анализировали с применением BD FACS Canto II.

Как показано на фиг. 5A-5D, все антитела AGEN1884.H3 с разными Fc-областями связывались с клетками, экспрессирующими CTLA-4 человека.

Эффект антитела против CTLA-4 на связывание лигандов с CTLA-4 человека.

В указанном примере тестировали способность Fc-варианта антитела против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁-S239D/A330E/I332E) для блокирования связывания между CTLA-4 человека и его лигандами, CD80 и CD86.

Вкратце, рекомбинантные белки CD80-FC и CD86-FC конъюгировали с флуорохромом Alexa Fluor 647 (Invitrogen, A20186). Клетки Jurkat трансдуцировали trCTLA4 (усеченный внутриклеточный домен) под контролем промотора EF1 α согласно описанию в Nakaseko et al. (J Exp Med. 1999 Sep 20; 190(6): 765-774), с получением таким образом линии клеток, конститутивно экспрессирующих CTLA-4 человека на поверхности клеток. Экспрессирующие CTLA-4 клетки инкубировали с титрованными дозами антитела против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁-S239D/A330E/I332E), референсного антитела против CTLA-4 или изотипического контрольного антитела (IgG₁). Затем клетки окрашивали флуоресцентно меченым белком CD80-FC или CD86-FC. После окрашивания анализировали флуоресценцию, используя проточный цитометр LSRFortessa (BD Biosciences). Графики FACS анализировали с использованием комбинации программного обеспечения FACS DIVA и WENI Weasel. Графики значений строили с использованием программного обеспечения Graphpad Prism.

Как показано на фиг. 6A, оба антитела, AGEN1884.H3 (IgG₁-S239D/A330E/I332E) и референсное антитело против CTLA-4, блокировали связывание между CTLA-4 человека и CD80 дозозависимым образом, тогда как изотипическое контрольное антитело (IgG₁) не оказывало эффекта. Как показано на фиг. 6B, оба антитела, AGEN1884.H3 (IgG₁-S239D/A330E/I332E) и референсное антитело против CTLA-4, также блокировали связывание между CTLA-4 человека и CD86 дозозависимым образом, тогда как изотипическое контрольное антитело (IgG₁) не оказывало эффекта. Эти данные показывают, что AGEN1884.H3 (IgG₁-S239D/A330E/I332E) функционирует в качестве блокирующего лиганда CTLA-4 антитела.

Эффект антител против CTLA-4 на МКПК человека после стимуляции стафилококковым энтеротоксином А (SEA).

В указанном примере анализировали влияние Fc-областей на функциональную активность антител против CTLA-4 с применением анализа со стимуляцией SEA, описанного выше. Вкратце, МКПК человека культивировали *in vitro* с 100 нг/мл пептида SEA (Toxin Technologies, Кат.№ at101red) в отсутствие или в присутствии антител против CTLA-4 с разными Fc-областями или изотипического контрольного антитела. Через пять дней измеряли концентрации ИЛ-2 в культуральном супернатанте, маркер активации Т-клеток, с применением AlphaLISA (Perkin Elmer, Кат.№ AL221F).

Как показано на фиг. 7A, три антитела AGEN1884.H3, содержащие мутации в Fc-областях IgG₁, все из которых усиливали связывание с Fc γ RIIIA, стимулировали более выраженную секрецию ИЛ-2 по сравнению с AGEN1884.H3, содержащим Fc-область IgG₁ дикого типа.

В аналогичных исследованиях антитела AGEN1884.H3 или AGEN1884 с разными Fc-областями тестировали в анализе со стимуляцией SEA. Введение замен S239D/I332E, S239D/A330L/I332E или L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L в Fc-область IgG₁ значимо повышало функциональную активность AGEN1884.H3 (фиг. 7B). Аналогичным образом, AGEN1884 (IgG₁ S239D/I332E), AGEN1884 (IgG₁ S239D/A330L/I332E) и афукозилированный AGEN1884 (IgG₁) повышали продуцирование ИЛ-2 в более низких по существу концентрациях по сравнению с AGEN1884 с Fc-областью IgG₁ дикого типа (фиг. 7C).

Эффект антител против CTLA-4 на фосфорилирование ZAP70.

В указанном примере влияние Fc-областей на функциональную активность антител против CTLA-4 в синапсе между Т-клетками /антигенпрезентирующими клетками (АПК) анализировали с использованием анализа для измерения уровня фосфорилирования протеинтирозинкиназы ZAP70, которая после привлечения TCR направляется к TCR, где происходит ее фосфорилирование, и облегчает последующую сигнализацию.

Вкратце, МКПК человека инкубировали при субоптимальной концентрации пептида SEA и 10 мкг/мл изотипического контрольного антитела (IgG₁) или антитела против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁), AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E) или AGEN1884.H3 (IgG₁ N297A). Затем клетки инкубировали при 37°C в течение 0 (предварительный период) 1, 5, 10, 30 или 60 мин. В конце инкубации клетки лизировали холодным буфером 1 \times RIPA с добавлением коктейля ингибиторов фосфатаз/протеаз (Cell Signaling Technologies). После осветления супернатанта количественно определяли концентрацию белка с применением анализа с бисинхониновой кислотой (BCA) (Pierce Biotechnology). Клеточные лизаты (20 мкг/дорожка) получали в буфере для образцов Bolt LDS, разведенном и нагреваемом в течение 10 мин при 70°C до загрузки на 4-12% гели Bolt Bis Tris (Novex). Белки разделяли в 1 \times Bolt MOPS-буфера (ThermoFisher), а затем переносили блоты на ПВДФ-мембрану. После блокады 5% бычьим сывороточным альбумином (BSA, 1 ч) образцы инкубировали с первичным антителом кролика против антител человека фосфо-ZAP70 (Tyr493)/Syk (Tyr526) (Cell Signaling Technologies) в блокирующем буфере в течение ночи при 4°C. Мембраны зондировали вторичным HRP-конъюгированным антителом козы против антител кролика и визуализировали реагентом SignalFire ECL (Cell Signaling Technologies). Захват изо-

бражений осуществляли с использованием системы визуализации Chemidoc (BioRad). В качестве контроля оценивали общий белок ZAP70 после десорбции мембран буфером для десорбции Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer. Проводили денситометрический анализ фосфо-ZAP70, нормированного по общему ZAP70, с применением Image J (Wayne Rasband; Национальный институт психического здоровья (National Institute of Mental Health), Бетесда, Мэриленд, США), и выражали результаты в виде кратности изменения по сравнению с обработанными изотипическим контролем образцами которые инкубировали в течение 1 мин.

Как показано на фиг. 8А-8В, в образце с изотипическим контрольным антителом фосфорилирование ZAP70 транзистентно повышалось в пределах 10 мин после стимуляции и быстро снижалось, достигая недетектируемых уровней через 15 мин. И напротив, добавление антител против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁) или AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E) продлевало детектируемую активацию ZAP70 до 30 мин, при этом наиболее выраженные активность и относительное содержание наблюдались при применении AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E).

Эффект антител мыши против CTLA-4 на рост опухоли и истощение по внутриопухолевым регуляторным Т-клеткам в модели на мышах.

В указанном примере анализировали влияние Fc-областей на противоопухолевую и истощающую внутриопухолевые регуляторные Т-клетки (Treg) активность антител против CTLA-4 с применением модели рака толстой кишки на мышах (мышь, несущие опухоль CT26).

Вкратце, 5×10^4 опухолевых клеток CT26 суспендировали в 100 мл ФСБ и инъецировали подкожно самкам мышей BALB/cJ возрастом 6-8 недель (Jackson Laboratories). После трансплантации и до достижения опухолью объема 50-80 мм³ мыши получали лечение в виде однократной дозы 100 мкг антитела мыши против CTLA-4 9D9 (mIgG2a), Fc-молчащего варианта антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a-N297A), Fc-варианта антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) или изотипического контрольного антитела (mIgG2a). Последовательности аминокислот протестированных антител мыши представлены в табл. 7.

Таблица 7

Последовательности аминокислот антител мыши против CTLA-4

Описание	Последовательность	SEQ ID NO
Антитело мыши против CTLA-4 (mIgG2a), тяжелая цепь	EAKLQESGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDYIMN WVKQSHGKSLEWIGVINPYNGDTSYNQKFKGKATL TVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARYYGSWFA YWGQGLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSV TLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQ SDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKV DKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPP KIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVN NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMS GKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYV LPPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNG KTELNYKNTEPVLDS DGSYFMYSKLRVEKKNWVER NSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG	49
Антитело мыши против CTLA-4 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E), тяжелая цепь	EAKLQESGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDYIMN WVKQSHGKSLEWIGVINPYNGDTSYNQKFKGKATL TVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARYYGSWFA YWGQGLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSV TLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQ SDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKV DKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPDVFI FPP KIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVN NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMS GKEFKCKVNNKDLPLPEERTISKPKGSVRAPQVYV LPPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNG KTELNYKNTEPVLDS DGSYFMYSKLRVEKKNWVER NSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG	50
Антитело мыши против CTLA-4 (mIgG2a-N297A), тяжелая цепь	EAKLQESGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDYIMN WVKQSHGKSLEWIGVINPYNGDTSYNQKFKGKATL TVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARYYGSWFA YWGQGLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSV TLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQ SDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKV	51
	DKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPP KIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVN NVEVHTAQTQTHREDYASTLRVVSALPIQH QDWMS GKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYV LPPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNG KTELNYKNTEPVLDS DGSYFMYSKLRVEKKNWVER NSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG	
Антитело мыши против CTLA-4 (mIgG2a), легкая цепь	DIVMTQTTL SLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGN TYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDLG VYYCFQGSHPVYTFGG GTKLEIKRADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASV VCF LNNFYPKDINVKWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKD STYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPI VKSFNRNEC	52

В первом эксперименте у мышей, получавших лечение антителами, затем один раз в две недели измеряли рост опухолей. Как показано на фиг. 9А, Fc-вариант антитела против CTLA-4 9D9 (представлено

как mIgG2a-S239D/A330L/I332E) индуцировал полный регресс у всех несущих CT26 опухоль мышей (у 8 из 8 протестированных мышей). И напротив, другие варианты антитела 9D9 были неспособны обеспечить такую же эффективность: собственно антитело 9D9 (mIgG2a) индуцировало полный регресс у трех из девяти протестированных мышей, а Fc-молчащий вариант антитела 9D9 (mIgG2a-N297A) был неспособен индуцировать регресс ни у одной из девяти протестированных мышей.

Во втором эксперименте несущие CT26 опухоль мыши получали лечение согласно описанию выше, затем их умерщвляли через 0, 24, 72 или 240 ч после проведения лечения для сбора опухолевой ткани, дренирующих опухоль лимфатических узлов и селезенок. В собранных тканях оценивали размножение FoxP3⁺ Treg с помощью проточной цитометрии. Суспензии отдельных клеток получали путем механического разъединения с последующей фильтрацией (клеточное сито с размером пор 70 мкм). Для уменьшения неспецифического связывания клетки инкубировали с блокирующим FcγR антителом (Biolegend) в FACS-буфере (ФСБ, 2 mM ЭДТК, 0,5% БСА, pH 7,2) в течение 15 мин при температуре окружающей среды. Затем образцы двукратно промывали в FACS-буфере и проводили окрашивание на панель линий CD3, CD4, CD8, и CD25, а также окрашивали фиксируемым маркером живых/мертвых клеток в течение 30 мин при 4°C. Для определения Treg образцы затем двукратно промывали, фиксировали, пермеабелизовали и затем инкубировали с антителом против FoxP3 (FJK-16s) в течение 30 мин при 4°C. Образцы анализировали, используя проточный цитометр LSRFortessa (BD Biosciences). Графики FACS анализировали с использованием комбинации программного обеспечения FACS DIVA и WEHI Weasel. Как показано на фиг. 9B, оба антитела, антитело против CTLA-4 9D9 (mIgG2a) и Fc-вариант антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E), уменьшали количество внутриопухолевых FoxP3⁺ Treg по сравнению с изотипическим контрольным антителом, при этом Fc-вариант антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) наиболее значительно уменьшал количество внутриопухолевых FoxP3⁺ Treg. Fc-молчащий вариант антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a-N297A) по существу не снижал количество внутриопухолевых FoxP3⁺ Treg по сравнению с изотипическим контрольным антителом. Ни в одной из групп лечения не наблюдалось существенных изменений количеств внутриопухолевых CD45⁺ лейкоцитов или CD4⁺ клеток, не являющихся Treg. Fc-вариант антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) индуцировал максимальное увеличение соотношения внутриопухолевых CD8/Treg с течением времени, затем следовало антитело 9D9 (mIgG2a), а затем Fc-молчащий вариант антитела 9D9 (mIgG2a-N297A) и изотипическое контрольное антитело (mIgG2a).

Как показано на фиг. 9C, антитело против CTLA-4 9D9 (mIgG2a), Fc-вариант антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) и Fc-молчащий вариант антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a-N297A) не оказывали существенного эффекта на количество FoxP3⁺ Treg в дренирующих опухоль лимфатических узлах (TDLN) по сравнению с изотипическим контрольным антителом. Аналогичным образом, как показано на фиг. 9D, антитело против CTLA-4 9D9 (mIgG2a), Fc-вариант антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) и Fc-молчащий вариант антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a-N297A) не оказывали существенного эффекта на количества селезеночных FoxP3⁺ Treg по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

Эффект антител мыши против CTLA-4 в комбинации с противоопухолевой вакциной на рост опухоли.

В указанном примере тестировали эффект на рост опухоли комбинации антител мыши против CTLA-4 и противоопухолевой ВПЧ-вакцины в модели ВПЧ+ TC-1 сингенной опухоли на мышах.

Линия клеток TC-1 была разработана путем котрансформации первичных эпителиальных клеток легкого (C57BL/6) онкогенами c-Ha-ras и ВПЧ-16 (E6/E7) согласно описанию в источнике: Lin et al. (1996, Cancer Res. 56(1): 21-26). Для имплантации опухоли 2×10⁵ клеток TC-1 инъецировали подкожно самкам мышей C57BL/6 возрастом 6-8 недель (Jackson Laboratories). На 5, 10 и 15 день после имплантации опухоли мышам вводили по 100 мкг антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a), Fc-варианта антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) или изотипического контрольного антитела (mIgG2a) в комбинации с дозой ВПЧ-вакцины (ВПЧ⁺ опухоль, вирусные антигены E6/E7) или без дополнительного лечения. Каждая доза ВПЧ-вакцины содержала 30 мкг белка HSP (0,4 нМ) в комплексе с пептидным пулом ВПЧ (1,2 нМ) с добавлением 10 мкг адьюванта QS-21 Stimulon®. После лечения оценивали рост опухоли у мышей один раз в две недели и умерщвляли их при достижении опухолями размера 2000 мм³ или при изъязвлении.

Как показано на фиг. 10, наблюдалось увеличение противоопухолевой эффективности как антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a), так и Fc-варианта антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) при введении в комбинации с противоопухолевой ВПЧ-вакциной. Указанный эффект был более выраженным в случае Fc-варианта антитела против CTLA-4 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E). В частности, Fc-вариант антитела против CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) индуцировал заметное дополнительное снижение роста опухоли TC-1 при применении комбинации с противоопухолевой ВПЧ-вакциной по сравнению с введением указанного антитела как отдельного агента. Указанное дополнительное снижение роста опухоли было более выраженным по сравнению с наблюдаемым для комбинаций антитела 9D9 (mIgG2a) или изотипического контрольного антитела (mIgG2a) с противоопухолевой ВПЧ-вакциной.

Определение характеристик размноженных и активированных популяций Т-клеток.

В указанном примере определяли характеристики размноженных и активированных популяций Т-клеток применительно к генной экспрессии и CpG-метилированию. Вкратце, естественные CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ регуляторные Т-клетки или CD4⁺ CD25^{+/−} FOXP3 нерегуляторные Т-клетки выделяли из периферической крови здорового донора-человека, размножали и активировали. Затем определяли характеристики указанных Т-клеток применительно к экспрессии FOXP3 и CTLA 4 с помощью проточной цитометрии, и оценивали стабильность линии путем исследования CpG-метилирования ДНК в областях CpG в пределах локусов FOXP3 и CTLA4. Как известно в данной области техники, гипометилирование в указанных CpG-сайтах может быть использовано для точного различения эффекторных и регуляторных линий Т-клеток (Waight et al., 2015, J. Immunol. 194(3): 878-882).

МКПК выделяли в градиенте фиколла из лейкоцитомоноцитарных слоев от здоровых доноров (Research Blood Components, LLC) и затем обогащали по эффекторным Т-клеткам (Teff) или естественным регуляторным Т-клеткам (Treg), используя выделение с магнитными гранулами (MACS, Miltenyi). Обогащенные Teff или Treg активировали микрогранулами CD3-CD28 (соотношение гранулы:клетки 1:1; Invitrogen) и рекомбинантным человеком ИЛ-2 в течение семи дней в среде RPMI с добавлением 10% инактивированной нагреванием ФБС при 37°C и 5% CO₂. После стимуляции оценивали экспрессию FOXP3 и CTLA-4 в клетках с помощью проточной цитометрии. Для уменьшения неспецифического связывания клетки предварительно инкубировали с блокирующим FcγR антителом (Biolegend) в FACS-буфере (ФСБ, 2 мМ ЭДТК, 0,5% БСА, рН 7,2) в течение 15 мин при температуре окружающей среды. Затем образцы двукратно промывали в FACS-буфере и проводили окрашивание на панель линий CD3, CD4, CD8, CD25, а также окрашивали фиксируемым маркером клеточной смерти в течение 30 мин при 4°C. Для оценки мембранной экспрессии CTLA-4 проводили окрашивание CTLA-4 при 37°C. Для внутриклеточного окрашивания FOXP3 и CTLA-4 образцы двукратно промывали, фиксировали, пермеабелизовали и инкубировали в антителом против FOXP3 (PCH101) и антителом против CTLA-4 (BNI3), соответственно, в течение 30 мин при 4°C. Затем образцы двукратно промывали и анализировали, используя проточный цитометр LSRFortessa (BD Biosciences). Графики FACS анализировали с использованием комбинации программного обеспечения FACS DIVA и WENI Weasel. Для анализа на CpG-метилирование выделяли тотальную ДНК из приблизительно 1×10⁵ необученных CD4⁺ Т-клеток, активированных Teff или активированных Treg и подвергали пироксевенированию.

Как показано на фиг. 11А, на активированных Treg был детектирован высокий уровень экспрессии FOXP3, а также высокие уровни как внутриклеточной, так и мембранной экспрессии CTLA-4. И напротив, на активированных Teff наблюдались пониженные уровни FOXP3, внутриклеточного CTLA-4 и мембранного CTLA-4 по сравнению с активированными Treg. В частности, на активированных Teff наблюдался по существу меньший уровень мембранной экспрессии CTLA-4 по сравнению с активированными Treg. На фиг. 11В также показано, что в активированных Treg также наблюдалось гипометилирование CpG-областей FOXP3 и CTLA4 по сравнению с необученными и активированными Teff от того же донора.

Эффект антител против CTLA-4 на антителозависимую клеточную цитотоксичность экспрессирующих CTLA-4 человека Т-клеток.

В указанном примере оценивали эффект антитела против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁) или его Fc-вариантов на антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) экспрессирующих CTLA-4 человека Т-клеток с применением многопараметрического микроскопического анализа активации каспазы 3/7 для количественного определения активности АЗКЦ.

Вкратце, экспрессирующие CTLA-4 целевые клетки культивировали совместно с клетками NK-92, экспрессирующими FcγR3A, после опсонизации 10 мкг/мл антитела против CTLA-4 или его Fc-вариантов согласно приведенному ниже описанию. В первом эксперименте клетки Jurkat, сконструированные для конститутивной экспрессии поверхностного CTLA-4 человека использовали в качестве целевых клеток. Экспрессирующие CTLA-4 клетки Jurkat получали путем трансдукции линии клеток Jurkat trCTLA4 (с удаленным внутриклеточным доменом) под контролем промотора EF1α, согласно описанию в источнике: Nakaseko et al. (1999, J. Exp. Med. 190(6): 765-774). Во втором эксперименте первичные активированные эффекторные и регуляторные Т-клетки человека использовали в качестве целевых клеток. Экспрессирующие CTLA-4 целевые клетки и экспрессирующие FcγR3A-158V клетки NK-92 были дифференциально окрашены с применением красного и синего индикаторов живых клеток (Thermo Fisher) и совместно культивировали при соотношении клеток 1:1 (1,5×10³ клеток/лунку в 384-луночных планшетах). Образцы обрабатывали 10 мкг/мл AGEN1884.H3 (IgG₁), AGEN1884.H3 (IgG₁ N297A), AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E), AGEN1884.H3 (IgG₁ S267E/L328F), афукозилированного AGEN1884.H3 (IgG₁) или изотипического контрольного антитела (IgG₁). Затем оценивали индукцию апоптоза от времени в образцах путем прямой конфокальной визуализации субстрата каспазы 3/7, который флуоресцирует после расщепления активированной каспазой. Изображения образцов захватывали каждые 20 мин на протяжении шести часов. Процент активности АЗКЦ измеряют по числу апоптотических клеток относительно общего числа клеток при каждом варианте условий.

Как показано на фиг. 12A, все антитела: Fc-вариант антитела AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E), афукозилированное антитело AGEN1884.H3 и антитело AGEN1884.H3 (IgG₁), индуцировали по существу более высокую активность АЗКЦ в клетках Jurkat, сконструированных для экспрессии поверхностного CTLA-4 по сравнению с вариантом AGEN1884.H3 (IgG₁ N297A), вариантом AGEN1884.H3 (IgG₁ S267E/L328F) и изотипическим контрольным антителом (IgG₁). Fc-вариант антитела AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E) и афукозилированное антитело AGEN1884.H3 индуцировали большее повышение активности АЗКЦ по сравнению с антителом AGEN1884.H3 (IgG₁). Как показано на фиг. 12B, Fc-вариант антитела AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E) индуцировали максимальные уровни АЗКЦ как в первичных активированных эффекторных Т-клетках человека (левая панель), так и в первичных активированных регуляторных Т-клетках человека (правая панель), за ним следовало афукозилированное антитело AGEN1884.H3. Антитело AGEN1884.H3 (IgG₁) также индуцировало несколько более высокие уровни АЗКЦ по сравнению с контрольными. Остальные протестированные антитела индуцировали незначительную активность АЗКЦ или не индуцировали АЗКЦ как в эффекторных, так и в регуляторных Т-клетках. Следует отметить, что и Fc-вариант антитела AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E), и афукозилированное антитело AGEN1884.H3 индуцировали по существу более выраженную АЗКЦ в регуляторных Т-клетках по сравнению с эффекторными Т-клетками.

Эффект антител против CTLA-4 в комбинации с антителом против PD-1 на функциональность Т-клеток.

В указанном примере исследовали эффект антител против CTLA-4 в комбинации с антителом против PD-1 на функцию первичных Т-клеток человека.

Вкратце, МКПК выделяли в градиенте фиколла из лейкоцитомоноцитарных слоев от двух здоровых доноров-людей (Research Blood Components, LLC). Указанный эксперимент проводили двукратно на МКПК, собранных от каждого донора, в общей сложности в двух повторностях для каждого донора. Для каждой повторности выделенные МКПК инкубировали в течение четырех дней в стимулирующих условиях культивирования с титрованием доз антитела против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁), Fc-варианта антитела против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E) или изотипического контрольного антитела (IgG₁) в комбинации с фиксированной дозой (5 мкг/мл) референсного антитела-антагониста против PD-1 или изотипического контрольного антитела (IgG₄). Стимулирующие условия культивирования были определены как суспензирование клеток в среде RPMI с добавлением 100 нг/мл суперантигена SEA (Sigma-Aldrich), 10% инактивированной нагреванием ФБС при 37°C, и 5% CO₂. После инкубации анализировали продуцирование ИЛ-2 в бесклеточных супернатантах с применением иммунологического анализа AlphaLISA (Perkin-Elmer). Данные собирали, используя планшет-ридер EnVision® Multilabel Plate Reader (Perkin-Elmer), и определяли концентрацию ИЛ-2, используя стандартную кривую для ИЛ-2. Значения интерполировали и наносили на график с применением программного обеспечения Graphpad Prism.

Как показано на фиг. 13A-13D, и антитело против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁), и Fc-вариант антитела против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E) индуцировали повышенное продуцирование ИЛ-2 по сравнению с изотипическим контролем или референсным антителом против PD-1 по отдельности. Продуцирование ИЛ-2 дополнительно повышалось при комбинировании AGEN1884.H3 или AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E) с референсным антителом против PD-1. При введении с изотипическим контрольным антителом или в комбинации с референсным антителом против PD-1 Fc-вариант антитела против CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E) индуцировал большее увеличение продуцирование ИЛ-2 по сравнению с AGEN1884.H3 (IgG₁). Указанный эффект был стабильным в повторностях для первого донора (фиг. 13A и 13B) и второго донора (фиг. 13C и 13D).

Пример 3. Картирование эпитопов антитела против CTLA-4.

Взаимодействие Fab-фрагмента AGEN1884 (AGEN1884-Fab) с внеклеточным доменом CTLA-4 человека исследовали с применением масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX). Внеклеточный домен CTLA-4, по отдельности или в комбинации с AGEN1884-Fab, в забуференном фосфатом солевом растворе при pH 7,4, разводили 10-кратным объемом буфера для буфера для мечения с оксидом дейтерия и инкубировали на протяжении варьирующих периодов времени (0, 60, 300, 1800 и 7200 с) при комнатной температуре. Обмен водорода на дейтерий останавливали путем добавления одного объема 4 М гидрохлорида гуанидина и 0,85 М TCEP (трис(2-карбоксииэтил)фосфинового) буфера; итоговое значение pH составляло 2,5. Затем образцы подвергали расщеплению пепсином/протеазой типа XIII прямо на колонке и проводили анализ ЖХ-МС. Масс-спектры регистрировали в режиме только МС. Для расчета включения дейтерия масс-спектры для заданного пептида объединяли в пределах пика экстрагированной ионной хроматограммы и рассчитывали взвешенное среднее отношение м/з. Увеличение массы от массы природного пептида (0 мин) до взвешенной средней массы соответствует уровню включения дейтерия. Строили кривые накопления дейтерия на протяжении времени обмена для всех указанных пептидов для дальнейшего анализа и сравнивали их, используя программное обеспечение HDXaminer.

В большинстве пептидов CTLA-4 наблюдались идентичные или аналогичные уровни дейтерия в присутствии и в отсутствие Fab-фрагмента против CTLA-4 человека. Для нескольких пептидных сегментов, однако, было обнаружено значимое снижение включения дейтерия при связывании Fab. Все остатки

в указанном параграфе пронумерованы в соответствии с SEQ ID NO: 33. В двух областях, остатках 80-82 (QVT, SEQ ID NO: 39) и остатках 135-149 (YPPYYLIGINGTQI, SEQ ID NO: 37), наблюдалась выраженная защита от дейтерия при связывании CTLA-4 человека с Fab. Максимальное снижение поглощения дейтерия наблюдалась в остатках 140-141 (YL), которые, таким образом, предположительно являются основной отличительной характеристикой эпитопа AGEN1884 на CTLA-4. При изучении последовательностей CTLA-4 человека и макака-крабода, обе из которых выражено связывают AGEN1884 (данные не показаны), обнаруживается практически полная идентичность последовательностей двух описанных выше областей, за исключением замены метионином лейцина в положении 141 (фиг. 14А). И напротив, AGEN1884 не связывается в какой-либо значимой степени ни с CTLA-4 мыши, ни с CTLA-4 крысы (данные не показаны), которые отличаются от CTLA-4 человека в остатках 140-143 (YLG I, SEQ ID NO: 34) в трех из четырех положений (фиг. 14А). Дополнительные данные о селективности показывают, что AGEN1884 связывается с высокой специфичностью с CTLA-4 человека и макака-крабода, но не с другими родственными представителями семейства CD28, включающими CD28, ICOS, BTLA и PD-1 (данные не показаны). Сравнение последовательностей указанных родственных белков показывает, что все не являющиеся CTLA-4 белки различаются в положениях остатков 140-143 (YLG I, SEQ ID NO: 34) (фиг. 14В), что дополнительно подтверждает важность указанного эпитопа для связывания AGEN1884.

Объем настоящего изобретения не ограничен специфическими вариантами реализации, описанными в настоящем документе. Так, различные модификации настоящего изобретения, помимо описанных, будут очевидны для специалистов в данной области техники после изучения приведенного выше описания и сопровождающих его чертежей. Предусмотрено включение таких модификаций в объем прилагаемой формулы изобретения.

Все источники (например, публикации, или патенты, или патентные заявки), упоминаемые в настоящем документе, включены в настоящий документ полностью и для любых целей посредством ссылок в той же степени, как если бы для каждого индивидуального источника (например, публикации, или патента, или патентной заявки) было конкретным и индивидуальным образом указано, что он полностью и для любых целей включен посредством ссылки.

Другие варианты реализации охвачены приведенной ниже формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 человека, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:

(a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10;

(b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SSSSSSYIYYAXSVKG (SEQ ID NO: 18), где X представляет собой E или D;

(c) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность VGLXGPFDI (SEQ ID NO: 19), где X представляет собой F или M;

(d) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

(e) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 и

(f) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и

где последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 антитела не являются последовательностями SEQ ID NO: 10, 11 и 13 соответственно.

2. Выделенное антитело по п.1, где:

(a) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;

(b) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 или

(c) CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10, 12, 14, 15, 16 и 17 соответственно.

3. Выделенное антитело по п.1, где антитело содержит:

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 4-8; и/или

(b) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и/или

(c) переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 9.

4. Выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 человека, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где указанные переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 9; 3 и 9; 4 и 9; 5 и 9; 6 и 9; 7 и 9 или 8 и 9 соответственно.

5. Выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 человека, где антитело содержит:

- (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 23, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 27;
- (b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 27;
- (c) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 25, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 27; или
- (d) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 26, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 27.

6. Выделенное антитело по любому из пп.1-5, где антитело содержит константную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂ человека.

7. Выделенное антитело по п.6, где:

(a) антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 28, 29, 30 и 31;

(b) аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит мутации S239D/I332E в соответствии с системой нумерации EU;

(c) аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит мутации S239D/A330L/I332E в соответствии с системой нумерации EU;

(d) аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит мутации L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L в соответствии с системой нумерации EU;

(e) константная область тяжелой цепи IgG₁ представляет собой афукозилированную область IgG₁ и/или

(f) N-концевой остаток аминокислоты вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи антитела был преобразован в пироглутамат.

8. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, где антитело содержит:

(a) константную область тяжелой цепи IgG человека, которая представляет собой вариант константной области тяжелой цепи IgG человека дикого типа, где указанный вариант константной области тяжелой цепи IgG человека связывается с FcγRIIIA с более высокой аффинностью, чем константная область тяжелой цепи IgG человека дикого типа связывается с FcγRIIIA;

(b) константную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из константной области легкой цепи каппа человека и константной области легкой цепи лямбда человека; и/или

(c) константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

9. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, где антитело:

(a) представляет собой антитело человека;

(b) является антагонистическим в отношении CTLA-4 человека;

(c) дезактивирует, уменьшает или ингибирует активность CTLA-4 человека;

(d) ингибирует связывание CTLA-4 человека с CD80 человека или CD86 человека и/или

(e) индуцирует продукцию IL-2 мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC), стимулированными стафилококковым энтеротоксином А (SEA).

10. Выделенное биспецифическое антитело, отличающееся тем, что содержит антитело по любому из предшествующих пунктов.

11. Конъюгат, содержащий выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 человека, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:

(a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10;

(b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SSSSSSYIYYAXSVKG (SEQ ID NO: 18), где X представляет собой E или D;

(c) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность VGLXGPFDI (SEQ ID NO: 19), где X представляет собой F или M;

(d) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

(e) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 и

(f) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17,

и где последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 антитела не являются последовательностями SEQ ID NO: 10, 11 и 13 соответственно;

где антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом, цитостатическим агентом, токсином, радионуклидом или детектируемой меткой.

12. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из предшествующих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

13. Выделенный полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи по любому из пп.1-10.

14. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п.13.

15. Выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую и легкую цепи антитела по любому из пп.1-10.

16. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п.15.

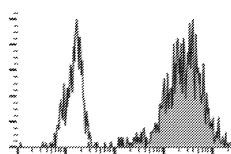
17. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая первый полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи антитела по любому из пп.1-10, и второй полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи антитела по любому из пп.1-10.

18. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая первый полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела по любому из пп.1-10, и второй полинуклеотид, кодирующий легкую цепь антитела по любому из пп.1-10.

19. Способ получения антитела, которое специфически связывается с CTLA-4 человека, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из пп.14 или 16-18, так что происходит экспрессия полинуклеотида и продукция антитела.

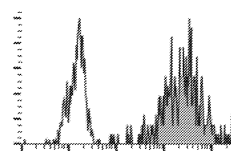
20. Способ усиления активации Т-клеток в ответ на антиген у индивида, где способ включает введение пациенту эффективного количества антитела по любому из пп.1-10 или фармацевтической композиции по п.12.

21. Способ лечения злокачественного новообразования у индивида, где способ включает введение индивиду эффективного количества антитела по любому из пп.1-10 или фармацевтической композиции по п.12, где злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из В-клеточной лимфомы, базальноклеточной карциномы, рака мочевого пузыря, бластомы, метастазов в мозг, рака груди, лимфомы Беркитта, рака шейки матки, рака толстой кишки, колоректального рака, плоскоклеточного рака кожи, рака эндометрия, рака пищевода, саркомы Юинга, фолликулярной лимфомы, рака желудка, карциномы гастроэзофагеального соединения, рака желудочно-кишечного тракта, глиобластомы, глиомы, рака головы и шеи, метастазов в печени, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, рака почки, рака гортани, лейкоза, рака печени, мелкоклеточного рака легких, немелкоклеточного рака легкого, лимфобластной лимфомы, лимфомы, лимфомы из мантийных клеток, рака с метастазами, миеломы, нейробластомы, меланомы глаза, рака ротоглотки, остеосаркомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака простаты, метастатического гормонально-рефрактерного рака, почечно-клеточной карциномы, карциномы слюнных желез, саркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, солидной опухоли, плоскоклеточной клеточной карциномы, синовиальной саркомы, рака яичек, рака щитовидной железы, переходноклеточного рака, увеальной меланомы, веррукозной карциномы, рака вульвы и макроглобулинемии Вальденстрема.



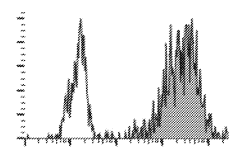
□ Изотип (IgG1)
 □ AGEN1884.H1.1

Фиг. 1А



□ Изотип (IgG1)
 □ AGEN1884.H1.2

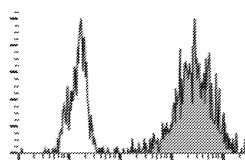
Фиг. 1В



□ Изотип (IgG1)
 □ AGEN1884.H1.3

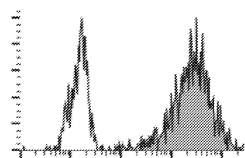
Фиг. 1С

044966



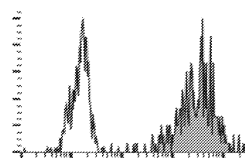
□ Изотип (IgG1)
■ AGEN1884.H2.1

Фиг. 1D



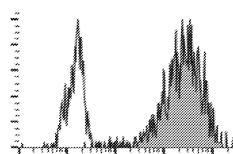
□ Изотип (IgG1)
■ AGEN1884.H2.2

Фиг. 1E



□ Изотип (IgG1)
■ AGEN1884.H2.3

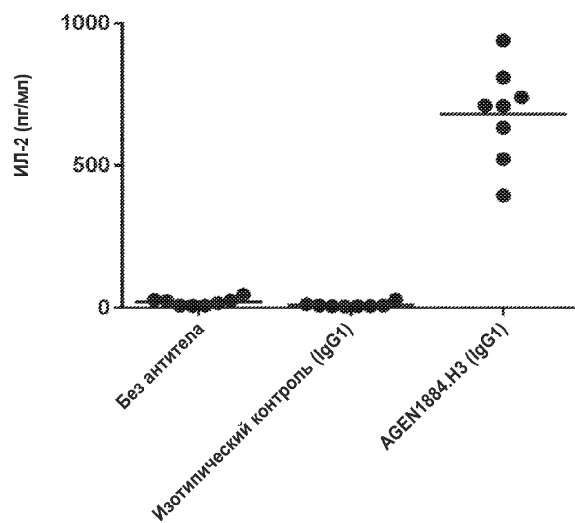
Фиг. 1F



□ Изотип (IgG1)
■ AGEN1884.H3

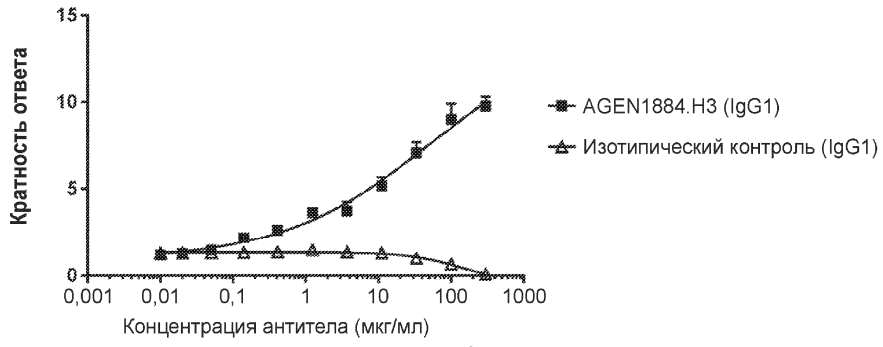
Фиг. 1G

Анализ с SEA



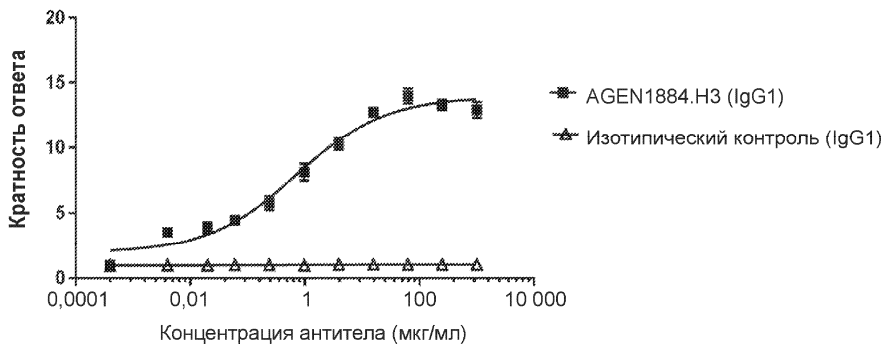
Фиг. 2

ИЛ-2-люциферазный репортерный анализ

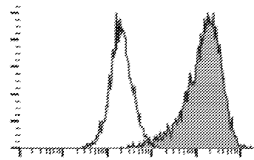


Фиг. 3

FcγRIIIA-репортерный анализ

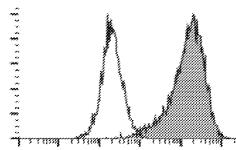


Фиг. 4



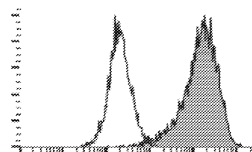
□ Изотип (IgG1)
 □ AGEN1884.H3 (IgG1)

Фиг. 5A



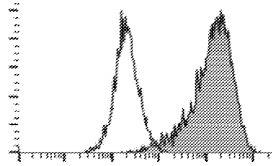
□ Изотип (IgG1)
 □ AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/I332E)

Фиг. 5B



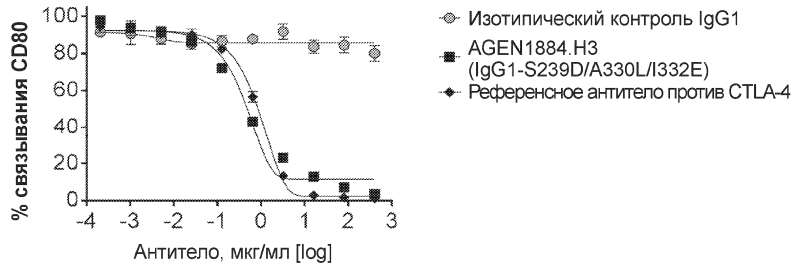
□ Изотип (IgG1)
 □ AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E)

Фиг. 5C

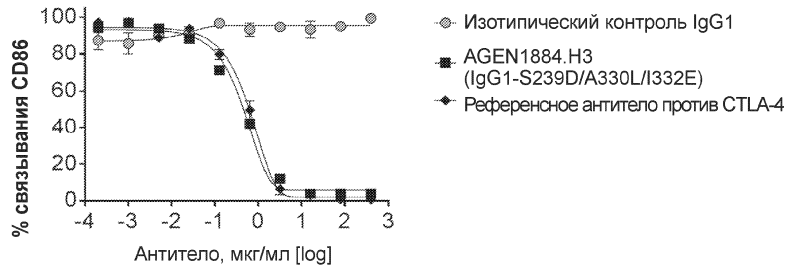


- Изотип (IgG1)
- AGEN1884.H3 (IgG1 L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L)

Фиг. 5D

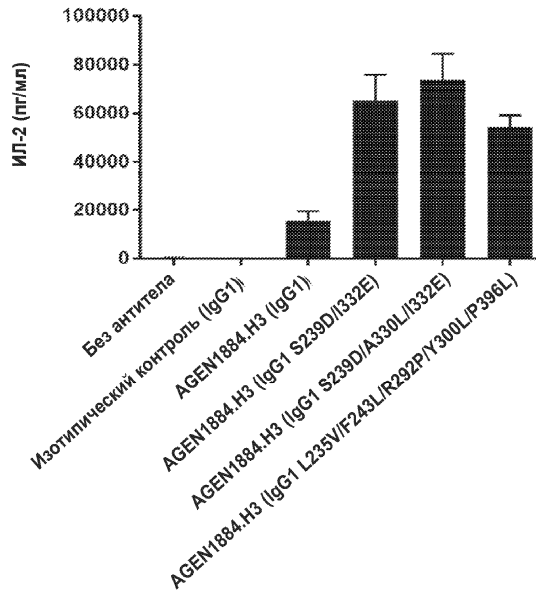


Фиг. 6А

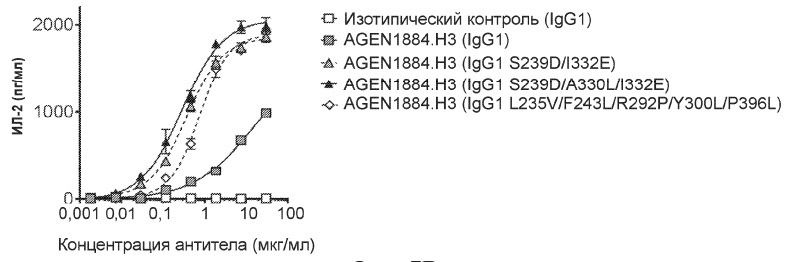


Фиг. 6В

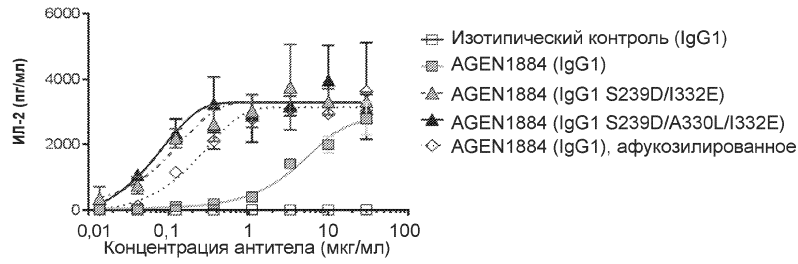
Анализ с SEA



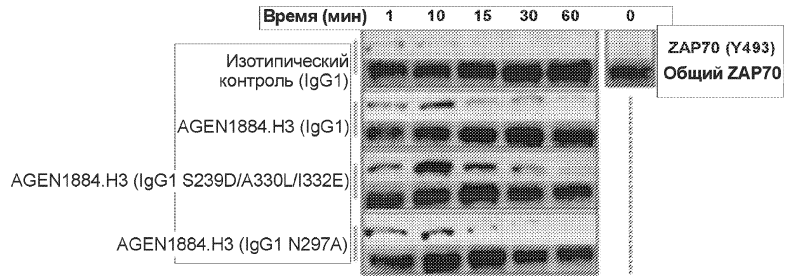
Фиг. 7А



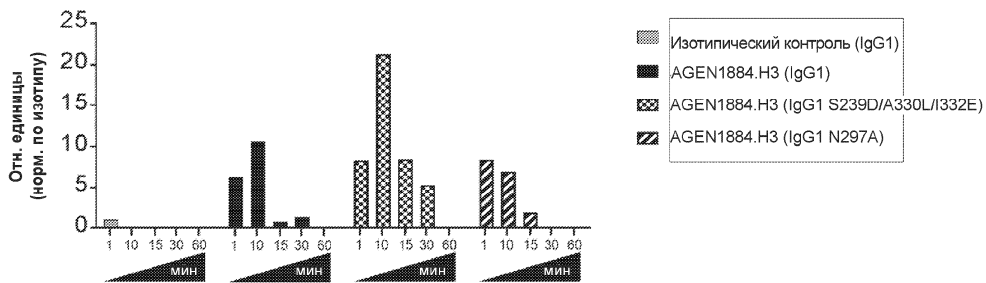
Фиг. 7В



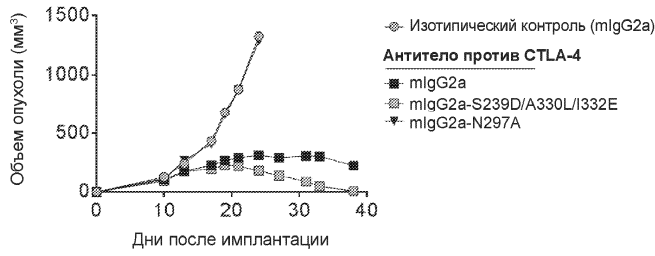
Фиг. 7С



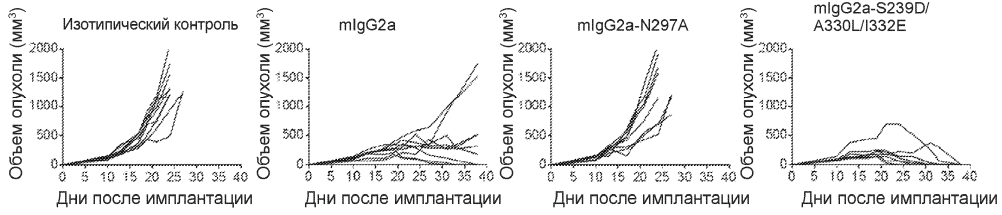
Фиг. 8А



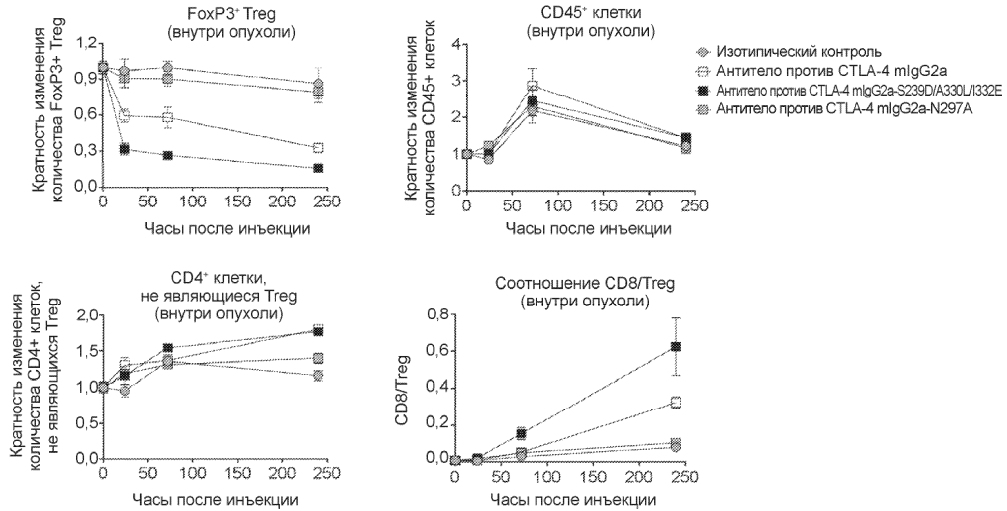
Фиг. 8В



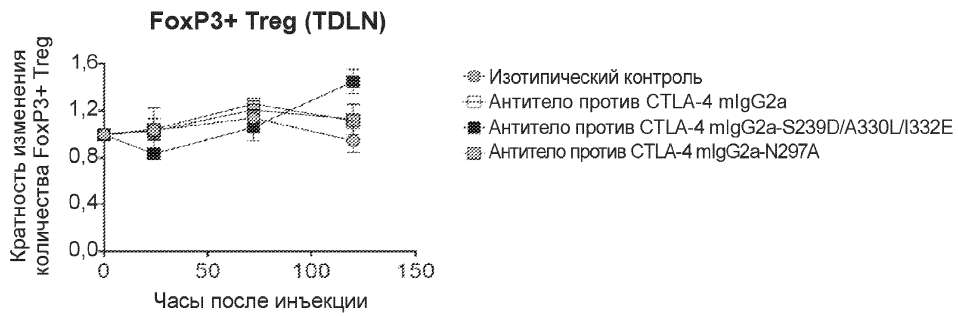
Антитело против CTLA-4



Фиг. 9А

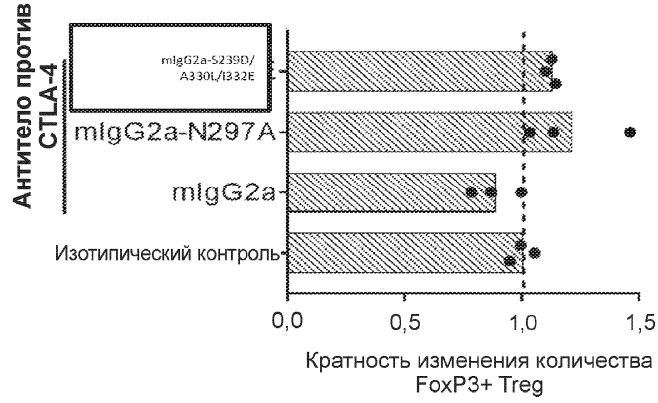


Фиг. 9В

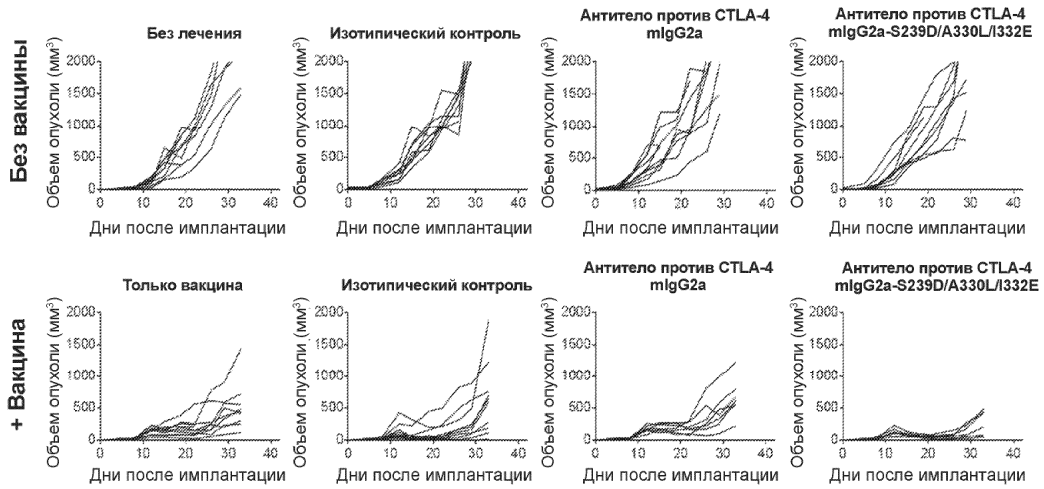


Фиг. 9С

FoxP3+ Treg (Селезеночные)

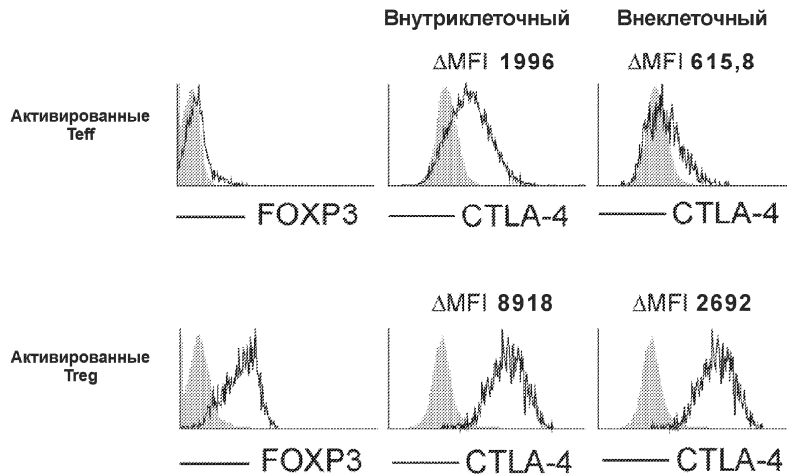


Фиг. 9D

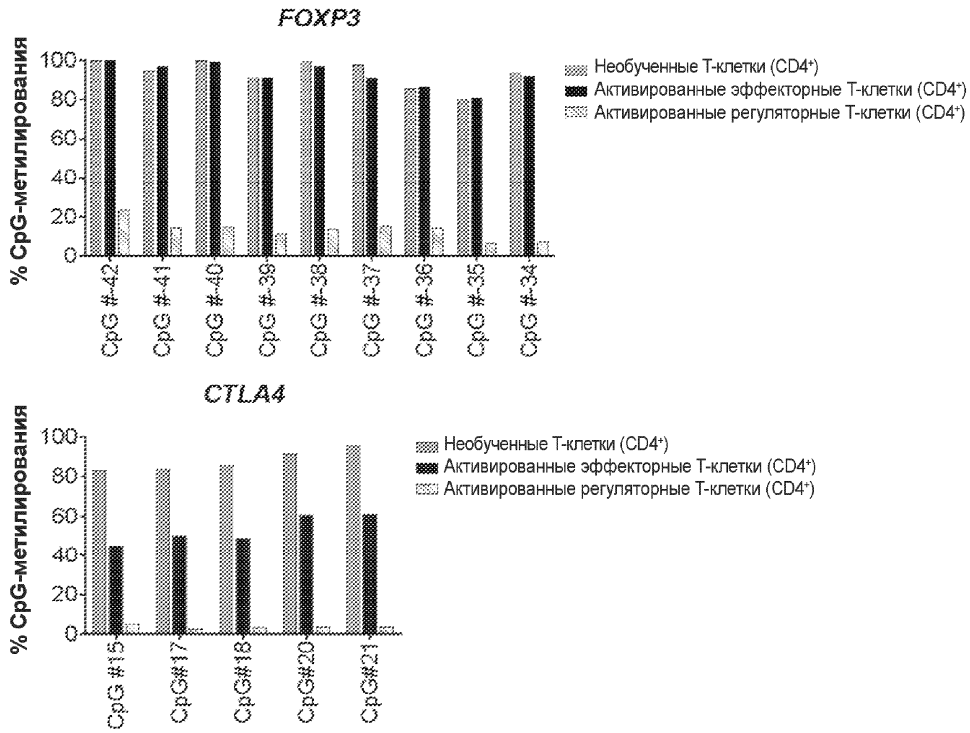


Фиг. 10

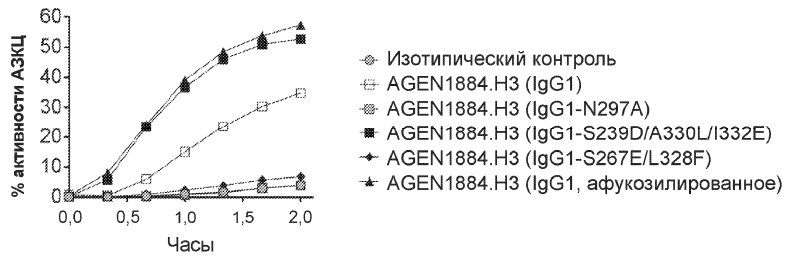
CTLA-4



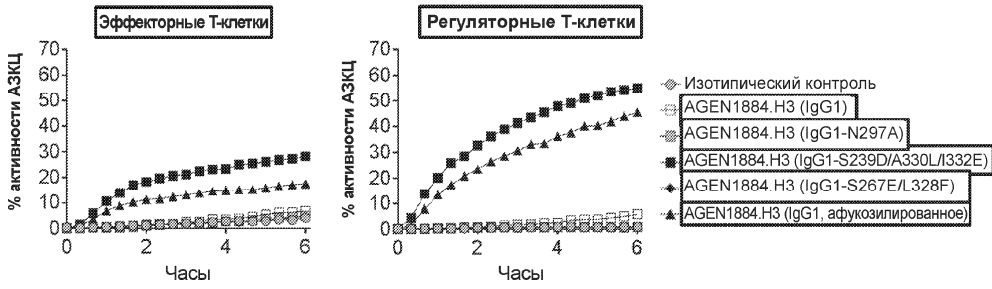
Фиг. 11A



Фиг. 11В



Фиг. 12А



Фиг. 12В


```

SP|P16410|CTLA4_ЧЕЛОВЕК      -NGTQIYVIDP-----EPCPDS-----DFLLWILAAVSSGLFFYSPLLTAVSL--S-KML 190
TR|G7PL88|C7PL88_МАКАК-КРАВОЕД -NGTQIYVIDP-----EPCPDS-----DFLLWILAAVSSGLFFYSPLLTAVSL--S-KML 190
SP|P10747|CD28_ЧЕЛОВЕК      SNGTIIHVKGK-----HLCPSPLFPGPSKPFVWLVVVGGVLACYSLVTVAFI--IFWVR 180
SP|Q9Y6W8|ICOS_ЧЕЛОВЕК      --GGYLHIYES-----QLCCQL-----KFWLPIGCAA---FVVVCILGCIL--ICWLT 165
SP|Q7Z6A9|BTLA_ЧЕЛОВЕК      SHSTTLVYVTDVKSASERPSKDEMASR-PWLLYRLLPLGG----LPLLIITTCFCLFCCLRR 180
SP|Q15116|PDCD1_ЧЕЛОВЕК     VTERRAEVPTA-----HPSPSPRPAG-QFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAV--ICSRA 195

```

```

SP|P16410|CTLA4_ЧЕЛОВЕК      KKRSP----LTTGVYVKMPPE-----PEC-EKQFQPYFIPIN----- 223
TR|G7PL88|C7PL88_МАКАК-КРАВОЕД KKRSP----LTTGVYVKMPPE-----PEC-EKQFQPYFIPIN----- 223
SP|P10747|CD28_ЧЕЛОВЕК      SKRSR----LLHSDYMNMTPRR-----PGPTRKHYQPYAPPRD--FAAYRS----- 220
SP|Q9Y6W8|ICOS_ЧЕЛОВЕК      KKKYSSSVHDPNGEYMFMRVAVN-----TAKKSRLTDVTL----- 199
SP|Q7Z6A9|BTLA_ЧЕЛОВЕК      HQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGS 240
SP|Q15116|PDCD1_ЧЕЛОВЕК     ARG-----TIG-----ARR-----TGQP-LKEDPSAVPVF--SVDYGELDFQWREKT 234

```

```

SP|P16410|CTLA4_ЧЕЛОВЕК      -----
TR|G7PL88|C7PL88_МАКАК-КРАВОЕД -----
SP|P10747|CD28_ЧЕЛОВЕК      -----
SP|Q9Y6W8|ICOS_ЧЕЛОВЕК      -----
SP|Q7Z6A9|BTLA_ЧЕЛОВЕК      EYYSNFCLEENKP--GIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASI-----CVRS- 289
SP|Q15116|PDCD1_ЧЕЛОВЕК     PEPPVPCVPEQTEYATIVFP----SGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL 288

```

Фиг. 14С



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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