

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047131**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- |  |   |
|--|---|
| (45) Дата публикации и выдачи патента<br><b>2024.06.05</b> | (51) Int. Cl. <i>C07K 16/28</i> (2006.01)<br><i>C07K 16/22</i> (2006.01)<br><i>A61K 47/68</i> (2017.01)<br><i>A61P 35/00</i> (2006.01)<br><i>G01N 33/574</i> (2006.01)<br><i>A61K 39/00</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки<br><b>202191187</b>                      |   |
| (22) Дата подачи заявки<br><b>2019.10.25</b>               |   |

---

(54) **АНТИТЕЛА К СТЛА4, ФРАГМЕНТЫ АНТИТЕЛ, ИХ ИММУНОКОНЪЮГАТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

- |  |  |
|--|--|
| (31) <b>62/753,498; 62/798,234; 62/803,060;<br/>62/822,971; 62/823,992; 62/824,014</b> | (56) US-B1-6984720<br>US-A1-20140105914<br>WO-A1-2016196237<br>CN-A-104292334<br>WO-A2-2009131702<br>US-A1-20180186863 |
| (32) <b>2018.10.31; 2019.01.29; 2019.02.08;<br/>2019.03.24; 2019.03.26; 2019.03.26</b> |  |
| (33) <b>US</b>   |  |
| (43) <b>2021.10.27</b>   |  |
| (86) <b>PCT/US2019/058066</b>  |  |
| (87) <b>WO 2020/092155 2020.05.07</b>  |  |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:<br><b>БАЙОАТЛА, ИНК. (US)</b>                    |  |
| (72) Изобретатель:<br><b>Шорт Джей М., Фрей Герхард, Чан<br/>Хвай Вэнь (US)</b>        |  |
| (74) Представитель:<br><b>Фелицына С.Б. (RU)</b>                                       |  |

- 
- (57) В изобретении представлен полипептид, имеющий вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи, который специфически связывается с белком СТЛА4, а также антитела и фрагменты антител, содержащие вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи, которые связываются с белком СТЛА4. Также предложены фармацевтические композиции и наборы, содержащие полипептид или антитела и фрагменты антител, содержащие полипептид.

**B1**

**047131**

**047131**  
**B1**

### Область техники

Это описание относится к антителам к CTLA4, фрагментам антител и иммуноконъюгатам таких антител и фрагментов антител, а также к применению антител, фрагментов антител и иммуноконъюгатов в диагностических и терапевтических способах.

### Уровень техники

Иммунная система позвоночных требует множества сигналов для достижения оптимальной иммунной активации; см., например, Janeway, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 54:1-14 (1989); Paul William E., ed. Raven Press, N.Y., Fundamental Immunology, 4<sup>th</sup> edition (1998), особенно главы 12 и 13, страницы с 411 по 478. Для активации иммунной системы необходимы взаимодействия между Т-лимфоцитами (Т-клетками) и антигенпрезентирующими клетками (АПК). Уровни многих когезионных молекул, обнаруженных на Т-клетках и АПК, повышаются во время активации иммунной системы (Springer et al., A. Rev. Immunol., 5:223-252 (1987); Shaw and Shimuzu, Current Opinion in Immunology, Eds. Kindt and Long. 1:92-97 (1988)); и Hemler, Immunology Today, 9:109-113 (1988)). Повышенные уровни этих молекул могут помочь объяснить, почему активированные АПК более эффективны при стимуляции пролиферации антигенспецифических Т-клеток, чем АПК в состоянии покоя (Kaiuchi et al., J. Immunol., 131:109-114 (1983); Kreiger et al., J. Immunol., 135:2937-2945 (1985); McKenzie, J. Immunol., 141:2907-2911 (1988) и Nawrylowicz and Unanue, J. Immunol., 141:4083-4088 (1988)).

Т-клеточный иммунный ответ представляет собой сложный процесс, который включает межклеточные взаимодействия (Springer et al., A. Rev. Immunol., 5: 223-252 (1987)), особенно между Т-клетками и А-клетками, такими как АПК, а также синтез растворимых иммунных медиаторов (цитокинов или лимфокинов) (Dinarello, New Engl. Jour. Med., 317:940-945 (1987); Sallusto, J. Exp. Med., 179:1109-1118 (1997)). Иммунный ответ регулируется несколькими рецепторами на поверхности Т-клеток, включая комплекс рецепторов Т-клеток (Weiss, Ann. Rev. Immunol., 4:593-619 (1986)) и другими "вспомогательными" поверхностными молекулами (Allison, Curr. Opin. Immunol., 6:414-419 (1994); Springer (1987) выше). Многие из этих вспомогательных молекул представляют собой природные антигены дифференцировки на поверхности клетки, определяемые реактивностью моноклональных антител на поверхности клеток (McMichael, Ed., Leukocyte Typing III, Oxford Univ. Press, Oxford, N.Y. (1987)).

CTLA4 представляет собой молекулу на поверхности Т-клеток, которая была первоначально идентифицирована путем дифференциального скрининга библиотеки кДНК цитолитических Т-клеток мыши (Brunet et al., Nature 328:267-270 (1987)). CTLA4 также является членом суперсемейства иммуноглобулинов (Ig). CTLA4 содержит единственный внеклеточный домен Ig. Транскрипты CTLA4 были обнаружены в популяциях Т-клеток, обладающих цитотоксической активностью, что позволяет предположить, что CTLA4 может функционировать в цитолитическом ответе (Brunet et al., выше; Brunet et al., Immunol. Rev., 103:21-36 (1988)). Исследователи сообщили о клонировании и картировании гена человеческого аналога CTLA4 (Dariavach et al., Eur. J. Immunol., 18:1901-1905 (1988)) к той же хромосомной области (2d,33-34), что и CD28 (Lafage-Pochitaloff et al., Immuno genetics 31:198-201 (1990)). Сравнение последовательностей этой ДНК CTLA4 человека и ДНК, кодирующей белки CD28, демонстрирует значительную гомологию последовательностей с наибольшей степенью гомологии в прилегающих к мембране и цитоплазматических областях (Brunet et al., 1988, выше; Dariavach et al., 1988, выше).

Некоторые исследования предполагают, что CTLA4 выполняет аналогичную функцию в качестве вторичного ко-стимулятора (Linsley et al., J. Exp. Med., 176:1595-1604 (1992); Wu et al., J. Exp. Med., 185:1327-1335 (1997) и патенты США №№ 5977318; 5968510; 5885796; и 5885579). Однако другие сообщили, что CTLA4 играет противоположную роль в качестве подавителя активации Т-клеток (Krummel, J. Exp. Med., 182:459-465 (1995); Krummel et al., Int'l Immunol., 8:519-523 (1996); Chambers et al., Immunity, 7:885-895 (1997)). Сообщалось, что мыши с дефицитом CTLA4 страдают от массивной лимфолифляции (Chambers et al., выше). Также сообщалось, что блокада CTLA4 усиливает Т-клеточные ответы *in vitro* (Walunas et al., Immunity, 1:405-413 (1994)) и *in vivo* ((Kearney, J. Immunol., 155:1032-1036 (1995)), усиливает противоопухолевый иммунитет (Leach, Science, 271:1734-1736 (1996)), и усиливает индуцированное аутоиммунное заболевание (Luhder, J. Exp. Med., 187:427-432 (1998)). Также сообщалось, что CTLA4 имеет альтернативное или дополнительное влияние на начальные характеристики Т-клеточного иммунного ответа (Chambers, Curr. Opin. Immunol., 9:396:404 (1997); Bluestone, J. Immunol., 158:1989-1993 (1997); Thompson, Immunity, 7:445-450 (1997)). Это согласуется с наблюдением, что у некоторых аутоиммунных пациентов есть аутоантитела к CTLA4. Возможно, что антитела, блокирующие CTLA4, играют патогенетическую роль у этих пациентов (Matsui, J. Immunol., 162:4328-4335 (1999)).

Было показано, что CTLA4 отрицательно регулирует активацию иммунной системы посредством внутренних и внешних механизмов; см. Grosso and Kunkel, Cancer Immunity, 13:5 (2013). В частности: (i) обратный сигналинг через CD80 и CD86 на АПК приводит к подавлению Т-клеточных ответов и/или способствует превращению наивных Т-клеток в регуляторные Т-клетки, (ii) сигналинг через CTLA3 стимулирует выработку регуляторных цитокинов, таких как TGF- $\beta$ , что приводит к ингибированию презентации антигена при помощи АПК и ингибированию функции Т-клеток, (iii) связывание CTLA4 с CD80/CD86 снижает доступность этих лигандов для связывания CD28, что приводит к снижению активации Т-клеток при помощи АПК, (iv) связывание CTLA4 с CD80/CD86 вызывает их трансэндоцитоз,

снижая способность АПК активировать Т-клетки, (v) CTLA4 рекрутирует ингибирующие белки, такие как PP2A и PTPN11, в синапс Т-клеток, ингибируя сигналинг через CD28 и ТКР, (vi) CTLA4 действует как конкурент с высокой аффинностью, занимая CD80/86 и тем самым предотвращая связывание CD28, (vii) растворимый сплайс-вариант CTLA4 может быть способен ингибировать активацию Т-клеток, и (viii) CTLA4 ингибирует стоп-сигнал Т-клеток, что важно для активации Т-клеток при помощи АПК.

Таким образом, было показано, что ингибирование CTLA4 способствует стимуляции адаптивного иммунного ответа и активации Т-клеток. Было показано, что антитела, блокирующие CTLA4, эффективны на мышинных моделях злокачественного новообразования, а антитела к CTLA4, такие как ипилимумаб (WO 2001/014424) и тремелиумаб, исследуются в качестве стратегий повышения противоопухолевого иммунитета при злокачественном новообразовании. Блокада CTLA4 также является многообещающей терапевтической стратегией при расстройствах, связанных с истощением Т-клеток, таких как хроническая вирусная инфекция.

Ранее были разработаны антитела к CTLA4. В патенте США № 9758583 описаны антитела или фрагменты антител, которые, как утверждается, связываются с одним или обоими CTLA4 человека и мыши, которые могут быть включены в композиции для лечения злокачественного новообразования. Сообщается также, что некоторые из антител или фрагментов антител необязательно ингибируют или предотвращают взаимодействие или функциональную ассоциацию между человеческим CTLA4 и человеческим CD80 или CD86, или между мышинным CTLA4 и мышинным CD80 или CD86. Такое ингибирование или предотвращение взаимодействия или функциональной ассоциации между CTLA4 и CD80 или CD86 может ингибировать или предотвращать опосредованную CD80 или CD86 активацию CTLA4, сигналинг CD80/CTLA4 или сигналинг CD86/CTLA4.

В US 2009/0252741 также описаны моноклональные антитела, которые связываются с CTLA4 человека. Утверждается, что эти антитела к CTLA4 вызывают защиту от злокачественного новообразования, а также демонстрируют некоторые аутоиммунные побочные эффекты. Антитело, которое индуцировало самую сильную защиту от злокачественного новообразования, также вызывало наименьшие аутоиммунные побочные эффекты. В US 2009/0252741 также предложен способ выбора оптимальных антител к CTLA4 или других терапевтических агентов с наиболее желательным балансом между защитой от злокачественного новообразования и аутоиммунными побочными эффектами.

В US 2016/0237154 описаны композиции и способы, относящиеся к или полученные из антител или фрагментов антител к CTLA4. Антитела к CTLA4 и фрагменты антител могут блокировать связывание CTLA4 человека с B7 человека и, таким образом, считаются подходящими для лечения злокачественных новообразований предстательной железы, почек, толстой кишки, легкого или молочной железы; патогенных инфекций; заболеваний, связанных с центральной нервной системой, например, амилоидогенных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера; и заболевания с воспалительными или аллергическими компонентами, такими как болезнь "трансплантат против хозяина", болезнь "хозяин против трансплантата", аллергии, аутоиммунные заболевания и другие воспалительные заболевания.

Хотя антитела к CTLA4 известны и коммерчески доступны, желательно найти улучшенные антитела к CTLA4, которые подходят для терапии злокачественного новообразования с уменьшенными или минимальными побочными эффектами. Настоящее изобретение относится к антителам к CTLA4 или фрагментам антител, которые подходят для применения в терапевтических и диагностических целях, особенно для диагностики и лечения злокачественного новообразования. Некоторые из этих антител к CTLA4 или фрагментов антител могут иметь более высокую аффинность связывания с CTLA4 в опухоли по сравнению с CTLA4, присутствующим в нормальной ткани. Эти антитела к CTLA4 или фрагменты антител, как правило, обладают по меньшей мере сравнимой эффективностью с известными антителами или фрагментами антител к CTLA4. Кроме того, настоящие антитела к CTLA4 или их фрагменты могут проявлять уменьшенные побочные эффекты по сравнению с моноклональными антителами к CTLA4, известными в данной области техники. Эти преимущества могут обеспечить более селективное лечение в отношении CTLA4 в опухоли и могут позволить использовать более высокие дозы этих антител к CTLA4 или фрагментов антител в результате селективности в отношении CTLA4 в опухоли, в результате чего могут быть реализованы более эффективные терапевтические способы лечения, без соответствующего увеличения нежелательных побочных эффектов.

#### Сущность изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенным полипептидам вариабельной области тяжелой цепи, которые специфически связываются с белком CTLA4. Эти полипептиды содержат три определяющие комплементарности области, имеющие последовательности H1, H2 и H3, при этом:

последовательность H1 представляет собой GFTFSHYTMH (SEQ ID NO: 1);

последовательность H2 представляет собой FIX<sub>1</sub>YX<sub>2</sub>GNX<sub>3</sub>KX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>AX<sub>6</sub>SX<sub>7</sub>KG (SEQ ID NO: 2);

последовательность H3 представляет собой TGWLGPFDX<sub>8</sub> (SEQ ID NO: 3);

где X<sub>1</sub> представляет собой S или D; X<sub>2</sub> представляет собой D, H или I, X<sub>3</sub> представляет собой N или Y; X<sub>4</sub> представляет собой Y или I; X<sub>5</sub> представляет собой Y или E; X<sub>6</sub> представляет собой D или K; X<sub>7</sub> представляет собой V или M; а X<sub>8</sub> представляет собой Y или I.

В другом аспекте настоящее изобретение включает продукт, образованный комбинацией любого из описанных выше выделенных полипептидов вариабельной области тяжелой цепи с выделенным полипептидом вариабельной области легкой цепи, выбранным из выделенных полипептидов вариабельной области легкой цепи, которые содержат три определяющие комплементарность области, имеющие последовательности L1, L2 и L3, причем

последовательность L1 представляет собой  $RX_9SQX_{10}X_{11}GSSYLA$  (SEQ ID NO: 4);

последовательность L2 представляет собой  $GAFSRATGX_{12}$  (SEQ ID NO: 5);

последовательность L3 представляет собой  $QQDGSSPWT$  (SEQ ID NO: 6),

где  $X_9$  представляет собой A или I;  $X_{10}$  представляет собой Y, S или H;  $X_{11}$  представляет собой V или G;  $X_{12}$  представляет собой V или I.

В каждом из предшествующих вариантов осуществления последовательность H2 может быть выбрана из

FIDYHGNNKYYADSVKG, FISYDGNNKIYADSVKG,  
FISYDGNNKYYADSVKG, FISYDGNYKYYADSVKG, FISYDGNYKYYAKSVKG,  
FISYHGNNKYEADSVKG, FISYHGNNKYYADSVKG, FISYIGNYKYYADSMKG, и  
FISYIGNYKYYADSVKG.

В каждом из предшествующих вариантов осуществления последовательность H3 может быть выбрана из TGWLGPFDY и TGWLGPFDI.

В каждом из предшествующих вариантов осуществления последовательность L1 может быть выбрана из RASQHVGSYLA, RASQSVGSYLA, RASQYVGSYLA, RASQYVGSYLA, и RISQYVGSYLA.

В каждом из предшествующих вариантов осуществления последовательность L2 может быть выбрана из GAFSRATGI и GAFSRATGV.

В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид вариабельной области тяжелой цепи может иметь последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, и 38. В каждом из этих вариантов осуществления выделенный полипептид вариабельной области легкой цепи может иметь последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35 и 37.

В одном варианте осуществления антитело содержит полипептид вариабельной области легкой цепи и полипептид вариабельной области тяжелой цепи, имеющие пару последовательностей, выбранных из пар: SEQ ID NO: 7 и 8, SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 13 и 14, SEQ ID NO: 15 и 16, SEQ ID NO: 17 и 18, SEQ ID NO: 19 и 20, SEQ ID NO: 21 и 22, SEQ ID NO: 23 и 24, SEQ ID NO: 25 и 26, SEQ ID NO: 27 и 28, SEQ ID NO: 29 и 30, SEQ ID NO: 31 и 32, SEQ ID NO: 33 и 34, SEQ ID NO: 35 и 36, и SEQ ID NO: 37 и 38.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает антитело к CTLA4 или фрагмент антитела, которое содержит любой из выделенных полипептидов вариабельной области тяжелой цепи по изобретению, описанных выше.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает антитело или фрагмент антитела к CTLA4, которое содержит комбинацию любого из выделенных полипептидов вариабельной области тяжелой цепи по изобретению, описанных выше, с любым из выделенных полипептидов вариабельной области легкой цепи по изобретению, описанных выше.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает иммуноконъюгат, который содержит любое из антител или фрагментов антител по изобретению, описанных выше. В иммуноконъюгате антитело или фрагмент антитела можно конъюгировать с агентом, выбранным из химиотерапевтического агента, радиоактивного атома, цитостатического агента и цитотоксического агента.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, которая содержит любой из полипептидов, антител, фрагментов антител и иммуноконъюгатов по изобретению, описанных выше, вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Единичная доза фармацевтической композиции может содержать количество полипептида, антитела, фрагмента антитела или иммуноконъюгата в около 135 мг, около 235 мг, около 335 мг, около 435 мг, около 535 мг, около 635 мг, около 735 мг, около 835 мг, около 935 мг, около 1035 мг, около 1135 мг, около 1235 мг или около 1387 мг.

Единичная доза фармацевтической композиции может содержать количество полипептида, антитела, фрагмента антитела или иммуноконъюгата в диапазоне 135-1387 мг, 135-235 мг, 235-335 мг, 335-435 мг, 435-535 мг, 535-635 мг, 635-735 мг, 735-835 мг, 835-935 мг, 935-1035 мг, 1035-1135 мг, 1135-1235 мг или 1235-1387 мг.

Каждая из вышеуказанных фармацевтических композиций может дополнительно содержать молекулу ингибитора иммунной контрольной точки, которая отличается от полипептида или антитела, или фрагмента антитела. Молекула ингибитора иммунной контрольной точки может представлять собой ан-

титело или фрагмент антитела против иммунной контрольной точки. Иммунная контрольная точка может быть выбрана из

LAG3, TIM3, TIGIT, VISTA, BTLA, OX40, CD40, 4-1BB, PD-1, PD-L1, GITR, B7-H3, B7-

H4, KIR, A2aR, CD27, CD70, DR3 и ICOS,

или иммунная контрольная точка может представлять собой PD-1 или PD-L1.

Каждая из вышеуказанных фармацевтических композиций может дополнительно содержать антитело или фрагмент антитела против антигена, выбранного из PD1, PD-L1, AXL, ROR2, CD3, HER2, B7-H3, ROR1, SFRP4 и белка WNT. Белок WNT может быть выбран из

WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A,

WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11 и WNT16.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает набор для диагностики или лечения, содержащий любой из полипептидов, антител, фрагментов антител или иммуноконъюгатов по настоящему изобретению, описанных выше.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает антитело к CTLA4, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем переменная область тяжелой цепи содержит три определяющие комплементарности области, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 39-41, и переменная область легкой цепи содержит три определяющие комплементарности области, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 42-44.

В предшествующем варианте осуществления переменная область тяжелой цепи может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, а переменная область легкой цепи может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 показано выравнивание последовательностей иллюстративных переменных областей тяжелой цепи антител к CTLA4 по настоящему изобретению.

На фиг. 2 показано выравнивание последовательностей иллюстративных переменных областей легкой цепи антител к CTLA4 по настоящему изобретению.

На фиг. 3А показано сравнение связывающей активности с CTLA4 человека при pH 6,0 двух из антител к CTLA4 настоящего изобретения с ипилимумабом и аналогом ипилимумаба (ипи-аналог), как измерено при помощи иммуноферментного анализа (ИФА).

На фиг. 3В показано сравнение связывающей активности с CTLA4 человека при pH 7,4 для двух антител к CTLA4 по настоящему изобретению, приведенных на фиг. 3А, с ипилимумабом и аналогом ипилимумаба (ипи-аналог), как измерено при помощи ИФА.

На фиг. 4А показано сравнение связывающей активности с CTLA4 яванского макака при pH 6,0 для двух антител к CTLA4 по настоящему изобретению, приведенных на фиг. 3А, с ипилимумабом и аналогом ипилимумаба (ипи-аналог), как измерено при помощи ИФА.

На фиг. 4В показано сравнение связывающей активности с CTLA4 яванского макака при pH 7,4 для двух антител к CTLA4 по настоящему изобретению, приведенных на фиг. 3А, с ипилимумабом и аналогом ипилимумаба (ипи-аналог), как измерено при помощи ИФА.

На фиг. 5 показано сравнение pH-зависимой связывающей активности с CTLA4 человека для двух антител к CTLA4 по настоящему изобретению, приведенных на фиг. 3А, с ипилимумабом и аналогом ипилимумаба (ипи-аналог).

На фиг. 6А показано сравнение полумаксимальной эффективной концентрации (ЭК<sub>50</sub>) и связывающей активности с CTLA4 человека при pH 6,0 для двух антител к CTLA4 по настоящему изобретению, приведенных на фиг. 3А, с ипилимумабом и аналогом ипилимумаба (ипи-аналог) как измерено при помощи проточной цитометрии (FACS) с использованием клеток CHO.

На фиг. 6В показано сравнение (ЭК<sub>50</sub>) и связывающей активности с CTLA4 человека при pH 7,4 для двух антител к CTLA4 по настоящему изобретению, приведенных на фиг. 3А, с ипилимумабом и аналогом ипилимумаба (ипи-аналог), измеренные при помощи ИФА с использованием клеток CHO.

На фиг. 7А показано сравнение (ЭК<sub>50</sub>) и связывающей активности CTLA4 яванского макака при pH 6,0 для двух антител к CTLA4 по настоящему изобретению, приведенных на фиг. 3А, с ипилимумабом и аналогом ипилимумаба (ипи-аналог), как измерено при помощи проточной цитометрии (FACS) с использованием клеток CHO.

На фиг. 7В показано сравнение (ЭК<sub>50</sub>) и связывающей активности с CTLA4 яванского макака при pH 7,4 для двух антител к CTLA4 по настоящему изобретению, приведенных на фиг. 3А, с ипилимумабом и аналогом ипилимумаба (ипи-аналог), как измерено при помощи ИФА с использованием клеток CHO.

На фиг. 8А показано сравнение (ЭК<sub>50</sub>) и активности связывания с CTLA4 человека при pH 7,4 антителами к CTLA4 по настоящему изобретению, приведенными на фиг. 3А, с ипи-аналогом, как измерено при помощи проточной цитометрии.

На фиг. 8В показано сравнение ( $ЭК_{50}$ ) и насыщение CTLA4 яванского макака при pH 7,4 антителами к CTLA4 по настоящему изобретению, показанными на фиг. 3А, с ипи-аналогом, как измерено при помощи проточной цитометрии.

На фиг. 9А-9F показана связывающая активность показанных на фиг. 3А антител к CTLA4 по настоящему изобретению с CTLA4 человека при pH 6,0 или pH 7,4, а также при pH 6,0 или pH 7,4 в присутствии различных буферов, как измерено при помощи ИФА.

На фиг. 10А-10F показана связывающая активность показанных на фиг. 3А антител к CTLA4 по настоящему изобретению с CTLA4 человека при pH 6,0 или pH 7,4, а также при pH 6,0 или pH 7,4 в присутствии различных буферов, как измерено при помощи проточной цитометрии.

На фиг. 11А показано сравнение активности показанных на фиг. 3А антител к CTLA4 по настоящему изобретению с ипилимумабом, аналогом ипилимумаба (ипи-аналогом), контролем IgG и аналогом Nivo в блокировании секреции ИЛ-2 в культурах мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) при pH 6,2.

На фиг. 11В показано сравнение активности показанных на фиг. 3А антител к CTLA4 по настоящему изобретению с ипилимумабом, аналогом ипилимумаба (ипи-аналогом), контролем IgG и аналогом Nivo в блокировании секреции ИЛ-2 в культурах МКПК при pH 7,4.

На фиг. 12А показано сравнение  $ЭК_{50}$  и активности показанных на фиг. 3А антител к CTLA4 по настоящему изобретению с ипилимумабом, аналогом ипилимумаба (ипи-аналогом) и контролем IgG в блокировании взаимодействия между CTLA4 и его лигандами при pH 6,0.

На фиг. 12В показано сравнение  $ЭК_{50}$  и активности показанных на фиг. 3А антител к CTLA4 по настоящему изобретению с ипилимумабом, аналогом ипилимумаба (ипи-аналогом) и контролем IgG в блокировании взаимодействия между CTLA4 и его лигандами при pH 7,4.

На фиг. 13А показано сравнение  $ЭК_{50}$  и активности показанных на фиг. 3А антител к CTLA4 по настоящему изобретению с ипилимумабом, аналогом ипилимумаба (ипи-аналогом) и контролем IgG в конкурентном связывании с CTLA4 человека в зависимости от концентрации лиганда hB7-1 (hCD80) CTLA4, как измерено при помощи проточной цитометрии.

На фиг. 13В показано сравнение  $ЭК_{50}$  и активности показанных на фиг. 3А антител к CTLA4 по настоящему изобретению с ипилимумабом, аналогом ипилимумаба (ипи-аналогом) и контролем IgG в конкурентном связывании с CTLA4 человека в зависимости от концентрации лиганда hB7-2 (hCD86) CTLA4, как измерено при помощи проточной цитометрии.

На фиг. 14А показано сравнение активности показанных на фиг. 3А антител к CTLA4 по настоящему изобретению с ипилимумабом, аналогом ипилимумаба (ипи-аналогом), и контролем IgG в конкурентном связывании с CTLA4 человека при фиксированной концентрации лиганда hB7-1 CTLA4 в зависимости от концентрации антител, как измерено при помощи проточной цитометрии.

На фиг. 14В показано сравнение активности показанных на фиг. 3А антител к CTLA4 по настоящему изобретению с ипилимумабом, аналогом ипилимумаба (ипи-аналогом), и контролем IgG в конкурентном связывании с CTLA4 человека при фиксированной концентрации лиганда hB7-2 CTLA4 в зависимости от концентрации антител, как измерено при помощи проточной цитометрии.

Определения.

Для облегчения понимания приведенных в данном документе примеров, в данном документе определены некоторые часто встречающиеся термины.

В связи с измеряемой величиной термин "около", используемый в данном документе, относится к нормальному изменению этой измеренной величины, которое может ожидать квалифицированный специалист, производящий измерение и проявляющий уровень осторожности, соизмеримый с целью измерения и точностью используемого измерительного оборудования. Если не указано иное, "около" относится к отклонению  $\pm 10\%$  от указанного значения.

Используемый в данном документе термин "аффинность связывания" относится к силе суммарного количества нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антителом) и ее связывающим партнером (например, антигеном). Если не указано иное, используемый в данном документе термин "аффинность связывания" относится к действительной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие в соотношении 1:1 между членами связывающей пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y в целом можно выразить константой диссоциации ( $K_d$ ). Аффинность может быть измерена обычными способами, известными в данной области техники, включая описанные в данном документе. Конкретные иллюстративные и типичные варианты осуществления изобретения, относящиеся к измерению аффинности связывания, описаны далее.

Используемый в данном документе термин "антитело с созревшей аффинностью" относится к антителу с одним или более изменениями в одной или более определяющих комплементарность областях по сравнению с исходным антителом, которое не обладает такими изменениями, такие изменения приводят к повышению аффинности антитела к антигену.

Используемый в данном документе термин "аминокислота" относится к любому органическому соединению, которое содержит аминогруппу ( $-NH_2$ ) и карбоксильную группу ( $-COOH$ ); предпочтительно либо в виде свободных групп, либо, альтернативно, после конденсации в виде части пептидных связей.

"Двадцать естественно кодируемых полипептидообразующих альфа-аминокислот" известны в данной области техники и относятся к: аланину (ala или A), аргинину (arg или R), аспарагину (asn или N), аспарагиновой кислоте (asr или D), цистеину (cys или C), глутаминовой кислоте (glu или E), глутамину (gin или Q), глицину (gly или G), гистидину (his или H), изолейцину (ile или I), лейцину (leu или L), лизину (lys или K), метионину (met или M), фенилаланину (phe или F), пролину (pro или P), серину (ser или S), треонину (thr или T), триптофану (trp или W), тирозину (tyr или Y) и валину (val или V).

Используемый в данном документе термин "антитело" относится к интактным молекулам иммуноглобулинов, а также к фрагментам молекул иммуноглобулинов, таким как фрагмента Fab, Fab', (Fab')<sub>2</sub>, Fv и фрагментам SCA, которые способны связываться с эпитопом антигена. Эти фрагменты антител, которые сохраняют некоторую способность избирательно связываться с антигеном (например, полипептидным антигеном) антитела, из которого они получены, могут быть получены с использованием хорошо известных в данной области техники способов (см., например, Harlow and Lane, выше), и описаны далее следующим образом. Антитела можно использовать для выделения препаративных количеств антигена при помощи иммуноаффинной хроматографии. Различные другие применения таких антител включают диагностику и/или стадию заболевания (например, неоплазию) и терапевтическое применение для лечения заболевания, такого как, например, неоплазия, аутоиммунное заболевание, СПИД, сердечно-сосудистое заболевание, инфекции и тому подобное. Химерные, человекоподобные, гуманизированные или полностью человеческие антитела особенно полезны для введения пациентам-людям.

Фрагмент Fab состоит из моновалентного антигенсвязывающего фрагмента молекулы антитела и может быть получен путем расщепления молекулы полного антитела ферментом папаином с получением фрагмента, состоящего из интактной легкой цепи и части тяжелой цепи.

Фрагмент Fab' молекулы антитела может быть получен обработкой молекулы полного антитела пепсином с последующим восстановлением с получением молекулы, состоящей из интактной легкой цепи и части тяжелой цепи. На каждую молекулу антитела, обработанную таким образом, получают два фрагмента Fab'.

Фрагмент (Fab')<sub>2</sub> антитела может быть получен обработкой молекулы полного антитела ферментом пепсином без последующего восстановления. Фрагмент (Fab')<sub>2</sub> представляет собой димер двух фрагментов Fab', удерживаемых вместе двумя дисульфидными связями.

Фрагмент Fv определяется как генетически сконструированный фрагмент, содержащий варибельную область легкой цепи и варибельную область тяжелой цепи, экспрессируемые в виде двух цепей.

Используемый в данном документе термин "фрагмент антитела" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv); и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Используемые в данном документе термины "антитело к CTLA4", "антитело против CTLA4" и "антитело, которое связывается с CTLA4" относятся к антителу, которое способно связывать CTLA4 с достаточной аффинностью, так что антитело может использоваться в качестве диагностического и/или терапевтического агента, нацеленного на CTLA4. В одном варианте осуществления степень связывания антитела к CTLA4 с неродственным белком, не являющимся CTLA4, составляет менее около 10% связывания антитела с CTLA4, как измерено, например, при помощи радиоиммуноанализа (РИА). В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с CTLA4, имеет константу диссоциации ( $K_d$ ) 1 пМ, 100 нМ,  $\leq 10$  нМ,  $\leq 1$  нМ,  $\leq 0,1$  нМ,  $\leq 0,01$  нМ или  $\leq 0,001$  нМ (например,  $10^{-8}$  М или менее, например, от  $10^{-8}$  М до  $10^{-13}$  М, например, от  $10^{-9}$  М до  $10^{-13}$  М). В определенных вариантах осуществления антитело к CTLA4 связывается с эпитопом CTLA4, который является консервативным среди CTLA4 от разных видов.

Используемый в данном документе термин "связывание" относится к взаимодействию варибельной области или Fv антитела с антигеном, причем взаимодействие зависит от наличия конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа) на антигене. Например, варибельная область антитела или Fv распознает и связывается с конкретной структурой белка, а не с белками в целом. Используемый в данном документе термин "специфически связывается" или "специфическое связывание" означает, что варибельная область антитела или Fv связывается или ассоциируется с большей частотой, большей скоростью, большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с конкретным антигеном, чем с другими белками. Например, варибельная область антитела или Fv специфически связывается со своим антигеном с большей аффинностью, авидностью, легче и/или дольше, чем с другими антигенами. В другом примере варибельная область антитела или Fv связывается с белком клеточной поверхности (антигеном) с существенно большей аффинностью, чем с родственными белками или другими белками клеточной поверхности, или с антигенами, обычно распознаваемыми полиреактивными природными антителами (то есть при помощи естественных антител, которые, как известно, связывают различные антигены, естественно встречающиеся у человека). Однако "специфическое связывание" не обязательно требует исключительного связывания или необнаруживаемого связывания другого антигена, это подразумевается под термином "селективное связывание". В одном примере "специфическое связыва-

ние" вариабельной области антитела или Fv (или другой связывающей области) связывается с антигеном, означает, что вариабельная область антитела или Fv связывается с антигеном с константой равновесия ( $K_D$ ) 100 нМ или менее, например, 50 нМ или менее, например, 20 нМ или менее, например, 15 нМ или менее, или 10 нМ или менее, или 5 нМ или менее, 2 нМ или менее, или 1 нМ или менее.

Используемый в данном документе термины "злокачественное новообразование" и "раковый" относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры злокачественного новообразования включают, но не ограничиваются ими, карциному, лимфому (например, лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому), бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры таких злокачественных новообразований включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, плоскоклеточный рак легкого, рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак груди, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак эндометрия или матки, рак слюнной железы, рак почки, рак печени, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, рак печени, лейкоз и другие лимфопролиферативные заболевания, а также различные злокачественные новообразования головы и шеи.

Используемые в данном документе термины "нарушение пролиферации клеток" и "пролиферативное нарушение" относятся к нарушениям, которые связаны с некоторой степенью аномальной пролиферации клеток. В одном варианте осуществления нарушение пролиферации клеток представляет собой злокачественное новообразование.

Используемый в данном документе термин "химиотерапевтический агент" относится к химическому соединению, используемому при лечении злокачественного новообразования. Примеры химиотерапевтических агентов включают следующее: алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилендиофосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (в особенности буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (включая синтетический аналог топотекана (HYCAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); подофиллотоксин; подофиллиновая кислота; тенипозид; криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мелхлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтаммина, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихеамицин, в особенности калихеамицин гаммаII и калихеамицин омегаII (смотрите, например, Nicolaou et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994))); CDP323, пероральный ингибитор альфа-4 интегрина; динемидин, включая динемидин А; эсперамицин; а также хромофор неокарзиностатина и родственные хромофоры хромопротеиновых эндеиновых антибиотиков), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, каминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-дизо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая ADRIAMYCIN®, морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин, липосомальный доксорубицин HCL для инъекций (DOXIL®), липосомальный доксорубицин TLC D-99 (MYOCET®), пегилированный липосомальный доксорубицин (CAELYX®) и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломидин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пуромицин, келамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат, гемцитабин (GEMZAR®), тегафур (UFTORAL®), капецитабин (XELODA®), эпотилон и 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; анти-антиадrenalные агенты, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; наполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элформитин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглоцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS



Natural Products, Юджин, Орегон); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2'-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, рондин А и ангидин); уретан; виндезин (ELDISINE®, FILDES IN®); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ара-С"); тиотепа; таксоид, например, паклитаксел (TAXOL®), состав паклитаксела в виде наночастиц, созданный на основе альбумина (ABRAXANE™) и доцетаксел (TAXOTERE®); хлоранбуцил; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; платиновые агенты, такие как цисплатин, оксалиплатин (например, ELOXATIN®) и карбоплатин; алкалоиды барвинка, которые предотвращают образование микротрубочек при полимеризации тубулина, включая винбластин (VELBAN®), винкристин (ONCOVIN®), виндезин (ELDISINE®, FILDESIN®) и винорелбин (NAVELBINE®); этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; лейковорин; новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметиломитин (DMF®); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота, включая бексаротен (TARGRETIN®); бисфосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS® или OSTAC®), этидронат (DIDROCAL®), NE-58095, золедроновая кислота/золедронат (ZOMETA®), алендронат (FOSAMAX®), памидронат (AREDIA®), тилудронат (SKELID®) или ризедронат (ACTONEL®); троксацитабин (1,3-диоксолановый нуклеозидный аналог цитозина); антисмысловые олигонуклеотиды, особенно те, которые ингибируют экспрессию генов в сигнальных путях, участвующих в aberrантной пролиферации клеток, таких как, например, PKC-альфа, Raf, H-Ras и рецептор эпидермального фактора роста (РЭФР); вакцины, такие как вакцина THERATOPE® и вакцины для генной терапии, например, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; ингибитор топоизомеразы 1 (например, LURTOTECAN®); gmRH (например, ABARELIX®); BAY439006 (сорафениб; Bayer); SU-11248 (сунитиниб, SUTENT®, Pfizer); перифозин, ингибитор ЦОГ-2 (например, целекоксиб или эторикоксиб), ингибитор протеосом (например, PS341); бортезомиб (VELCADE®); CCI-779; типифамиб (R11577); орафениб, АВТ510; ингибитор Bcl-2, такой как облимерсен натрия (GENASENSE®); пиксантрон; ингибиторы РЭФР (см. определение ниже); ингибиторы тирозинкиназы (см. определение ниже); ингибиторы серин-треонинкиназы, такие как рапамидин (сиролимус, RAPAMUNE®); ингибиторы фарнезилтрансферазы, такие как лонафарниб (SCH 6636, SARAS AR™); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных; а также комбинации двух или более из вышеперечисленных, таких как CHOP, сокращение для комбинированной терапии циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном; и FOLFOX, сокращение для схемы лечения оксалиплатином (ELOXATIN™) в сочетании с 5-ФУ и лейковорином.

Химиотерапевтические агенты, как определено в данном документе, включают "антигормональные агенты" или "эндокринные терапевтические агенты", которые действуют, регулируя, уменьшая, блокируя или подавляя эффекты гормонов, которые могут способствовать росту злокачественного новообразования. Это могут быть сами гормоны, включая, помимо прочего, следующее: антиэстрогены со смешанным профилем агонистов/антагонистов, включая тамоксифен (NOLVADEX®), 4-гидрокситамоксифен, торемифен (FARESTON®), идоксифен, дролоксифен, ралоксифен (EVISTA®), триоксифен, кеоксифен и селективные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM), такие как SERM3; чистые антиэстрогены без агонистических свойств, такие как фулвестрант (FASLODEX®) и EM800 (такие агенты могут блокировать димеризацию рецептора эстрогена (ER), ингибировать связывание ДНК, повышать метаболизм ER, и/или подавлять уровни ER); ингибиторы ароматазы, включая стероидные ингибиторы ароматазы, такие как форместан и экземестан (AROMASIN®), и нестероидные ингибиторы ароматазы, такие как анастрозол (ARIMIDEX®), летрозол (FEMARA®) и аминоглутетимид, а также другие ингибиторы ароматазы включают ворозол (RIVISOR®), мегестрола ацетат (MEGASE®), фадрозол и 4(5)-имидазолы; агонисты гормона, высвобождающих лютеинизирующий гормон, включая лейпролид (LUPRON® и ELIGARD®), гозерелин, бусерелин и трипторелин; половые стероиды, включая прогестины, такие как ацетат мегестрола и ацетат медроксипрогестерона, эстрогены, такие как диэтилстильбестрол и премарин, и андрогены/ретиноиды, такие как флуоксиместерон, трансреиноновая кислота и фенретинид; онапристон; антипрогестероны; регуляторы эстрогеновых рецепторов (ERD); антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид и бикалутамид; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных; а также комбинации двух или более из вышеперечисленных.

Используемый в данном документе термин "химерное" антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи получена из конкретного источника или вида, в то время как остаток тяжелой и/или легкой цепи получен из другого источника или вида.

Используемый в данном документе термин "класс" антитела относится к типу константного домена или константной области, содержащейся в его тяжелой цепи. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG, и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, называются соответственно  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ .

Используемый в данном документе термин "условно активное антитело" относится к антителу, которое более активно в параметрах в опухолевом микроокружении по сравнению с параметрами в неопу-

холовом микроокружении. Параметры в опухолевом микроокружении включают более низкий pH, более высокие концентрации лактата и пирувата, гипоксию, более низкую концентрацию глюкозы и немного более высокую температуру по сравнению с неопухолевым микроокружением. Например, условно активное антитело практически неактивно при нормальной температуре тела, но активно при более высокой температуре в опухолевом микроокружении. В еще одном аспекте условно активное антитело менее активно в нормальной оксигенированной крови, но более активно в менее оксигенированной среде в опухоли. В еще одном аспекте условно активное антитело менее активно при нормальном физиологическом pH 7,2-7,8, но более активно при кислом pH 5,8-7,0 или 6,0-6,8, которое присуще опухолевому микроокружению. Существуют и другие параметры в опухолевом микроокружении, известные специалисту в данной области техники, которые также могут быть использованы в качестве параметра в настоящем изобретении, и при которых антитела к CTLA4 будут иметь различную аффинность связывания с CTLA4.

Используемый в данном документе термин "конститутивный", например, применяемый к активности CTLA4, относится к непрерывной сигнальной активности рецепторной киназы, которая не зависит от присутствия лиганда или других активирующих молекул. В зависимости от природы рецепторной киназы вся активность может быть конститутивной, или активность рецептора может быть дополнительно активирована связыванием других молекул (например, лигандов). Клеточные события, которые приводят к активации рецепторной киназы, хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, активация может включать олигомеризацию, например, димеризацию, тримеризацию и т.д., в рецепторные комплексы более высокого порядка. Комплексы могут включать один вид белка, то есть гомомерный комплекс. Альтернативно комплексы могут содержать по меньшей мере два разных вида белков, то есть гетеромерный комплекс. Образование комплекса может быть вызвано, например, сверхэкспрессией нормальных или мутантных форм рецептора на поверхности клетки. Образование комплекса также может быть вызвано конкретной мутацией или мутациями в рецепторе.

Используемый в данном документе термин "цитостатический агент" относится к соединению или композиции, которые останавливают рост клетки либо *in vitro*, либо *in vivo*. Таким образом, цитостатический агент может быть агентом, который значительно снижает процент клеток в S-фазе. Дополнительные примеры цитостатических агентов включают агенты, которые блокируют развитие клеточного цикла, вызывая остановку G0/G1 или остановку M-фазы. Гуманизированное антитело к Her2 трастузумаб (HERCEPTIN®) является примером цитостатического агента, который вызывает задержку G0/G1. Классические блокаторы M-фазы включают алкалоиды барвинка (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы топоизомеразы II, такие как доксорубин, эпирубинин, даунорубинин, этопозид и блеомицин. Определенные агенты, которые вызывают прекращение G1, также распространяются на прекращение фазы S, например, ДНК-алкилирующие средства, например, тамоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлорэтамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ара-С. Дополнительную информацию можно найти в Mendelsohn and Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, глава 1 под названием "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" авторства Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), например, с. 13. Таксаны (паклитаксел и доцетаксел) являются противораковыми лекарственными средствами, полученными из тисового дерева. Доцетаксел (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), полученный из европейского тиса, является полусинтетическим аналогом паклитаксела (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Паклитаксел и доцетаксел стимулируют сборку микротрубочек из димеров тубулина и стабилизируют микротрубочки путем предотвращения деполимеризации, что приводит к ингибированию митоза в клетках.

Используемый в данном документе термин "цитотоксический агент" относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает клеточную функцию и/или вызывает гибель или разрушение клеток. Цитотоксические агенты включают радиоактивные изотопы (например,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{212}\text{Pb}$  и радиоактивные изотопы Lu); химиотерапевтические агенты или лекарственные препараты (например, метотрексат, адриамицин, алкалоиды барвинка (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубинин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, даунорубинин или другие интеркалирующие агенты); агенты, ингибирующие рост; ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты; антибиотики; токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты; и различные противоопухолевые или противораковые средства, описанные ниже, но не ограничиваются ими.

Используемый в данном документе термин "диатела" относится к небольшим фрагментам антитела с двумя антигенсвязывающими сайтами, фрагменты которых содержат переменный домен тяжелой цепи ( $V_H$ ), соединенный с переменным доменом легкой цепи ( $V_L$ ) в одной и той же полипептидной цепи ( $V_H$ - $V_L$ ). Вследствие использования линкера, который является слишком коротким, чтобы позволить объединение двух доменов в одной цепи, домены вынуждены объединяться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта.

Используемый в данном документе термин "детектируемая метка" относится к любому веществу, обнаружение или измерение которого, прямо или косвенно, физическими или химическими средствами, указывает на присутствие СТС в образце. Репрезентативные примеры полезных детектируемых меток

включают, но не ограничиваются следующим: молекулы или ионы, прямо или косвенно детектируемые на основе поглощения, флуоресценции, отражательной способности, светорассеяния, фосфоресценции или люминесцентных свойств; молекулы или ионы, обнаруживаемые по их радиоактивным свойствам; молекулы или ионы, обнаруживаемые по их ядерному магнитному резонансу или парамагнитным свойствам. К группе молекул, косвенно определяемых на основе поглощения света или флуоресценции, например, относятся различные ферменты, которые вызывают преобразование соответствующих субстратов, например, из не поглощающих свет молекул в светопоглощающие или из нефлуоресцентных в флуоресцентные молекулы.

Используемый в данном документе термин "диагностика" относится к определению предрасположенности субъекта к заболеванию или нарушению, определению того, поражен ли субъект заболеванием или нарушением в настоящее время, прогнозу субъекта, пораженного заболеванием или нарушением (например, идентификация предмета статических или метастатических раковых состояний, стадий злокачественного новообразования или чувствительности злокачественного новообразования на терапию) и терапевтических параметров (например, мониторинг состояния субъекта для получения информации об эффекте или эффективности терапии). В некоторых вариантах осуществления диагностический способ по данному изобретению особенно полезен для выявления злокачественного новообразования на ранней стадии.

Используемый в данном документе термин "диагностический агент" относится к молекуле, которая может быть прямо или косвенно обнаружена и используется для диагностических целей. Диагностический агент можно вводить субъекту или в образец. Диагностический агент может быть предложен *per se* или может быть конъюгирован с носителем, таким как условно активное антитело.

Используемый в данном документе термин "эффektorные функции" относится к тем видам биологической активности, присущей области Fc антитела, которые изменяются в зависимости от изоформа антитела. Примеры эффektorных функций антитела включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ); связывание с рецептором Fc; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); фагоцитоз; снижение экспрессии клеточных поверхностных рецепторов (например, В-клеточного рецептора) и В-клеточную активацию.

Используемый в данном документе термин "эффективное количество" агента, например, фармацевтического состава, относится к количеству, эффективному в дозах и в течение требуемых периодов времени, для достижения требуемого терапевтического или профилактического результата.

Используемый в данном документе термин "область Fc" употребляется для обозначения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Данный термин включает нативные последовательности областей Fc и варианты областей Fc. В одном варианте осуществления область Fc тяжелой цепи человеческого IgG находится в пределах от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако, область Fc может содержать или не содержать C-концевой лизин (Lys447). Если не указано иное, нумерация аминокислотных остатков области Fc или константной области соответствует системе нумерации EU, также называемой индексом EU, как описано в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991.

Используемый в данном документе термин "каркасная область" или "FR" относится к остаткам вариабельного домена, отличным от остатков гипервариабельной области (HVR или H1-3 в тяжелой цепи и L1-3 в легкой цепи). FR вариабельного домена обычно состоит из четырех доменов FR: FR1, FR2, FR3 и FR4. Соответственно, последовательности HVR и FR, как правило, располагаются в следующем порядке в V<sub>H</sub> (или V<sub>L</sub>): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Термин "полноразмерное антитело", "интактное антитело" или "целое антитело" относится к антителу, которое содержит антигенсвязывающую вариабельную область (V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub>), а также константный домен легкой цепи (CL) и константные домены тяжелой цепи, CH1, CH2 и CH3. Константные домены могут представлять собой константные домены нативной последовательности (например, константные домены человеческой нативной последовательности) или их варианты аминокислотной последовательности. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей полноразмерные антитела могут быть определены в разные "классы". Существует пять основных классов полноразмерных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на "подклассы" (изоформы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам антител, называются альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю, соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

Используемые в данном документе термины "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев" и "культура клеток-хозяев" используются как взаимозаменяемые и относятся к клеткам, в которые введена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают "трансформанты" и "трансформированные клетки", которые включают первично трансформированные клетки и полученное от них потомство вне зависимости от числа пассажей. Потомство может не быть полностью идентичным исходной клетке по содержанию нуклеиновых кислот, и может содержать мутации. В данный

документ включено мутантное потомство, которое обладает такой же функцией или биологической активностью, которая является предметом исследований или отбора в изначально трансформированной клетке.

Используемый в данном документе термин "антитело человека" относится к антителу, которое имеет аминокислотную последовательность, которая соответствует таковой антитела, продуцируемого у человека или клеткой человека, или полученного из источника, отличного от человека, который использует репертуары человеческих антител или другие последовательности, кодирующие антитела человека. Из этого определения антитела человека, в частности, исключено гуманизованное антитело, содержащее антигенсвязывающие остатки нечеловеческого происхождения.

Используемый в данном документе термин "консенсусная каркасная область человека" в контексте настоящего описания обозначает каркасную область, которая представляет собой наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки при отборе последовательностей каркасной области  $V_L$  или  $V_H$  иммуноглобулина человека. Как правило, последовательности  $V_L$  или  $V_H$  иммуноглобулина человека выбраны из последовательностей подгруппы варибельных доменов. Как правило, подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу по классификации Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md. (1991), vols. 1-3. В одном варианте осуществления для  $V_L$  подгруппа представляет собой подгруппу каппа I, согласно Kabat et al., выше. В одном варианте осуществления для  $V_H$  подгруппа представляет собой подгруппу III, согласно Kabat et al., выше.

Используемый в данном документе термин "гуманизованное" антитело относится к химерному антителу, содержащему аминокислотные остатки из нечеловеческих HVR и аминокислотные остатки из человеческих FR. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело будет содержать все из по меньшей мере одного, а обычно двух варибельных доменов, в которых все или практически все HVR (например, CDR) соответствуют таковым из нечеловеческого антитела, и все или практически все FR соответствуют антителам человека. Гуманизованное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, полученной из антитела человека. "Гуманизованная форма" антитела, например, нечеловеческого антитела, относится к антителу, которое подверглось гуманизации.

Термин "гиперварибельная область" или "HVR", как используется в данном документе, относится к каждой из областей варибельного домена антитела, являющихся гиперварибельными по последовательности и/или образующих структурно определенные петли ("гиперварибельные петли"). Как правило, нативные четырехцепочечные антитела содержат шесть HVR: три в  $V_H$  (H1, H2, H3) и три в  $V_L$  (L1, L2, L3). HVR обычно содержат аминокислотные остатки из гиперварибельных петель и/или из "определяющих комплементарность областей" (CDR), причем последние характеризуются высочайшей изменчивостью последовательности и/или участвуют в распознавании антигенов. Примеры гиперварибельных петель соответствуют аминокислотным остаткам 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), и 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., vol. 196, pp. 901-917, 1987) Иллюстративные CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) соответствуют аминокислотным остаткам 2434 L1, 50-56 L2, 89-97 L3, 31-35B H1, 50-65 H2 и 95-102 H3 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1991). За исключением CDR1 в  $V_H$ , CDR, как правило, содержат аминокислотные остатки, образующие гиперварибельные петли. CDR также содержат "определяющие специфичность остатки" или "SDR", которые представляют собой остатки, которые контактируют с антигеном. SDR содержатся в областях CDR, называемых сокращенно CDR или a-CDR. Примеры a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, и a-CDR-H3) соответствуют аминокислотным остаткам 31-34 L1, 50-55 L2, 89-96 L3, 31-35B H1, 50-58 H2 и 95-102 H3. (См. Almagro and Fransson, Front. Biosci., vol. 13, pp.1619-1633, 2008). Если не указано иное, остатки HVR и другие остатки в варибельном домене (например, остатки FR) нумеруются в данном документе в соответствии с Kabat et al., выше.

Используемый в данном документе термин "иммуноконъюгат" означает антитело или фрагмент антитела, конъюгированные с одной или более гетерологичными молекулами, включая, но не ограничиваясь ими, цитотоксический агент, химиотерапевтический агент, радиоактивный атом или цитостатический агент.

Используемый в данном документе термин "индивидуум" или "субъект" относится к млекопитающему. Млекопитающие включают, но не ограничиваются этими, одомашненных животных (например, коров, овец, кошек, собак, лошадей), приматов (например, людей и приматов, не являющихся человеком, таких, как обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). В некоторых вариантах осуществления индивидуум или субъект является человеком.

Используемый в данном документе термин "ингибирование роста или пролиферации клеток" означает уменьшение роста или пролиферации клеток по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100%, и включает индукцию гибели клеток.

Используемый в данном документе термин "выделенное" антитело представляет собой антитело, которое было отделено от компонента его естественного окружения. В некоторых вариантах осуществ-

ления антитела является очищенным до более чем 95% или 99% чистоты, определяемой, например, посредством электрофореза (например, ДСН-ПААГ-электрофореза, изоэлектрического фокусирования (ИЭФ), капиллярного электрофореза) или методом хроматографии (например, ионообменной или обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)). Для обзора методов оценки чистоты антител см., например, Flatman et al., *J. Chromatogr. B*, vol. 848, pp. 79-87, 2007.

Используемый в данном документе термин "выделенная" нуклеиновая кислота относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была отделена от компонента ее естественного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые, как правило, содержат молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты присутствует вне хромосомы или в хромосомном местоположении, которое отличается от ее естественного хромосомного местоположения.

Используемый в данном документе термин "нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к CTLA4" относится к одной или более молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим тяжелые и легкие цепи антитела (или их фрагменты), включая молекулы нуклеиновых(ой) кислот(ы) в одном векторе или отдельных векторах и молекулы нуклеиновых(ой) кислот(ы), присутствующие в одной или более местах в клетке-хозяине.

Используемый в данном документе термин "лиганд-независимый", например, применяемый к активности сигналинга рецептора, относится к активности сигналинга, которая не зависит от присутствия лиганда. Рецептор, обладающий лиганд-независимой киназной активностью, не обязательно будет препятствовать связыванию лиганда с этим рецептором, чтобы вызвать дополнительную активацию киназной активности.

Используемый в данном документе термин "метастазирование" относится ко всем процессам, связанным с CTLA4, которые способствуют распространению раковых клеток из первичной опухоли, проникновению в лимфатические и/или кровеносные сосуды, циркуляции через кровоток и росту в удаленном очаге (метастазах) в нормальных тканях в других частях тела. В частности, это относится к клеточным событиям опухолевых клеток, таким как пролиферация, миграция, независимость от закоривания, уклонение от апоптоза или секреция ангиогенных факторов, которые лежат в основе метастазирования и стимулируются или опосредуются некаталитической или каталитической активностью CTLA4, предпочтительно включая фосфорилирование CTLA4 и/или опосредованную CTLA4 передачу сигнала.

Используемый в данном документе термин "микроокружение" означает любую часть или область ткани или тела, которая имеет постоянные или временные, физические или химические отличия от других областей ткани или областей тела. В отношении опухолей термин "опухолевое микроокружение", используемый в данном документе, относится к окружению, в котором существует опухоль, которая представляет собой неклеточную область внутри опухоли и область непосредственно за пределами опухолевой ткани, но не относится к внутриклеточному компартменту самой раковой клетки. Опухоль и ее микроокружение тесно связаны и постоянно взаимодействуют. Опухоль может изменить свое микроокружение, а микроокружение может влиять на рост и распространение опухоли. Как правило, опухолевое микроокружение имеет низкий pH в диапазоне от 5,0 до 7,0, или в диапазоне от 5,0 до 6,8, или в диапазоне от 5,8 до 6,8, или в диапазоне от 6,2 до 6,8. С другой стороны, нормальный физиологический pH находится в пределах 7,2-7,8. Также известно, что опухолевое микроокружение имеет более низкую концентрацию глюкозы и других питательных веществ, но более высокую концентрацию молочной кислоты по сравнению с плазмой крови. Кроме того, опухолевое микроокружение может иметь температуру на 0,3-1°C выше нормальной физиологической температуры. Опухоловое микроокружение обсуждалось в Gillies et al., "MRI of the Tumor Microenvironment," *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, vol. 16, pp.430-450, 2002, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Термин "неопухолевое микроокружение" относится к микроокружению на участке, отличном от опухоли.

Используемый в данном документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции в значительной степени гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными и/или связывают один эпитоп за исключением возможных вариантных антител, например, содержащих мутации природного происхождения или возникших во время получения препарата моноклональных антител, при этом такие варианты в общем случае присутствуют в незначительном количестве. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые, как правило, содержат различные антитела против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело из препарата моноклонального антитела направлено против одной детерминанты антигена. Таким образом, определение "моноклональный" указывает на характеристику антитела, полученного по существу из однородной популяции антител, и не должно быть истолковано как необходимость получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела для использования согласно данному изобретению можно получить при помощи различных способов, включая, без ограничений, метод гибридомы, методы рекомбинантных ДНК, методы фагового дисплея и способы с использованием трансгенных животных, полностью или частично содержащих локусы человеческого иммуноглобулина, причем такие способы и другие иллюстративные способы получения моноклональных антител описаны в данном документе.

Используемый в данном документе термин "голое антитело" относится к антителу, которое не

конъюгировано с гетерологичным фрагментом (например, цитотоксическим фрагментом) или радиоактивной меткой. Глобулин антитела может присутствовать в фармацевтическом составе.

Используемый в данном документе термин "нативные антитела" относится к природным молекулам иммуноглобулинов с различными структурами. Например, нативные антитела IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой около 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей, соединенных дисульфидными связями. В направлении от N- к C-концу каждая тяжелая цепь имеет переменную область ( $V_H$ ), также называемую переменным тяжелым доменом или переменным доменом тяжелой цепи, за которым следуют три константных домена (CH1, CH2 и CH3). Аналогичным образом в направлении от N- к C-концу каждая легкая цепь имеет переменную область ( $V_L$ ), которая также называется переменным легким доменом или переменным доменом легкой цепи, за которым следует константный домен легкой цепи (CL). В зависимости от аминокислотной последовательности своего константного домена легкую цепь антитела можно отнести к одному из двух типов, называемых каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ).

Термин "листок-вкладыш в упаковке" используется для обозначения инструкций, которые, как правило, вкладываются в коммерческие упаковки терапевтических продуктов для продажи, содержащие информацию о показаниях, использовании, дозах, приеме, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях, которые касаются использования таких терапевтических продуктов.

"Процент (%) идентичности аминокислотных последовательностей" относительно эталонной полипептидной последовательности определяется как процентная доля аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые являются идентичными с аминокислотными остатками в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и внесения, в случае необходимости, гэпов для достижения максимальной идентичности последовательностей, но без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процента идентичности аминокислотных последовательностей может осуществляться различными способами, которые известны специалистам в данной области техники, например, с использованием общедоступных компьютерных программ, таких как программные обеспечения BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Для целей данного документа, тем не менее, значения % идентичности аминокислотной последовательности получены с использованием программы для сравнения последовательностей ALIGN-2. Компьютерная программа для выравнивания последовательностей ALIGN-2 была разработана Genentech, Inc., а исходная программа была подана вместе с документацией пользователя в Бюро регистрации авторских прав США, Вашингтон, округ Колумбия, 20559, где она зарегистрирована под номером регистрации авторского права США TXU510087. Программа ALIGN-2 находится в свободном доступе в Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, штат Калифорния, или ее можно скомпилировать из исходного кода. Для применения в операционной системе UNIX, включающей цифровую версию UNIX V4.0D, программу ALIGN-2 нужно скомпилировать. Все параметры сравнения последовательностей устанавливаются программой ALIGN-2 и остаются неизменными.

В тех случаях, когда для сравнения аминокислотных последовательностей используется ALIGN-2, % идентичности аминокислотной последовательности данной аминокислотной последовательности А к, с, или по отношению к данной аминокислотной последовательности В (что в альтернативном варианте может быть сформулировано как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или содержит определенный % идентичности аминокислотной последовательности к, с или по отношению к данной аминокислотной последовательности В) рассчитывают следующим образом:

$$100 \cdot X/Y,$$

где X представляет собой число аминокислотных остатков, оцененных программой выравнивания последовательностей ALIGN-2 как идентичные совпадения при программном выравнивании А и В, и где Y представляет общее количество аминокислотных остатков в В. Следует понимать, что там, где длина аминокислотной последовательности А не равняется длине аминокислотной последовательности В, % идентичности аминокислотной последовательности А к В не будет равен % идентичности аминокислотной последовательности В к А. Если специально не указано иное, все значения % идентичности аминокислотных последовательностей, которые используются в данном документе, получают, как описано в предыдущем абзаце с использованием компьютерной программы ALIGN-2.

Термин "фармацевтический состав" или "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы обеспечить эффективность биологической активности содержащегося в нем активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться состав.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, отличному от активного ингредиента, который является нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но не ограничивается ими, буфер, эксципиент, стабилиза-

тор или консервант.

Используемые в данном документе термины "очищенный" и "выделенный" относятся к антителу согласно изобретению или к нуклеотидной последовательности, при которой указанная молекула присутствует в основном при отсутствии других биологических макромолекул того же типа. Используемый в данном документе термин "очищенный" предпочтительно означает по меньшей мере 75 мас.%, более предпочтительно по меньшей мере 85 мас.%, еще более предпочтительно по меньшей мере 95 мас.% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 98 мас.% биологических макромолекул такого же типа присутствуют. "Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует конкретный полипептид, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая по существу не содержит других молекул нуклеиновой кислоты, которые не кодируют полипептид; однако молекула может содержать некоторые дополнительные основания или фрагменты, которые не влияют отрицательно на основные характеристики композиции.

Используемый в данном документе термин "рекомбинантное антитело" относится к антителу (например, химерному, гуманизированному или человеческому антителу или его антигенсвязывающему фрагменту), которое экспрессируется рекомбинантной клеткой-хозяином, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело. Примеры "клеток-хозяев" для продуцирования рекомбинантных антител включают: (1) клетки млекопитающих, например, яичника китайского хомячка (CHO), COS, клетки миеломы (включая клетки Y0 и NS0), почки детеныша хомячка (ВНК), клетки Hela и Vero; (2) клетки насекомых, например, sf9, sf21 и Tn5; (3) растительные клетки, например, растения, принадлежащие к роду *Nicotiana* (например, *Nicotiana tabacum*), (4) дрожжевые клетки, например, клетки, принадлежащие к роду *Saccharomyces* (например, *Saccharomyces cerevisiae*) или роду *Aspergillus* (например, *Aspergillus niger*) (5) бактериальные клетки, например, клетки *Escherichia coli* или клетки *Bacillus subtilis* и т.д.

Термин "CTLA4", используемый в данном документе, относится к иммунной контрольной точке, которая имеет аминокислотную последовательность, как описано в патентах США №№ 5434131, 5844095 и 5851795, или любую его часть или производное, которая распознает и связывает В7 или препятствует а В7, так что он блокирует связывание с CD28 и/или CTLA4 (например, эндогенным CD28 и/или CTLA4). В конкретных вариантах осуществления внеклеточный домен CTLA4 дикого типа начинается с метионина в положении +1 и заканчивается аспарагиновой кислотой в положении +124, или внеклеточный домен CTLA4 дикого типа начинается с аланина в положении -1 и заканчивается аспарагиновой кислотой в положении +124. CTLA4 дикого типа представляет собой белок клеточной поверхности, имеющий N-концевой внеклеточный домен, трансмембранный домен и C-концевой цитоплазматический домен. Внеклеточный домен связывается с целевыми молекулами, такими как молекула В7. В клетке встречающийся в природе белок CTLA4 дикого типа транслируется как незрелый полипептид, который включает сигнальный пептид на N-конце. Незрелый полипептид подвергается посттрансляционному процессингу, который включает расщепление и удаление сигнального пептида с образованием продукта расщепления CTLA4, имеющего вновь образованный N-концевой конец, который отличается от N-концевого конца в незрелой форме. Специалист в данной области техники поймет, что может происходить дополнительный посттрансляционный процессинг, который удаляет одну или более аминокислот из вновь образованного N-концевого конца продукта расщепления CTLA4. В качестве альтернативы сигнальный пептид не может быть удален полностью, генерируя молекулы, которые начинаются раньше, чем обычная исходная аминокислота метионин. Таким образом, зрелый белок CTLA4 может начинаться с метионина в положении +1 или аланина в положении -1. Зрелая форма молекулы CTLA4 содержит внеклеточный домен или любую его часть.

Термин "терапевтически эффективное количество" антитела по изобретению означает количество антитела, достаточное для лечения указанного злокачественного новообразования, с разумным соотношением польза/риск, применимым к любому медицинскому лечению. Однако следует понимать, что общее ежедневное использование антител и композиций по настоящему изобретению будет решаться лечащим врачом в рамках обоснованного медицинского заключения. Конкретный терапевтически эффективный уровень дозы для любого конкретного пациента будет зависеть от множества факторов, включая расстройство, подлежащее лечению, и тяжесть расстройства; активность конкретного используемого антитела; конкретный используемый состав; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и рацион пациента; время введения, способ введения и скорость выведения конкретного используемого антитела; продолжительность лечения; лекарственные средства, используемые в комбинации или одновременно с конкретным применяемым антителом; и подобные факторы, хорошо известные в медицине. Например, в рамках данной области техники общепринято начинать с доз соединений на уровнях ниже необходимых для достижения желаемого терапевтического действия, и постепенно повышать дозировку до достижения желаемого действия.

Используемый в данном документе термин "одноцепочечный Fv" ("scFv") означает ковалентно связанный гетеродимер  $V_H::V_L$ , который обычно экспрессируется из слияния генов, включая гены, кодирующие  $V_H$  и  $V_L$ , связанные линкером, кодирующим пептид. "dsFv" представляет собой гетеродимер  $V_H::V_L$  стабилизированный дисульфидной связью. Фрагменты двухвалентных и поливалентных антител могут образовываться либо спонтанно путем ассоциации моновалентных scFv, либо могут быть образо-

ваны путем связывания моновалентных scFv при помощи пептидного линкера, такого как двухвалентный sc(Fv)<sub>2</sub>.

Используемые в данном документе термины "лечение", "лечить" или "процесс лечения" относятся к клиническому вмешательству при попытке изменить естественное течение заболевания у индивидуума, подвергаемого лечению, и может осуществляться для профилактики или в процессе клинического проявления патологии. Желаемые эффекты лечения включают предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение состояния болезни, и ремиссию или улучшенный прогноз, но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению используются для задержки развития заболевания или замедления прогрессирования заболевания.

Как используется в данном документе, термин "опухоль" относится ко всем видам роста и пролиферации опухолевых клеток, будь то злокачественные или доброкачественные, и всем предраковым и раковым клеткам и тканям. Термины "злокачественное новообразование", "злокачественный", "нарушение пролиферации клеток", "пролиферативное расстройство" и "опухоль" не исключают друг друга, как упоминается в данном документе.

Используемый в данном документе термин "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, соответственно) нативного антитела обычно имеют сходные структуры, причем каждый домен содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три гипервариабельные области (HVR) (См., например, Kindt et al., *Kuby Immunology*, 6<sup>th</sup> ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)). Одного домена V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, могут быть выделены с использованием домена V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> из антитела, связывающего антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub>, соответственно; см., например, Portolano et al., *J. Immunol.*, vol. 150, pp. 880-887, 1993; Clarkson et al., *Nature*, vol. 352, pp. 624-628, 1991.

Термин "вектор" в контексте данного документа относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной обеспечивать репродукцию другой нуклеиновой кислоты, связанной с ней. Термин включает вектор как самореплицирующуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, который включен в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Некоторые векторы способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в данном документе называют "векторами экспрессии".

#### **Подробное описание сущности изобретения**

В иллюстративных целях принципы настоящего изобретения описаны со ссылкой на различные иллюстративные варианты осуществления. Хотя в данном документе конкретно описаны определенные варианты осуществления изобретения, рядовой специалист в данной области техники легко поймет, что те же принципы в равной степени применимы и могут использоваться в других системах и способах. Прежде чем подробно объяснять описанные варианты осуществления настоящего изобретения, следует понимать, что изобретение не ограничивается в своем применении деталями какого-либо конкретного показанного варианта осуществления. Кроме того, терминология, используемая в данном документе, предназначена для описания, а не для ограничения. Кроме того, хотя некоторые способы описаны со ссылкой на стадии, которые представлены в данном документе в определенном порядке, во многих случаях эти этапы могут выполняться в любом порядке, который может быть оценен специалистом в данной области техники; поэтому новый способ не ограничивается конкретным расположением стадий, раскрытых в данном документе.

Следует отметить, что в рамках настоящего документа и формулы изобретения использование формы единственного числа включает объекты во множественном числе, если из контекста не следует иное. Более того, термины в форме единственного числа, а также выражения "один или более" и "по меньшей мере один" могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо. Термины "содержащий", "включающий", "имеющий" и "созданный из" также могут использоваться взаимозаменяемо.

Если не указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов, такие свойства, как молекулярная масса, процент, соотношение, условия реакции и т.д., используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как измененные во всех случаях термином "около" присутствует ли термин "около". Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, изложенные в описании и формуле изобретения, являются приближениями, которые могут варьироваться в зависимости от желаемых свойств, которые стремятся получить при помощи настоящего изобретения. По крайней мере, и не как попытка ограничить применение доктрины эквивалентов к объему формулы изобретения, каждый числовой параметр должен, по меньшей мере, истолковываться с учетом числа сообщаемых значащих цифр и путем применения обычных методов округления. Несмотря на то что численные диапазоны и параметры, изложенные в широком объеме данного описания, являются приблизительными, изложенные в конкретных примерах численные значения указаны настолько точно, насколько это возможно. Любое числовое значение, однако, по своей сути содержит определенные ошибки, неизбежно возникающие в ре-



зультате стандартного отклонения, обнаруженного при соответствующих экспериментальных измерениях.

Следует понимать, что каждый компонент, соединение, заместитель или параметр, раскрытые в настоящем документе, следует интерпретировать как раскрытые для применения отдельно или в комбинации с одним или более из каждого другого компонента, соединения, заместителя или параметра, раскрытого в данном документе.

Также следует понимать, что каждое количество/значение или диапазон количеств/значений для каждого компонента, соединения, заместителя или параметра, описанные в данном документе, следует интерпретировать как раскрытые в комбинации с каждым количеством/значением или диапазоном количеств/значений, раскрытых для любого другого компонента(ов), соединения(й), заместителя(ей) или параметра(ов), раскрытых в данном документе, и что любая комбинация количеств/значений или диапазонов количеств/значений для двух или более компонентов, соединений, заместителей или параметров также раскрываются в комбинации друг с другом для целей этого описания.

Также понятно, что каждый нижний предел каждого раскрытого в данном документе диапазона следует интерпретировать как раскрытый в комбинации с каждым верхним пределом каждого раскрытого в данном документе диапазона для одного и того же компонента, соединений, заместителя или параметра. Таким образом, описание двух диапазонов следует интерпретировать как раскрытие четырех диапазонов, полученных путем объединения каждого нижнего предела каждого диапазона с каждым верхним пределом каждого диапазона. Раскрытие трех диапазонов следует интерпретировать как раскрытие девяти диапазонов, полученных путем объединения каждого нижнего предела каждого диапазона с каждым верхним пределом каждого диапазона и т.д. Кроме того, конкретные количества/значения компонента, соединения, заместителя или параметра, раскрытые в описании или примере должны интерпретироваться как раскрытие либо нижнего, либо верхнего предела диапазона и, таким образом, могут быть объединены с любым другим нижним или верхним пределом диапазона или конкретным количеством/значением для того же компонента, соединения, заместителя или параметра, раскрытые в другом месте заявки, чтобы сформировать диапазон для этого компонента, соединения, заместителя или параметра.

#### А. Антигела к CTLA4.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному полипептиду варибельной области тяжелой цепи, который специфически связывается с белком CTLA4 человека. Выделенный полипептид варибельной области тяжелой цепи содержит три определяющие комплементарность области, содержащие H1, H2 и H3, при этом

последовательность H1 представляет собой GFTFSHYTMH (SEQ ID NO: 1);

последовательность H2 представляет собой FIX<sub>1</sub>YX<sub>2</sub>GNX<sub>3</sub>KX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>AX<sub>6</sub>SX<sub>7</sub>KG (SEQ ID NO: 2);

последовательность H3 представляет собой TGWLGPFDX<sub>8</sub> (SEQ ID NO: 3),

где X<sub>1</sub> представляет собой S или D; X<sub>2</sub> представляет собой D, H или I, X<sub>3</sub> представляет собой N или Y; X<sub>4</sub> представляет собой Y или I; X<sub>5</sub> представляет собой Y или E; X<sub>6</sub> представляет собой D или K; X<sub>7</sub> представляет собой V или M; а X<sub>8</sub> представляет собой Y или I.

Выравнивания иллюстративных выделенных варибельных областей тяжелой цепи по настоящему изобретению показаны на фиг. 1, где определяющие комплементарность области H1, H2 и H3, заключены в рамку.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному полипептиду варибельной области легкой цепи, который специфически связывается с белком CTLA4 человека. Выделенный полипептид варибельной области легкой цепи содержит три определяющие комплементарность области, имеющие последовательности L1, L2 и L3, при этом

последовательность L1 представляет собой RX<sub>9</sub>SQX<sub>10</sub>X<sub>11</sub>GSSYLA (SEQ ID NO: 4);

последовательность L2 представляет собой GAFSRATGX<sub>12</sub> (SEQ ID NO: 5);

последовательность L3 представляет собой QQDGSSPWT (SEQ ID NO: 6),

причем X<sub>9</sub> представляет собой A или I; X<sub>10</sub> представляет собой Y, S или H; X<sub>11</sub> представляет собой V или G; X<sub>12</sub> представляет собой V или I.

Выравнивания иллюстративных выделенных варибельных областей легкой цепи по настоящему изобретению показаны на фиг. 2, где определяющие комплементарность области L1, L2 и L3, заключены в рамку.

Каждый из выделенных полипептидов варибельной области тяжелой цепи и выделенных полипептидов варибельной области легкой цепи по настоящему изобретению был получен из исходного антигела с использованием способа, описанного в патенте США № 8709755. Этот способ получения выделенных полипептидов варибельной области тяжелой цепи и выделенных полипептидов варибельной области легкой цепи, а также способ получения антигел и фрагментов антигел, раскрытый в патенте США № 8709755, включены в данный документ посредством ссылки.

В другом аспекте настоящее изобретение включает варибельные области тяжелой цепи, показанные на фиг. 1, и варибельные области легкой цепи, показанные на фиг. 2. Аминокислотные последовательности 16 варибельных областей тяжелой цепи на фиг. 1 представлены в SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14,

16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38. Аминокислотные последовательности 16 переменных областей легкой цепи на фиг. 1 представлены в SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37. Антитела и фрагменты антител, включая эти переменные области тяжелой цепи и переменные области легкой цепи, могут специфически связываться с CTLA4 человека.

Было обнаружено, что антитела или фрагменты антител, содержащие комбинацию одной из этих переменных областей тяжелой цепи и одной из этих переменных областей легкой цепи, обладают более высокой аффинностью связывания с CTLA4 при pH в опухолевом микроокружении (например, pH 6,0-6,2), чем при pH в неопухолевом микроокружении (например, pH 7,4). В результате антитела к CTLA4 или их фрагменты обладают более высокой аффинностью связывания с CTLA4 в опухолевом микроокружении по сравнению с их аффинностью связывания с CTLA4 в микроокружении нормальной ткани.

Таким образом, антитела к CTLA4 или фрагменты антител по настоящему изобретению обладают уменьшенными побочными эффектами из-за их пониженной аффинности связывания с CTLA4 в микроокружении нормальной ткани, а также сравнимой эффективностью по сравнению с моноклональными антителами к CTLA4, известными в данной области техники. Эти особенности позволяют использовать более высокие дозы этих антител к CTLA4 или фрагментов антител для доставки пациенту, что обеспечивает более эффективный терапевтический вариант.

Хотя настоящее изобретение включает переменные области тяжелой цепи и переменные области легкой цепи, представленные на фиг. 1, 2 и те, которые имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7-38, а настоящее изобретение также включает их варианты, которые могут специфически связываться с CTLA4 человека. В некоторых вариантах осуществления эти варианты имеют разные последовательности H2, H3, L1 и L2. В других вариантах осуществления аминокислотная последовательность переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легких цепей за пределами определяющих комплементарность областей может быть мутирована в соответствии с принципами замены, вставки и делеции, как обсуждается в этой заявке. В других вариантах осуществления константные области могут быть изменены для получения вариантов.

При выводе этих вариантов следует руководствоваться описанным в данном документе процессом. Варианты переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи могут быть получены путем внесения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую переменные области тяжелой цепи и переменные области легкой цепи, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции, и/или вставки, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи. Любая комбинация делеции, вставки и замены может быть использована для получения антител или фрагментов антител по настоящему изобретению при условии, что они обладают желаемыми характеристиками, например, связыванием антигена с CTLA4 человека и/или условной активностью.

Варианты замен, вставок и делеции.

В определенных вариантах осуществления предложены антитела или варианты их фрагментов, содержащие одну или более аминокислотных замен. Сайты, представляющие интерес для замещающего мутагенеза, включают CDR и каркасные области (FR). Консервативные замены показаны в табл. 1 под заголовком "консервативные замены". Более существенные изменения представлены в табл. 1 под заголовком "иллюстративные замены", и как дополнительно описано ниже со ссылкой на классы аминокислотных боковых цепей. Аминокислотные замены могут быть введены в представляющее интерес антитело или фрагмент антитела, а продукты подвергнуты скринингу на предмет желаемой активности, например, сохранение/улучшение связывания антигена или снижения иммуногенности.

Таблица 1

## Аминокислотные замены

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

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

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

- (1) гидрофобные: Норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислотные: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены приводят к замене члена одного из этих классов на члена другого класса.

Один тип заменяемого варианта включает замену одного или более остатков гипервариабельной области исходного антитела (например, гуманизированное или человеческое антитело). Как правило, полученный вариант(ы), выбранный для дальнейшего изучения, будет иметь модификации (например, улучшения) определенных биологических свойств (например, повышенную аффинность, пониженную иммуногенность) по сравнению с исходным антителом, и/или будет иметь по существу сохраненные определенные биологические свойства исходного антитела. Иллюстративным замещающим вариантом является антитело с созревшей аффинностью, которое традиционно можно получить, например, применяя методы созревания на основе фагового дисплея, такие как те, что описаны в данном документе. Вкратце один или более аминокислотных остатков CDR подвергают мутации и варианты антитела экспонируют на поверхности фага и проводят скрининг в отношении конкретного вида биологической активности (например, аффинности связывания).

Изменения (например, замещения) могут быть сделаны в CDR, например, для улучшения аффинности антитела. Такие изменения могут быть произведены в "горячих точках" CDR, т.е. остатках, кодируемых кодонами, которые подвергаются мутации с высокой частотой во время процесса соматического созревания (см., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.*, vol. 207, pp. 179-196, 2008), и/или SDR (a-CDR), при этом полученный вариант V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> тестируется на аффинность связывания. Созревание аффинности путем конструирования и повторного отбора из вторичных библиотек было описано, например, в Hoogenboom et al., in *Methods in Molecular Biology*, vol. 178, pp. 1-37, 2001). В некоторых вариантах осуществления аффинного созревания, многообразие вводится в переменные гены, выбранные для созревания любым из множества способов (например, ПЦР пониженной точности, перестановкой цепи или олигонуклеотид-направленным мутагенезом). Затем создают вторичную библиотеку. Затем проводят скрининг библиотеки для идентификации любых вариантов антител с требуемой аффинностью. Другой способ для внесения разнообразия включает подходы, направленные на CDR, в которых несколько аминокислотных остатков CDR (4-6 аминокислотных остатков подряд) являются рандомизированными. Остатки CDR, вовлеченные в связывание антигена, могут быть специфически идентифицированы, например, с использованием аланин-сканирующего мутагенеза или моделирования. Мишенями в частности являются CDR-H3 и CDR-L3.

В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции могут совершаться внутри одной или более HVR при условии, что такие изменения существенно не снижают способность антитела или фрагмента антитела связывать антиген. Например, в CDR можно проводить консервативные замены (например, консервативные замены, предложенные в данном документе), которые существенно не снижают аффинность связывания. Такие изменения могут происходить за пределами "горячих точек" CDR или SDR. В некоторых вариантах осуществления в вариантах последовательностей V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, приведенных ранее, каждая CDR или не изменена, или содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

Удобный способ выявления остатков или областей антитела, которые могут быть мишенями для мутагенеза, называется "аланин-сканирующим мутагенезом", описанным в Cunningham and Wells, Science, vol. 244, pp. 1081-1085, 1989. В данном способе аминокислотный остаток или группу целевых аминокислотных остатков (например, заряженные аминокислотные остатки, такие как Arg, Asp, His, Lys и Glu) идентифицируют и заменяют нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или полиаланином) для определения влияния на взаимодействие антитела или фрагмента антитела с антигеном. Дополнительные замены могут быть внесены в те расположения аминокислот, которые проявляли функциональную чувствительность к исходным заменам. В альтернативном или дополнительном варианте используют кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом или фрагментом антитела и антигеном. Такие контактные остатки и расположенные рядом остатки можно использовать в качестве мишеней или удалять из кандидатов для замены. Варианты могут быть подвергнуты скринингу для определения наличия в них желаемых свойств.

Вставки аминокислотной последовательности включают N- и/или C-концевые гибриды, имеющие длину в диапазоне от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или более аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым остатком метионила. Другие инсерционные варианты антитела включают слияние с N-или C-концом антитела с ферментом (например, для терапии ADEPT) или полипептидом, который увеличивает время полужизни в сыворотке крови.

Предполагаются модификации аминокислотной последовательности описанных в данном документе антител. Например, может быть желательно улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Известно, что когда гуманизованное антитело получают путем простой трансплантации только CDR в  $V_H$  и  $V_L$  антитела, полученного от нечеловеческого животного, в FR  $V_H$  и  $V_L$  человеческого антитела, антигенсвязывающая активность снижается по сравнению со связывающей активностью антигена, исходное антитело, полученное от животного, отличного от человека. Считается, что несколько аминокислотных остатков  $V_H$  и  $V_L$  нечеловеческого антитела, не только в CDR, но также и в FR, прямо или косвенно связаны с антигенсвязывающей активностью. Следовательно, замена этих аминокислотных остатков на другие аминокислотные остатки, полученные из FR  $V_H$  и  $V_L$  человеческого антитела, снизила бы связывающая активность. Чтобы решить эту проблему, в антителах с привитыми человеческими CDR должны быть предприняты попытки идентифицировать среди аминокислотных последовательностей FR  $V_H$  и  $V_L$  человеческих антител аминокислотный остаток, который непосредственно связан со связыванием с антителом, или который взаимодействует с аминокислотным остатком CDR, или который поддерживает трехмерную структуру антитела и который непосредственно связан со связыванием с антигеном. Сниженная антигенсвязывающая активность может быть увеличена путем замены идентифицированных аминокислот аминокислотными остатками исходного антитела, полученного от животного, отличного от человека.

Модификации и изменения могут быть внесены в структуру антител по настоящему изобретению и в последовательности ДНК, кодирующие их, и все же получить функциональную молекулу, которая кодирует антитело с желательными характеристиками.

При внесении изменений в аминокислотные последовательности можно учитывать индекс гидропатичности аминокислот. Важность индекса гидропатичности аминокислот в придании интерактивной биологической функции белку, как правило, учитывается в данной области техники. Принято считать, что относительный гидропатический характер аминокислоты вносит свой вклад во вторичную структуру образующегося белка, который, в свою очередь, определяет взаимодействие белка с другими молекулами, например, ферментами, субстратами, рецепторами, ДНК, антителами, антигенами, и тому подобное. Каждой аминокислоте был присвоен индекс гидрофобности на основе их гидрофобности и характеристик заряда, а именно: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспартат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9); и аргинин (-4,5).

Другой объект по настоящему изобретению также включает функционально-консервативные варианты антител по настоящему изобретению.

"Функционально-консервативные варианты" представляют собой варианты, в которых данный аминокислотный остаток в белке или ферменте был изменен без изменения общей конформации и функции полипептида, включая, но не ограничиваясь этим, замену аминокислоты на аминокислоту с аналогичными свойствами (такими, например, как полярность, потенциал водородного связывания, кислотность, основность, гидрофобность, ароматичность и тому подобное). Аминокислоты, отличные от тех, которые указаны как консервативные, могут отличаться в белке, поэтому процент сходства белка или аминокислотной последовательности между любыми двумя белками с аналогичной функцией может варьироваться и может составлять, например, от 70% до 99%, как определено в соответствии со схемой выравнивания, такой как кластерный метод, в котором подобие основано на алгоритме MEGALIGN. "Функционально-консервативный вариант" также включает полипептид, который имеет по меньшей мере

ре 60% аминокислотной идентичности, как определено алгоритмами BLAST или FASTA, предпочтительно по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, еще предпочтительно по меньшей мере 90% и даже более предпочтительно по меньшей мере 95% и который имеет такие же или практически аналогичные свойства или функции, как нативный или исходный белок, с которым его сравнивают.

Две аминокислотные последовательности являются "в значительной степени гомологичными" или "в значительной степени подобными", когда более 80%, предпочтительно более 85%, предпочтительно более 90% аминокислот идентичны или более около 90%, предпочтительно более 95% подобны (функционально идентичны) по всей длине более короткой последовательности. Предпочтительно, аналогичные или гомологичные последовательности идентифицируются путем выравнивания с использованием, например, программы *pileup* GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, WI) или любого из алгоритмов сравнения последовательностей, таких как BLAST, FASTA и др.

Например, некоторые аминокислоты могут быть заменены другими аминокислотами в структуре белка без заметной потери активности. Поскольку интерактивная способность и природа белка определяют его биологическую функциональную активность, определенные аминокислотные замены могут быть произведены в последовательности белка и, конечно же, в его кодирующей последовательности ДНК, при этом получая белок с аналогичными свойствами. Таким образом, предполагается, что различные изменения могут быть внесены в последовательности антител или фрагментов антител по изобретению или соответствующие последовательности ДНК, которые кодируют указанные антитела или фрагменты антител, без заметной потери их биологической активности.

В данной области техники известно, что некоторые аминокислоты могут быть заменены другими аминокислотами, имеющими аналогичный индекс или показатель гидропатичности, и все же в результате образуется белок с аналогичной биологической активностью, то есть по-прежнему образуется биологически функционально эквивалентный белок.

Как указано выше, аминокислотные замены обычно основаны на относительном сходстве аминокислотных заместителей в боковой цепи, например, на их гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и т.п. Примеры замен, которые принимают во внимание различные из вышеперечисленных характеристик, хорошо известны специалистам в данной области техники и включают: аргинин и лизин; глутамат и аспарат; серин и треонин; глутамин и аспарагин; и валин, лейцин и изолейцин.

#### Варианты гликозилирования.

В определенных вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, изменено с целью увеличения или уменьшения степени гликозилирования антитела. Добавление или удаление сайтов гликозилирования в антителе легко осуществить путем изменения аминокислотной последовательности, приводящего к созданию или удалению одного или более сайтов гликозилирования.

Если антитело содержит область Fc можно изменять присоединенный к ней углевод. Нативные антитела, вырабатываемые клетками млекопитающих, как правило, содержат разветвленный, биантеннальный олигосахарид, который в общем случае присоединен посредством N-линкера к Asn297 домена CH2 области Fc; см., например, Wright et al., TIBTECH, vol. 15, pp. 26-32, 1997. Олигосахарид может содержать различные углеводы, например, маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в "стволе" биантеннальной олигосахаридной структуры. В некоторых вариантах осуществления могут быть сделаны модификации олигосахаридной структуры по изобретению для создания вариантов антител с определенными улучшенными свойствами.

В одном варианте осуществления предложены варианты антител, в которых углеводная структура, присоединенная (или непосредственно, или опосредованно) к области Fc, имеет сниженное содержание фукозы. Например, количество фукозы в таком антителе может составлять от 1% до 80%, от 1% до 65%, от 5% до 65% или от 20% до 40%. Количество фукозы определяют, рассчитывая среднее количество фукозы в сахарной цепи Asn297 относительно общего количества гликоструктур, присоединенных к Asn 297 (например, комплексных, гибридных или содержащих большое количество маннозы структур), согласно данным масс-спектрометрии MALDI-TOF, как описано, например, в WO 2008/077546. Asn297 относится к остатку аспарагина, расположенному в положении 297 в области Fc (согласно нумерации EU остатков области Fc); при этом Asn297 также может быть расположен на около  $\pm 3$  аминокислот выше или ниже положения 297, т.е. между положениями 294 и 300, вследствие незначительных вариаций последовательностей в антителах. Такие фукозилированные варианты могут обладать улучшенной функцией АЗКЦ; см., например, патентные публикации США № US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Примеры публикаций, связанных с "дефукозилированными" или "фукозодефицитными" вариантами антитела включают: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al., J. Mol. Biol., vol. 336, pp. 1239-1249, 2004; Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng., vol. 87, pp. 614-622, 2004. Примеры клеточных линий, способных продуцировать дефукозилированные антитела, включают клетки Lec13 CHO с недостатком фукозилирования

белка (Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys., vol. 249, pp. 533-545, 1986; заявки на патент США № US 2003/0157108 A; и WO 2004/056312 A1, особенно, в примере 11), и нокаутные линии клеток, такие как нокаутные клетки CHO по гену альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8, (см., например, Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng., vol. 87, pp. 614-622, 2004; Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., vol. 94, pp. 680-688, 2006; и W02003/085107).

Кроме того, предлагаются варианты антитела с олигосахаридами, разделенными пополам, например, в которых биантеннальный олигосахарид, присоединенный к области Fc антитела, разделен пополам при помощи GlcNAc. Такие варианты антител могут обладать сниженным уровнем фукозилирования и/или улучшенной функцией АЗКЦ. Примеры таких вариантов антител описаны, например, в WO 2003/011878; патенте США № 6602684; и US 2005/0123546. Также предлагаются варианты антител с по меньшей мере одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к области Fc. Такие варианты антител могут иметь улучшенную функцию КЗЦ. Такие варианты антител описаны, например, в WO 1997/30087; WO 1998/58964; и WO 1999/22764.

Варианты области Fc.

В определенных вариантах осуществления в область Fc антитела, предложенного в данном документе, могут быть введены одна или более аминокислотных модификаций, тем самым обеспечивая создание варианта области Fc. Вариант области Fc может содержать последовательность человеческой области Fc (например, человеческой области Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или более аминокислотных положениях.

В определенных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает вариант антитела, который обладает некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает его подходящим кандидатом для практических применений, в которых важное значение имеет период полужизни антитела *in vivo*, хотя отдельные эффекторные функции (такие как АЗКЦ) не являются необходимыми или являются вредными. Цитотоксические анализы могут быть проведены *in vitro* и/или *in vivo* для подтверждения восстановления/ослабления активности КЗЦ и/или АЗКЦ. Например, чтобы убедиться в отсутствии связывания антитела с FcR (и, следовательно, отсутствии активности АЗКЦ) при сохранении способности связывания с FcRn, можно выполнить анализы связывания с Fc-рецептором (FcR). Первичные клетки, опосредующие АЗКЦ, естественные клетки-киллеры, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках приведена в табл. 3 на с. 464 в Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol., vol. 9, pp. 457-492, 1991. Неограничивающие примеры анализов *in vitro* для оценки активности АЗКЦ представляющей интерес молекулы описаны в патенте США № 5500362 (см. также, например, Hellstrom et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, vol. 83, pp. 7059-7063, 1986) и Hellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, vol. 82, pp. 1499-1502, 1985; патенте США № 5821337 (см. также Bruggemann et al., J. Exp. Med., vol. 166, pp. 1351-1361, 1987). В альтернативном варианте могут быть использованы нерадиоактивные методы анализа (см., например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности АСТП™ для проточной цитометрии (CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, Калифорния; и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96® (Promega, Мадисон, Висконсин). Эффекторные клетки, пригодные для такого анализа, включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и естественные клетки-киллеры (NK). В качестве альтернативы или дополнения, АЗКЦ-активность молекулы, представляющей интерес, можно оценить *in vivo*, например, в животной модели, например, согласно описанию в публикации Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, vol. 95, pp. 652-656, 1998. Также можно проводить анализ связывания C1q, чтобы подтвердить, что антитело неспособно связывать C1q и, следовательно, у него отсутствует активность КЗЦ; см., например, анализ связывания C1q и C3c методом ИФА в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента может быть проведен анализ КЗЦ (см., например, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, vol. 202, pp. 163-171, 1996; Cragg, M.S. et al., Blood, vol. 101, pp. 1045-1052, 2003; и Cragg, M.S., and M.J. Glennie, Blood, vol. 103, pp. 2738-2743, 2004). Определение связывания с FcRn и *in vivo* клиренса/времени полужизни также может быть выполнено с использованием способов, известных в данной области техники (см., например, Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol., vol. 18, pp. 1759-1769, 2006).

Антитела со сниженной эффекторной функцией включают те, которые содержат замены одного или более из остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 области Fc (патент США № 6737056). Такие мутанты Fc включают мутантов Fc с заменами в двух или более аминокислотных положениях 265, 269, 270, 297 и 327, в том числе так называемые мутанты Fc "DANA" с заменой остатков 265 и 297 на аланин (патент США № 7332581).

Описаны некоторые модификации антитела с улучшенным или уменьшенным связыванием с FcR. (см., например, патент США № 6737056; WO 2004/056312, и Shields et al., J. Biol. Chem., vol. 9, pp. 6591-6604, 2001).

В определенных вариантах осуществления вариант антитела содержит область Fc с одной или более аминокислотными заменами, которые улучшают АЗКЦ, например, с заменами в положениях 298, 333 и/или 334 области Fc (нумерация остатков по системе EU).

В некоторых вариантах осуществления изменения сделаны в области Fc, что привело к изменению

(то есть или к улучшению, или к ухудшению) связывания C1q и/или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), например, как описано в патенте США № 6194551, WO 99/51642, и Idusogie et al., J. Immunol., vol. 164, pp. 4178-4184, 2000.

Антитела с увеличенным временем полужизни и улучшенным связыванием с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который отвечает за перенос материнских IgG к плоду (Guyer et al., J. Immunol., vol. 117, pp. 587-593, 1976 и Kim et al., J. Immunol., vol. 24, p. 249, 1994), описаны в US2005/0014934. Данные антитела содержат область Fc с одной или более заменами в ней, которые улучшают связывание области Fc с FcRn. Такие варианты Fc включают варианты с заменами одного или более остатков области Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например, замену аминокислотного остатка 434 в области Fc (патент США № 7371826); см. также Duncan & Winter, Nature, vol. 322, pp. 738-740, 1988; U.S. Pat. № 5648260, в патенте США № 5624821; и WO 94/29351 в отношении других примеров вариантов области Fc.

Варианты антител, сконструированные с цистеином.

В определенных вариантах осуществления может быть желательно создать сконструированные антитела с цистеином, например, "thioMAb", в которых один или более остатков антитела замещены остатками цистеина. В конкретных вариантах осуществления замещенные остатки расположены в доступных участках антитела. За счет замещения этих остатков цистеином реактивные тиоловые группы тем самым размещаются в доступных сайтах антитела и могут использоваться для конъюгирования антитела с другими фрагментами, такими как лекарственные фрагменты или линкер-лекарственные фрагменты, для создания иммуноконъюгата, как описано далее в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления цистеином можно заменить один или более из следующих остатков: V205 (нумерация по Kabat) в легкой цепи, A118 (нумерация EU) в тяжелой цепи и S400 (нумерация EU) в области Fc тяжелой цепи. Антитела, сконструированные с цистеином, могут быть получены, как описано, например, в патенте США № 7521541.

Производные антитела.

В определенных вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, предложенное в данном документе, может быть дополнительно модифицировано для включения дополнительных небелковых фрагментов, которые известны в данной области техники и общедоступны. Фрагменты, пригодные для получения производных антитела или фрагмента антитела, включают, без ограничений, водорастворимые полимеры. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают, без ограничений, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливинилового спирта, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры), декстран или поли(п-винилпирролидон) полиэтиленгликоль, гомополимеры пропропиленгликоля, сополимеры оксида/этиленоксида, полиоксипропиленгликоля полиолы (например, глицерин), поливинилового спирта и их смеси. Пропиональдегид полиэтиленгликоля может иметь преимущество при производстве вследствие его стабильности в воде. Указанный полимер может обладать любой молекулярной массой и быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, присоединенных к антителу или фрагменту антитела, может изменяться и, в случае присоединения более одного полимера, они могут представлять собой одинаковые или разные молекулы. В общем, количество и/или тип полимеров, используемых для дериватизации, может быть определено на основании соображений, включая конкретные свойства или функции антитела или фрагмента антитела, подлежащего улучшению, будет ли производное использоваться в терапии при определенных условиях и т.д., но не ограничиваясь ими.

В еще одном варианте осуществления изобретения предложены конъюгаты антитела или фрагмента антитела и небелкового фрагмента, которые можно избирательно нагревать путем облучения. В одном варианте осуществления изобретения небелковый фрагмент представляет собой углеродную нанотрубку (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 102, pp. 11600-11605, 2005). Излучение может иметь любую длину волны и включает, без ограничений, длины волн, которые не наносят вред обычным клеткам, но которые нагревают небелковый фрагмент до температуры, при которой клетки, расположенные близко к антитело-небелковому фрагменту, погибают.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу к CTLA4 или фрагменту антитела, включая выделенные полипептиды варибельной области тяжелой цепи или выделенные полипептиды варибельной области легкой цепи. Выделенные полипептиды варибельной области тяжелой цепи содержат области H1 H2 и H3 с SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38. Выделенные полипептиды варибельной области легкой цепи содержат области L1, L2 и L3 с SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37.

Антитело к CTLA4 или фрагмент антитела по изобретению обладает более высокой аффинностью связывания с CTLA4 при параметрах в опухолевом микроокружении, чем при значении параметра в неопухолевом микроокружении. В одном варианте осуществления параметр в опухолевом микроокружении и параметр в неопухолевом микроокружении представляет собой pH. Таким образом, антитела к CTLA4 или фрагменты антител по изобретению могут селективно связываться с CTLA4 при pH около 5,0-6,8, но будут иметь более низкую аффинность связывания с CTLA4 при pH около 7,2-7,8, которая

соответствует нормальной физиологической среде. Как показали Примеры 2-3, антитела к CTLA4 или фрагменты антител имеют более высокую аффинность связывания с CTLA4 при pH 6,0, что при pH 7,4.

В определенных вариантах осуществления антитела к CTLA4 или фрагменты антитела по данному изобретению имеют постоянную диссоциацию ( $K_D$ ) с CTLA4 при параметре в опухолевом микроокружении около  $\leq 1$  пМ,  $\leq 100$  нМ,  $\leq 10$  нМ,  $\leq 1$  нМ,  $\leq 0,1$  нМ,  $\leq 0,01$  нМ, или  $0,001$  нМ (например,  $10^{-8}$  М или менее, или от  $10^{-8}$  М до  $10^{-13}$  М, или от  $10^{-9}$  М до  $10^{-13}$  М). В одном варианте осуществления соотношение  $K_D$  антитела или фрагмента антитела с CTLA4 при значении параметра в опухолевом микроокружении к  $K_D$  при отличном значении того же параметра в неопуховом микроокружении составляет по меньшей мере около 1,5:1, по меньшей мере около 2:1, по меньшей мере около 3:1, по меньшей мере около 4:1, по меньшей мере около 5:1, по меньшей мере около 6:1, по меньшей мере около 7:1, по меньшей мере около 8:1, по меньшей мере около 9:1, по меньшей мере около 10:1, по меньшей мере около 20:1, по меньшей мере около 30:1, по меньшей мере около 50:1, по меньшей мере около 70:1 или по меньшей мере около 100:1.

В одном варианте осуществления  $K_D$  измеряют при помощи анализа связывания антигена, меченного радиоактивным изотопом (РИА), выполняемого с Fab-версией представляющего интерес антитела и его антигеном с использованием следующего анализа. Аффинность связывания Fab в растворе в отношении антигена измеряют, уравнивая Fab минимальной концентрацией ( $^{125}\text{I}$ )-меченного антигена в присутствии ряда титров немеченого антигена, затем иммобилизуя связанный антиген на покрытом анти-Fab антителом планшете (см., например, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)). Чтобы определить условия анализа, многолуночные планшеты MICROTITER® (Thermo Scientific) покрывали в течение ночи захватывающим антителом против Fab (Cappel Labs) в концентрации 5 мкг/мл в 50 мкМ растворе карбоната натрия (pH 9,6), а затем блокировали 2 % мас./об. раствором бычьего сывороточного альбумина в PBS в течение от двух до пяти часов при комнатной температуре (около 23°C). В неадсорбентном планшете (Nunc № 269620) смешивали 100 пМ или 26 пМ [ $^{125}\text{I}$ ]-антигена с серийными разведениями целевого Fab (например, в соответствии с оценкой антитела к ФРЭС, Fab-12, в Presta et al., Cancer Res. 57:45934599 (1997)). Затем представляющий интерес Fab инкубировали в течение ночи; однако инкубацию можно продолжать в течение более длительного периода (например, около 65 ч), чтобы обеспечить достижение равновесия. Затем смесь переносили на планшет для захвата и инкубировали при комнатной температуре (например, в течение часа). Затем раствор удаляют и планшет промывают восемь раз 0,1% раствором полисорбата 20 (TWEEN-20®) в ФСБ. После высушивания планшетов добавляли 150 мкл/луночку сцинтиллятора (MICROSCINT-20™; Packard), а планшеты считывали на счетчике гамма-излучения TOPCOUNT™ (Packard) в течение десяти минут. Концентрации каждого Fab, обеспечивавшие связывание, меньшее или равное 20% от максимального, отбирали для использования в конкурентном анализе связывания.

Согласно другому варианту осуществления,  $K_D$  измеряется с использованием анализов методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием BIACORE®-2000 или BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Пискатауэй, штат Нью-Джерси) при 25°C с чипами CM5 с иммобилизованным антигеном при около 10 единицах ответа (RU). Вкратце, биосенсорные чипы карбоксиметилированного декстрана (CM5, BIACORE, Inc.) активируют гидрохлоридом N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодимидом (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями поставщика. Антиген разводят 10 мкМ ацетата натрия, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед инъекцией при скорости потока 5 мкл/минута для достижения приблизительно 10 единиц ответа (RU) связанного белка. После введения антигена вводили 1 М раствор этаноламина для блокирования непрореагировавших групп. Для измерений кинетики двукратные серии разведений Fab (от 0,78 нМ до 500 нМ) вводили в PBS с 0,05% полисорбат 20 (TWEEN-20™) сурфактантом (PBST) при 25°C при расходе приблизительно 25 мкл/мин. Скорости ассоциации ( $k_{on}$ ) и диссоциации ( $k_{off}$ ) рассчитывали как простые однозначные модели связывания Лангмюра (BIACORE® Evaluation Software version 3.2) путем одновременной подгонки сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации ( $K_D$ ) рассчитывали как отношение  $k_{off}/k_{on}$ ; см., например, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Если скорость превышает  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  из вышеописанного способа поверхностного плазмонного резонанса, то скорости прямой реакции могут быть определены при помощи метода затухания флуоресценции, который измеряет повышение или понижение интенсивности флуоресцентного излучения (возбуждение=295 нм; излучение=340 нм, 16 нм полоса пропускания) при температуре 25°C 20 нМ антитела к антигена (Fab-форма) в PBS, при pH 7,2, в присутствии увеличивающихся концентраций антигена, что измеряется спектрометром, таким как спектрофотометр с устройством остановки потока (Aviv Instruments) или спектрометр SLM-AMINCO™ 8000 серии (ThermoSpectronic) с перемешивающей кюветой.

Антитела к CTLA4 по изобретению могут быть химерными, гуманизированными или человеческими антителами. В одном варианте осуществления используется фрагмент антитела к CTLA4, например, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, диатело, триатело, тетратело или фрагмент  $F(ab')_2$  и полиспецифические антитела, полученные из фрагментов антител. В другом варианте осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело, например, интактное антитело IgG или другой класс или изотип анти-



тел, как определено в данном документе. Обзор некоторых фрагментов антител см. в Hudson et al., *Nat. Med.*, vol. 9, pp. 129-134, 2003. Для обзора фрагментов scFv см., например, Pluckthun, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); см. также WO 93/16185; патенты США №№ 5571894 и 5587458. Обсуждения фрагментов Fab и F(ab')<sub>2</sub>, содержащих остатки эпитопа, связывающего рецептор реутилизации, и имеющих увеличенный период полужизни *in vivo*, приведены в патенте США № 5869046.

Диатела по изобретению могут быть двухвалентными или биспецифическими; см., например, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); и Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 90, pp. 6444-6448, 1993 для примеров диател. Примеры триател и тетрател также описаны в Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134, 2003.

В некоторых вариантах осуществления изобретение содержат однодоменные фрагменты антитела, содержащие весь или часть варибельного домена тяжелой цепи или весь или часть варибельного домена легкой цепи антитела. В определенных вариантах осуществления однодоменное антитело представляет собой однодоменное человеческое антитело (Domantis, Inc., Уолтем, штат Массачусетс; см., например, патент США № 6248516 B1).

Фрагменты антител могут быть получены различными способами, включая, без ограничений, протеолитическое расщепление интактного антитела, а также получение при помощи рекомбинантных клеток-хозяев (например, *E. coli* или фага), как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CTLA4 по изобретению могут представлять собой химерные антитела. Некоторые химерные антитела описаны, например, в патентах США № 4816567; и Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 81, pp. 6851-6855, 1984). В одном примере химерное антитело содержит нечеловеческую варибельную область (например, варибельную область, полученную от мыши, крысы, хомяка, кролика или отличного от человека примата, такого как обезьяна) и человеческую константную область. В дополнительном примере химерное антитело представляет собой антитело с "переключенным классом", в котором класс или подкласс антитела был изменен относительно класса или подкласса исходного антитела. Термин "химерные антитела" включает антигенсвязывающие фрагменты таких антител.

В определенных вариантах осуществления химерное антитело по изобретению представляет собой гуманизованное антитело. Как правило, такое антитело нечеловеческого происхождения гуманизируют с целью снижения иммуногенности для человека, сохраняя при этом специфичность и аффинность исходного антитела нечеловеческого происхождения. Как правило, гуманизованное антитело содержит один или более варибельных доменов, в которых CDR (или их части) получают из нечеловеческого антитела, а FR (или их части) получают из последовательностей человеческих антител. Гуманизованное антитело также может необязательно содержать по меньшей мере часть человеческой константной области. В некоторых вариантах осуществления некоторые остатки FR в гуманизованном антителе замещены соответствующими остатками нечеловеческого антитела (например, антитела, из которого получены остатки CDR), например, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

Гуманизованные антитела и способы их получения рассмотрены, например, в Almagro and Fransson, *Front. Biosci.*, vol. 13, pp. 1619-1633, 2008, и дополнительно описаны, например, в Riechmann et al., *Nature*, vol. 332, pp. 323-329, 1988; Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, vol. 86, pp. 10029-10033, 1989; патентах США №№ 5821337, 7527791, 6982321, и 7087409; Kashmiri et al., *Methods*, vol. 36, pp. 25-34, 2005 (где описано прививание SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.*, vol. 28, pp. 489-498, 1991 (где описано "изменение поверхности"); Dall'Acqua et al., *Methods*, vol. 36, pp. 43-60, 2005 (где описано "перетасовка FR"); и Osbourn et al., *Methods*, vol. 36, pp. 61-68, 2005 и Klimka et al., *Br. J. Cancer*, vol. 83, pp. 252-260, 2000 (где описан подход "направленного отбора" к перетасовке FR).

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

В некоторых вариантах осуществления антитела к CTLA4 по изобретению представляют собой полиспецифические, например, биспецифические антитела. Полиспецифические антитела представляют собой моноклональные антитела, которые имеют специфичности связывания в отношении по меньшей мере двух различных сайтов. В некоторых вариантах осуществления одна из специфичностей связывания относится к CTLA4, а другая - к еще одному антигену. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела могут связываться с двумя разными эпитопами CTLA4. Биспецифические антитела

также можно использовать для локализации цитотоксических агентов в клетках, экспрессирующих CTLA4. Биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител.

Методы получения полиспецифических антител включают рекомбинантную коэкспрессию двух пар тяжелая цепь-легкая цепь иммуноглобулина, имеющих разные специфичности (см. Milstein and Cuello, *Nature*, vol. 305, pp. 537-540, 1983), WO 93/08829, и Traunecker et al., *EMBO J.* vol. 10, pp. 3655-3659, 1991), и конструирование "выступ-во-впадину" (см., например, патент США № 5731168), но не ограничиваются ими. Полиспецифические антитела также могут быть получены путем конструирования с использованием эффекта электростатического взаимодействия для получения молекул Fc-гетеродимерных антител (WO 2009/089004A1); путем перекрестного связывания двух или более антител или фрагментов (см., например, патент США № 4676980, и Brennan et al., *Science*, vol. 229, pp. 81-83, 1985); с использованием лейциновых застезек для создания биспецифических антител (см., например, Kostelny et al., *J. Immunol.*, vol. 148, pp. 15471553, 1992); с использованием технологии "диател" для получения фрагментов биспецифических антител (см., например, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 90, pp. 6444-6448, 1993); и с использованием однопочечных димеров Fv (scFv) (см., например, Gruber et al., *J. Immunol.*, vol. 152, pp. 5368-5374, 1994); и получения триспецифических антител, как описано, например, в Tutt et al., *J. Immunol.*, vol. 147, pp. 60-69, 1991.

Сконструированные антитела с тремя или более функциональными антигенсвязывающими сайтами, включая "антитела-осьминоги", также включены в данный документ (см., например, US 2006/0025576A1).

Антитела к CTLA4 или фрагменты антител по изобретению могут быть получены с использованием рекомбинантных методов и композиций, которые подробно описаны в US 2016/0017040.

Физические/химические свойства и/или биологическая активность антител к CTLA4 или фрагментов антител по изобретению можно тестировать и измерять при помощи различных анализов, известных в данной области техники. Некоторые из этих анализов описаны в патенте США № 8853369.

#### В. Иммуноконъюгаты.

В другом аспекте изобретение также обеспечивает иммуноконъюгаты, содержащие антитело к CTLA4 или фрагмент антитела, конъюгированные с одним или более цитотоксическими агентами, такими как химиотерапевтические агенты или лекарственные средства, агенты, ингибирующие рост, токсины (например, белковые токсины, ферментативно активные токсины бактерий, грибного, растительного или животного происхождения или их фрагменты) или радиоактивные изотопы.

В одном варианте осуществления иммуноконъюгат представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), в котором антитело или фрагмент антитела конъюгировано с одним или более лекарственными средствами, включая, но не ограничиваясь ими, майтанзиноид (см. №№ 5208020, 5416064 и Европейский патент EP 0425235 B1); ауристин, такой как лекарственные фрагменты монометилауристинина DE и DF (MMAE и MMAF) (см. патенты США №№ 5635483, 5780588 и 7498298); доластин; калихеамицин или его производное (см. патенты США №№ 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001 и 5877296; Hinman et al., *Cancer Res.*, vol. 53, pp. 3336-3342, 1993; и Lode et al., *Cancer Res.*, vol. 58, pp. 2925-2928, 1998); антрациклин, такой как дауномицин или доксорубин (см. Kratz et al., *Current Med. Chem.*, vol. 13, pp. 477-523, 2006; Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters*, vol. 16, pp. 358362, 2006; Torgov et al., *Bioconj. Chem.*, vol. 16, pp. 717-721, 2005; Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 97, pp. 829-834, 2000; Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters*, vol. 12, vol. 1529-1532, 2002; King et al., *J. Med. Chem.*, vol. 45, pp. 4336-4343, 2002; и патент США № 6630579); метотрексат; виндезин; таксан, такой как доцетаксел, паклитаксел, ларотаксел, тезетаксел и ортатаксел; трихотецен; и CC1065.

В еще одном варианте осуществления иммуноконъюгат включает антитело или фрагмент антитела, как описано в данном документе, конъюгированный с ферментативно активным токсином или его фрагментом, включая, но не ограничиваясь ими, А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, цепь модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор мыльнянки лекарственной, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены.

В другом варианте осуществления иммуноконъюгат содержит антитело или фрагмент антитела, как описано в данном документе, конъюгированное с радиоактивным атомом с образованием радиоаконъюгата. Для производства радиоаконъюгатов доступны различные радиоактивные изотопы. Примеры включают  $^{211}\text{At}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{212}\text{Pb}$  и радиоактивные изотопы Lu. Когда радиоаконъюгат используется для обнаружения, он может содержать радиоактивный атом для скинтиграфических исследований, например,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  или  $^{123}\text{I}$ , или спиновую метку для изображений ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также известную как магнитно-резонансная томография, МРТ), например, снова йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Конъюгаты антител/фрагмента антитела и цитотоксического агента могут быть получены с использованием различных бифункциональных агентов, связывающих болок, таких как N-сукцинимидил-3-(2-

пиридилдитио) пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис (п-азидобензоил) гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как 2,6-диизоцианат толуола) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин может быть получен, как описано в Vitetta et al., *Science*, vol. 238, pp. 1098-, 1987. Меченая углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является типичным хелатирующим агентом для конъюгации радионуклеотида с антителом. См. WO94/11026. Линкер может быть "расщепляемым линкером", способствующим высвобождению цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, может быть использован кислотоустойчивый линкер, чувствительный к пептидазе линкер, фотолабильный линкер, диметилловый линкер или дисульфидсодержащий линкер (Chari et al., *Cancer Res.*, Том 52, стр. 127-131, 1992; патент США № 5208020).

Иммунokonъюгаты в данном документе явно предполагают конъюгаты, полученные при помощи перекрестно-линкерных реагентов, включая, помимо прочего, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB, а также SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), которые являются коммерчески доступными (например, от Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, штат Иллинойс, США), но не ограничиваются ими.

Иллюстративный вариант осуществления ADC включает антитело или фрагмент антитела (At), которые нацелены на опухолевую клетку, лекарственный фрагмент (D) и линкерный фрагмент (L), который присоединяет At к D. В некоторых вариантах осуществления антитело присоединено к линкерному фрагменту (L) через один или более аминокислотных остатков, таких как лизин и/или цистеин.

Иллюстративный ADC имеет формулу I как At-(L-D)<sub>p</sub>, где p равен от 1 до около 20. В некоторых вариантах осуществления количество лекарственных фрагментов, которые могут быть конъюгированы с антителом, ограничено количеством свободных остатков цистеина. В некоторых вариантах осуществления свободные остатки цистеина вводят в аминокислотную последовательность антитела описанными в данном документе способами. Иллюстративный ADC с формулой I включает, но не ограничивается ими, антитела, которые содержат 1, 2, 3 или 4 сконструированные цистеиновые аминокислоты (Lyon et al., *Methods in Enzym.*, vol. 502, pp. 123-138, 2012). В некоторых вариантах осуществления один или более остатков свободного цистеина уже присутствуют в антителе без использования конструирования, и в этом случае существующие остатки свободного цистеина можно использовать для конъюгирования антитела с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления антитело подвергают воздействию восстанавливающих условий перед конъюгацией антитела для образования одного или более свободных остатков цистеина.

#### 1) Иллюстративные линкеры.

"Линкер" (L) представляет собой бифункциональный или многофункциональный фрагмент, который можно использовать для связывания одного или более фрагментов, таких как лекарственный фрагмент (D), с антителом или фрагментом антитела (At) с образованием иммунokonъюгата, такого как ADC с формулой I. В некоторых вариантах осуществления ADC могут быть получены с использованием линкера, обладающего реактивными функциональными свойствами для ковалентного присоединения к лекарственному средству и антителу. Например, в некоторых вариантах осуществления цистеин-тиол антитела или фрагмента антитела (At) может образовывать связь с реактивной функциональной группой линкера или промежуточного соединения лекарственное средство-линкер с образованием ADC.

В одном аспекте линкер имеет функциональность, которая способна реагировать со свободным цистеином, присутствующим на антителе, с образованием ковалентной связи. Неограничивающие примеры таких реактивных функциональных групп включают малеимид, галогенацетамиды, α-галогенацетил, активированные сложные эфиры, такие как сукцинимидные сложные эфиры, 4-нитрофенильные сложные эфиры, пентафторфенильные сложные эфиры, тетрафторфенильные сложные эфиры, ангидриды, хлорангидриды кислот, сульфонилхлориды, изоцианаты, и изотиоцианаты; см., например, способ конъюгации на стр. 766 Klusman, et al., *Bioconjugate Chemistry*, vol. 15, pp. 765-773, 2004.

В некоторых вариантах осуществления линкер имеет функциональность, которая способна реагировать с электрофильной группой, присутствующей на антителе. Примеры таких электрофильных групп включают, но не ограничиваются ими, карбонильные группы альдегида и кетона. В некоторых вариантах осуществления гетероатом реактивной функциональности линкера может реагировать с электрофильной группой на антителе и образовывать ковалентную связь с единицей антитела. Неограничивающие примеры таких реактивных функциональных групп включают, но не ограничиваются ими, гидразид, оксим, amino, гидразин, тиосемикарбазон, гидразинкарбоксилат и арилгидразид.

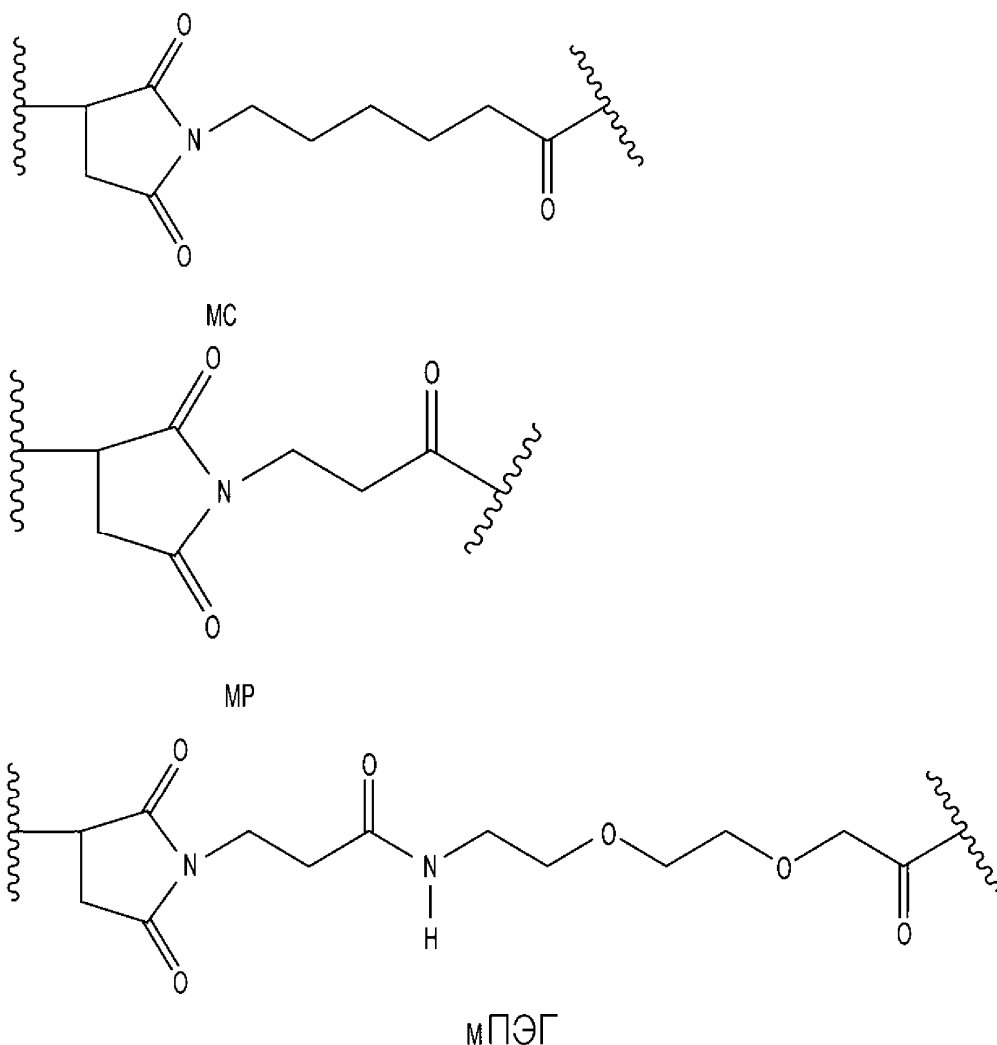
Линкер может содержать один или более линкерных компонентов. Иллюстративные линкерные компоненты включают 6-малеимидокапроил ("MC"), малеимидопропаноил ("MP"), валин-цитруллин ("val-cit" или "vc"), аланин-фенилаланин ("ala-phe"), п-аминобензилоксикарбонил ("PAB"), N-

сукцинимидил-4-(2-пиридилтио) пентаноат ("SPP") и 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат ("MCC"). Различные линкерные компоненты известны в данной области техники, некоторые из них описаны ниже.

Линкер может быть "расщепляемым линкером", облегчающим высвобождение лекарственного средства. Неограничивающие иллюстративные расщепляемые линкеры включают кислотолabile линкеры (например, содержащие гидразон), протеазочувствительные (например, чувствительные к пептидазе) линкеры, фотолabile линкеры или дисульфидсодержащие линкеры (Chari et al., *Cancer Research*, vol. 52, pp. 127-131, 1992; патенты США № 5208020).

В определенных вариантах осуществления линкер имеет следующую формулу II как  $-A_w-W_w-Y_y-$ , где A представляет собой "единицу вставки", а  $w$  представляет собой целое число от 0 до 1; W представляет собой "аминокислотную единицу", а  $w$  представляет собой целое число от 0 до 12; Y представляет собой "спейсер", а  $y$  равен 0, 1 или 2. ADC, содержащий линкер с формулой II, имеет формулу 1(A):  $At-(A_w-W_w-Y_y-D)_p$ , где At, D и p определены, как указано выше для формулы I. Иллюстративные варианты осуществления таких линкеров описаны в патентах США № 7498298.

В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент содержит "единицу вставки" (A), который связывает антитело с другим линкерным фрагментом или с лекарственным фрагментом. Неограничивающие иллюстративные единицы вставок показаны ниже (где волнистая линия указывает единицы вставки присоединения к антителу, лекарственному средству или дополнительным линкерным компонентам)



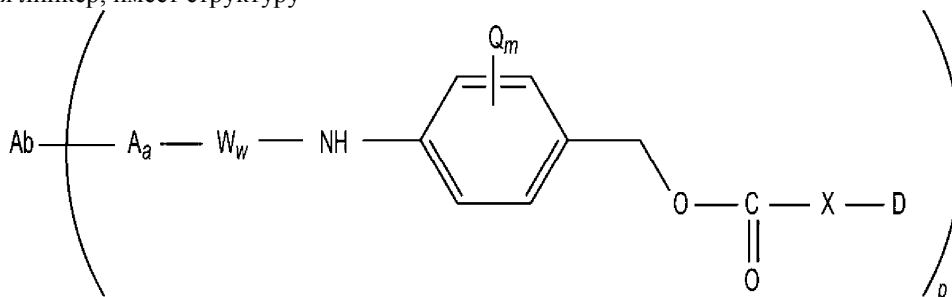
В некоторых вариантах осуществления линкерный компонент содержит "аминокислотную единицу" (W). В некоторых таких вариантах осуществления аминокислотная единица позволяет расщеплять линкер протеазой, тем самым облегчая высвобождение лекарственного средства из иммуноконъюгата при воздействии внутриклеточных протеаз, таких как лизосомальные ферменты (Doronina et al., *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, pp. 778-784, 2003). Иллюстративные аминокислотные единицы включают, но не ограничиваются ими, дипептиды, трипептиды, тетрапептиды и пентапептиды. Иллюстративные дипептиды включают, но не ограничиваются ими, валин-цитруллин (vc или val-cit), аланин-фенилаланин (af или ala-phe); фенилаланин-лизин (fk или phe-lys); фенилаланин-гомолизин (phe-гомолизин); и N-метил-валин-

цитруллин (Me-val-cit). Иллюстративные трипептиды включают, но не ограничиваются ими, глицин-валин-цитруллин (gly-val-cit) и глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly). Аминокислотная единица может содержать аминокислотные остатки, которые встречаются в природе, и/или минорные аминокислоты, и/или не встречающиеся в природе аналоги аминокислот, такие как цитруллин. Аминокислотные единицы могут быть сконструированы и оптимизированы для ферментативного расщепления конкретным ферментом, например, ассоциированной с опухолью протеазой, катепсином В, С и D или протеазой плазмином.

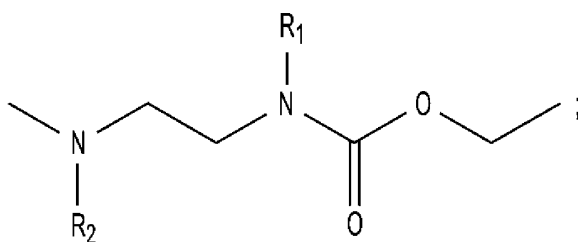
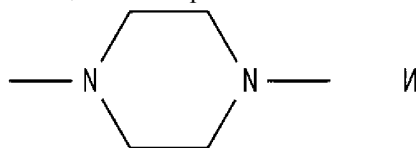
Как правило, линкеры пептидного типа могут быть получены путем образования пептидной связи между двумя или более аминокислотами и/или пептидными фрагментами. Такие пептидные связи могут быть получены, например, в соответствии со способом жидкофазного синтеза (например, E. Schroder and K. Liibke (1965) "The Peptides", volume 1, pp. 76-136, Academic Press).

В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент содержит "спейсерную единицу" (Y), которая связывает антитело с лекарственным фрагментом или напрямую, или через единицу вставки и/или аминокислотную единицу. Спейсерная единица может быть "саморасщепляющейся" или "несаморасщепляющейся". "Несаморасщепляющаяся" спейсерная единица представляет собой единицу, в которой часть или вся спейсерная единица остается связанной с лекарственным фрагментом при расщеплении ADC. Примеры несаморасщепляющихся спейсерных единиц включают, но не ограничиваются ими, спейсерную единицу глицин и спейсерную единицу глицин-глицин. В некоторых вариантах осуществления ферментативное расщепление ADC, содержащего спейсерную единицу глицин-глицин, протеазу, ассоциированную с опухолевыми клетками, приводит к высвобождению фрагмента глицин-глицин-лекарственное средство из оставшейся части ADC. В некоторых таких вариантах осуществления фрагмент глицин-глицин-лекарственное средство подвергается стадии гидролиза в опухолевой клетке, таким образом отщепляя спейсерную единицу глицин-глицин от лекарственного фрагмента.

"Саморасщепляющийся" спейсер позволяет высвобождать лекарственный фрагмент. В определенных вариантах осуществления спейсерная единица линкера включает *p*-аминобензильную единицу. В некоторых таких вариантах осуществления *p*-аминобензиловый спирт присоединен к аминокислотной единице через амидную связь, а карбамат, метилкарбамат или карбонат образуются между бензиловым спиртом и лекарственным средством (Hamann et al., Expert Opin. Ther. Patents, vol. 15, pp. 1087-1103, 2005). В некоторых вариантах осуществления спейсерная единица содержит *p*-аминобензилоксикарбонил (PAB). В некоторых вариантах осуществления ADC, содержащий саморасщепляющийся линкер, имеет структуру



где Q представляют собой  $-C_1-C_8$  алкил,  $-O-(C_1-C_8$  алкил), -галоген, -нитро или -циано; *m* равен целому от 0 до 4; X может быть одним или более дополнительными спейсерами или может участвовать; и *p* колеблется от 1 до около 20. В некоторых вариантах осуществления *p* равен от 1 до 10, от 1 до 7, от 1 до 5 или от 1 до 4. Неограничивающие иллюстративные X спейсерные единицы включают

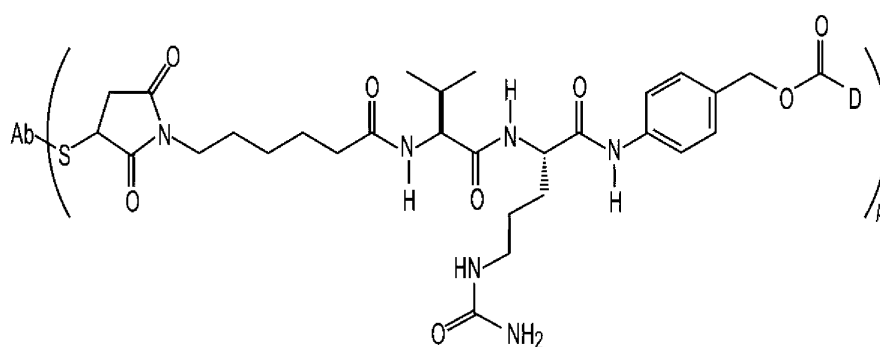
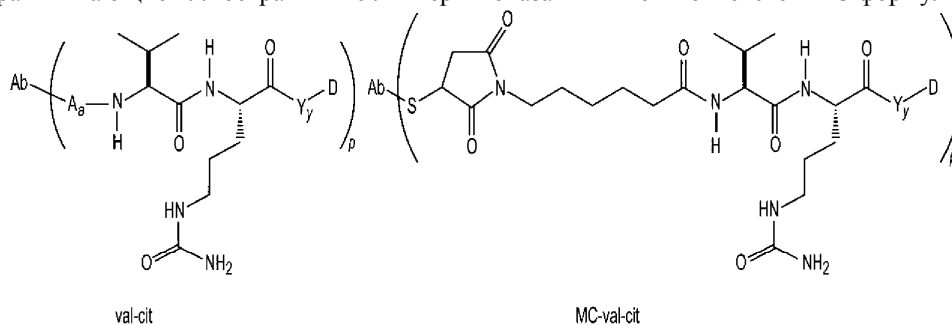


где  $R_1$  и  $R_2$  независимо выбраны из H и  $C_1-C_6$  алкила. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $R_1$  и  $R_2$  представляет собой  $-CH_3$ .

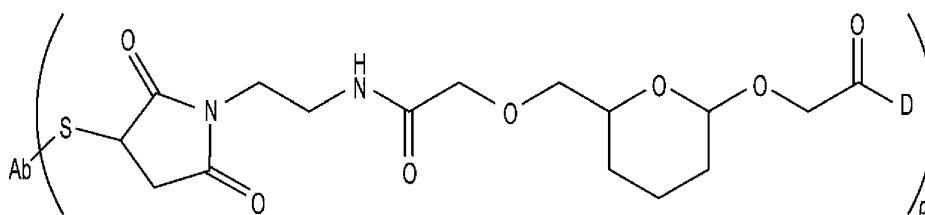
Другие примеры саморасщепляющихся спейсеров включают, но не ограничиваются ими, ароматические соединения, которые электронно подобны группе PAB, такие как производные 2-аминоимидазол-5-метанола (патент США № 7375078; Hay et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., vol. 9, p. 2237, 1999) и орто- или пара-аминобензилацетали. В некоторых вариантах осуществления могут использоваться спейсеры, которые подвергаются циклизации при гидролизе амидной связи, такие как замещенные и незамещенные амиды 4-аминомасляной кислоты (Rodrigues et al., Chemistry Biology, vol. 2, pp. 223-, 1995), соответственно замещенный бицикло[2.2.1] и бицикло[2.2.2] кольцевые системы (Storm et al., J. Amer. Chem. Soc., vol. 94, p. 5815-, 1972) и амиды 2-аминофенилпропионовой кислоты (Amsberry et al., J. Org. Chem., vol. 55, p. 5867, 1990). Связывание лекарственного средства с  $\alpha$ -углеродом остатка глицина является еще одним примером саморасщепляющегося спейсера, который может быть использован в ADC (Kingsbury et al., J. Med. Chem., vol. 27, p. 1447, 1984).

В некоторых вариантах осуществления линкер L может представлять собой линкер дендритного типа для ковалентного присоединения более чем одного лекарственного фрагмента к антителу через разветвленный многофункциональный линкерный фрагмент (Sun et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, vol. 12, pp. 2213-2215, 2002; Sun et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry, vol. 11, pp. 1761-1768, 2003). Дендритные линкеры могут увеличивать молярное отношение лекарственное средство к антителу, то есть нагрузку, которая связана с эффективностью ADC. Таким образом, если антитело несет только одну реакционноспособную тиольную группу цистеина, через дендритный линкер может быть присоединено множество лекарственных фрагментов.

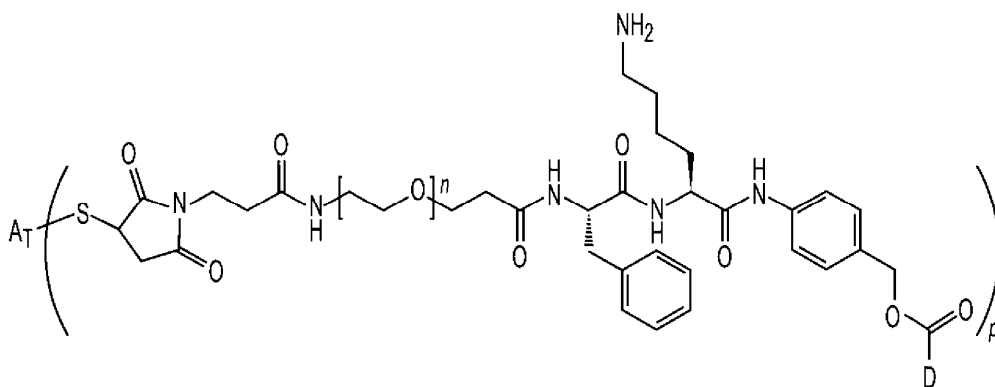
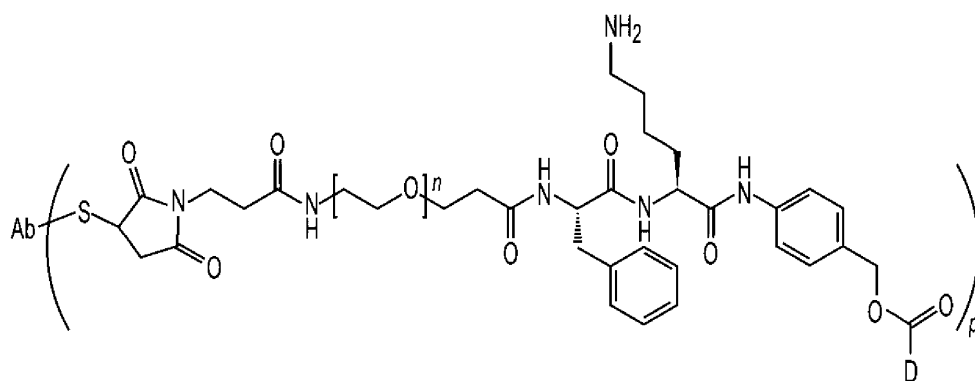
Неограничивающие иллюстративные линкеры показаны ниже в контексте ADC формулы I.



MC-val-cit-PAB



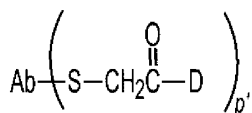
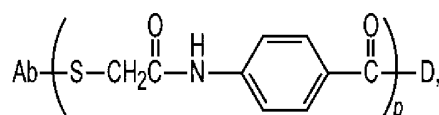
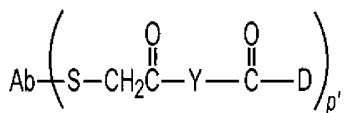
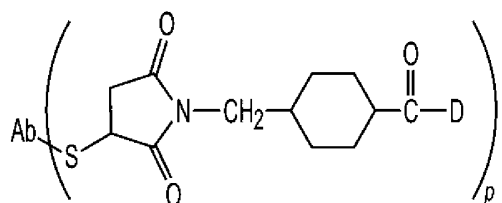
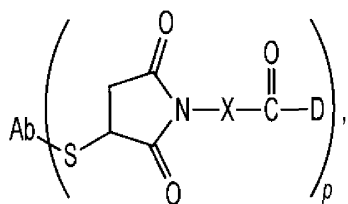
где  $R_1$  и  $R_2$  независимо выбраны из H и  $C_1-C_6$  алкила. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $R_1$  и  $R_2$  представляет собой  $-CH_3$ .



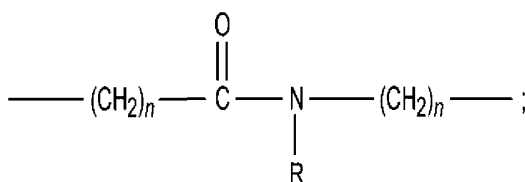
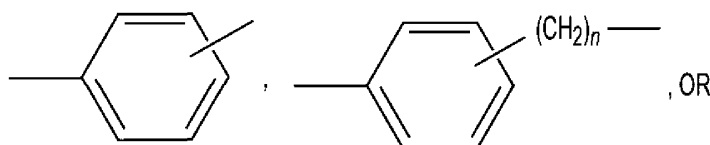
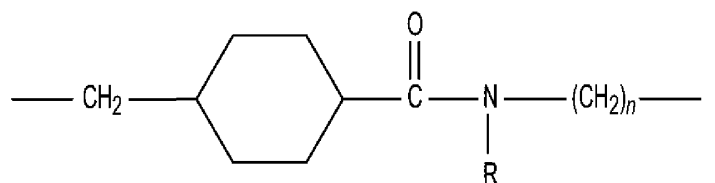
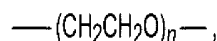
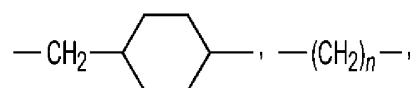
Phe-Lys-PAB-AT

где  $n$  равен 0-12. В некоторых вариантах осуществления  $n$  равен 2 или 10. В некоторых вариантах осуществления  $n$  равен 4 или 8.

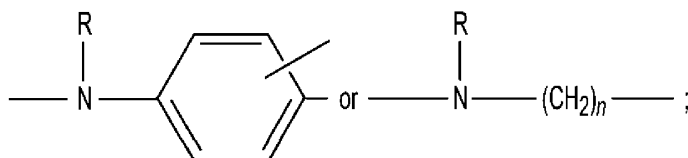
Дополнительные неограничивающие иллюстративные ADC включают следующие структуры:



where X is:



Y is:



где каждый R независимо представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил; и n равен от 1 до 12.

В некоторых вариантах осуществления линкер заменен группами, которые модулируют растворимость и/или реактивность. В качестве неограничивающего примера, заряженный заместитель, такой как сульфат (-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) или аммоний, может увеличивать растворимость линкерного реагента в воде и облегчать реакцию связывания линкерного реагента с антителом и/или лекарственным фрагментом или способствовать реакции связывания. Ат-L (промежуточное соединение антитело-линкер) с D или DL (промежуточное соединение лекарственное средство-линкер) с Ат, в зависимости от пути синтеза, используемого для получения ADC. В некоторых вариантах осуществления часть линкера связывается с антителом, а часть линкера связывается с лекарственным средством, а затем Ат-(линкерная часть/связывается с лекарственным средством-(линкерной частью)<sup>b</sup> с образованием ADC формулы I.



Соединения по изобретению явно предполагают, но не ограничиваются ими, ADC, полученные со следующими линкерными реагентами: бис-малеимидотриоксиэтиленгликоль (BMPEO), N-(P-малеимидопропилокси)-N-гидроксисукцинимидный сложный эфир (BMPS), N-(ε-малеимидокапроилокси) сукцинимидный сложный эфир (EMCS), N-[γ-малеимидобутирилокси] сукцинимидный сложный эфир (GMBS), 1,6-гексан-бис-винилсульфон (HBVS), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат) (LC-SMCC), m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный эфир (MBS), гидразид 4-(4-N-малеимидофенил)масляной кислоты (MPBH), сукцинимидил-3-(бромацетамидо)пропионат (SBAP), сукцинимидилиодоацетат (SIA), сукцинимидил (4-йодацетил) аминобензоат (SIAB), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио) пропионат (SPDP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио) пентоанат, сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), сукцинимидил-4-(m-малеимидофенил)бутират (SMPB), сукцинимидил-6-[(β-малеимидопропионамидо)гексаноат] (SMPH), иминотиолан (IT), сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB и сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат (SVSB), включая бис-малеимидные реагенты: дитиобисмалеимидоэтан (DTME), 1,4-бисмалеимидобутан (BMB), 1,4-бисмалеимидил-2,3-дигидроксибутан (BMDDB), бисмалеимидогексан (BMH), бисмалеимидоэтан (BMOE), BM(PEG)<sub>2</sub> (показано ниже), и BM(PEG)<sub>3</sub> (показано ниже); бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(p-азидобензоил) гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(p-диазонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). В некоторых вариантах осуществления бис-малеимидные реагенты позволяют присоединять тиольную группу цистеина в антителе к тиолсодержащему лекарственному фрагменту, линкеру или промежуточному соединению линкер-лекарственное средство. Другие функциональные группы, которые взаимодействуют с тиоловыми группами, включают, но не ограничиваются ими, йодацетамид, бромацетамид, винилпиридин, дисульфид, пиридилдисульфид, изоцианат и изотиоцианат.

Некоторые полезные линкерные реагенты можно получить из различных коммерческих источников, таких как Pierce Biotechnology, Inc. (Рокфорд, Иллинойс), Molecular Biosciences Inc. (Боулдер, Колорадо), или синтезировать в соответствии с процедурами, описанными в данной области техники; например, в Toki et al., *J. Org. Chem.*, vol. 67, pp. 1866-1872, 2002; Dubowchik, et al., *Tetrahedron Letters*, vol. 38, pp. 5257-60, 1997; Walker, *J. Org. Chem.*, vol. 60, pp. 5352-5355, 1995; Frisch et al., *Bioconjugate Chem.*, vol. 7, pp. 180-186, 1995; патенте США № 6214345; WO 02/088172; US2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; и WO 04/032828.

Меченная углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилтриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является типичным хелатирующим агентом для конъюгации радионуклеотида с антителом; см., например, WO 94/11026.

ii) Иллюстративные лекарственные фрагменты.

1) Майтанзин и майтанзиноиды.

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат содержит антитело, конъюгированное с одной или более молекулами майтанзиноида. Майтанзиноиды представляют собой производные майтанзина и митотических ингибиторов, которые действуют путем ингибирования полимеризации тубулина. Майтанзин был впервые выделен из восточноафриканского кустарника *Maytenus serrata* (патент США № 3896111).

Впоследствии было обнаружено, что некоторые микробы также продуцируют майтанзиноиды, такие как майтанзинол и C-3 сложные эфиры майтанзинола (патент США № 4151042). Синтетические майтанзиноиды раскрыты, например, в патенте США № 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663; и 4371533.

Лекарственные фрагменты майтанзиноиды представляют собой перспективные лекарственные фрагменты в конъюгатах антитело-лекарственное средство, поскольку они: (i) относительно доступны для получения путем ферментации, химической модификации или дериватизации продуктов ферментации, (ii) поддаются дериватизации с функциональными группами, подходящими для конъюгации через дисульфидные линкеры с антителами, (iii) стабильны в плазме и (iv) эффективны против различных линий опухолевых клеток.

Некоторые майтанзиноиды, подходящие для применения в качестве лекарственных фрагментов майтанзиноидов, известны в данной области техники и могут быть выделены из природных источников известными методами или получены с использованием методов генной инженерии (см., например, Yu et al., *PNAS*, vol. 99, pp. 7968-7973, 2002). Майтанзиноиды также можно получить синтетическим путем при помощи известных методов.

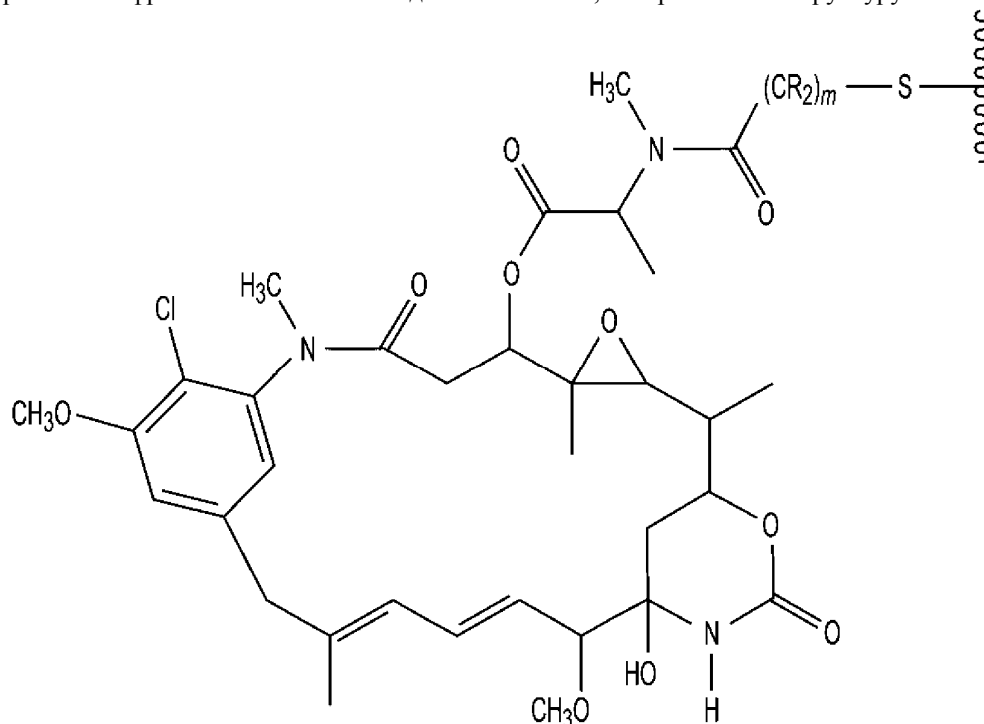
Иллюстративные лекарственные фрагменты майтанзиноиды включают, но не ограничиваются ими, те, которые имеют модифицированное ароматическое кольцо, такие как: C-19-дехлор (патент США № 4256746) (полученный, например, восстановлением литийалюминийгидридом ансамитоцина P2); C-

20-гидрокси (или С-20-деметил)  $\pm$ С-19-дехлор (патенты США №№ 4361650 и 4307016) (полученный, например, деметилированием с использованием *Streptomyces* или *Actinomyces* или дехлорированием с использованием ЛАН); и С-20-деметокси, С-20-ацилокси (-OCOR),  $\pm$ дехлор (патент США № 4294757) (полученные, например, ацилированием с использованием ацилхлоридов), и те, которые имеют модификации в других положениях ароматического кольца.

Иллюстративные лекарственные фрагменты майтанзиноиды также включают те, которые имеют модификации, такие как: С-9-SH (патент США № 4424219) (полученный, например, реакцией майтанзинола с H<sub>2</sub>S или P<sub>2</sub>S<sub>5</sub>); С-14-алкоксиметил(деметокси/CH<sub>2</sub>OR) (патент США № 4331598); С-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH<sub>2</sub>OH или CfUOAc) (патент США № 4450254) (полученный, например, от *Nocardia*)-, С-15-гидрокси/ацилокси (патент США № 4364866) (полученный, например, путем превращения майтанзинола при помощи *Streptomyces*), С-15-метокси (патенты США №№ 4313946 и 4315929) (например, выделенный из *Trewia midflorap*), С-18-N-деметил (патенты США №№ 4362663 и 4322348) (полученный, например, деметилированием майтанзинола при помощи *Streptomyces*), и 4,5-дезоксидеокси (патент США № 4371533) (полученный, например, восстановлением майтанзинола трихлоридом титана/ЛАН).

Многие положения на соединениях майтанзиноидов могут быть использованы в качестве линкера. Например, сложноеэфирный линкер может быть образован реакцией с гидроксильной группой с использованием обычных методик сочетания. В некоторых вариантах осуществления реакция может происходить в положении С-3, имеющем гидроксильную группу, положении С-14, модифицированном гидроксиметилем, положении С-15, модифицированном гидроксильной группой, и положении С-20, имеющем гидроксильную группу. В некоторых вариантах осуществления линкер образован в положении С-3 майтанзинола или аналога майтанзинола.

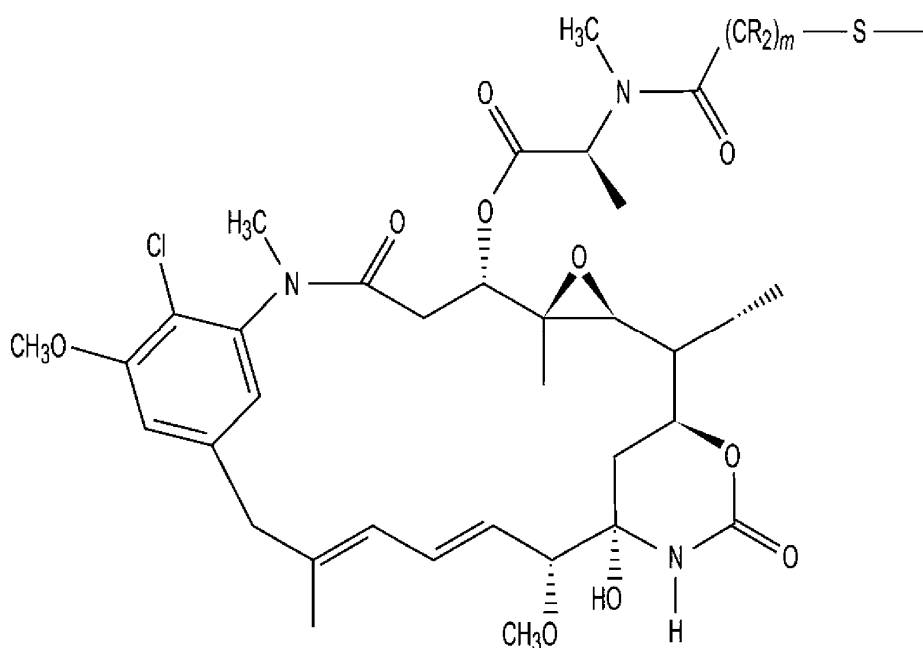
Лекарственные фрагменты майтанзиноиды включают те, которые имеют структуру



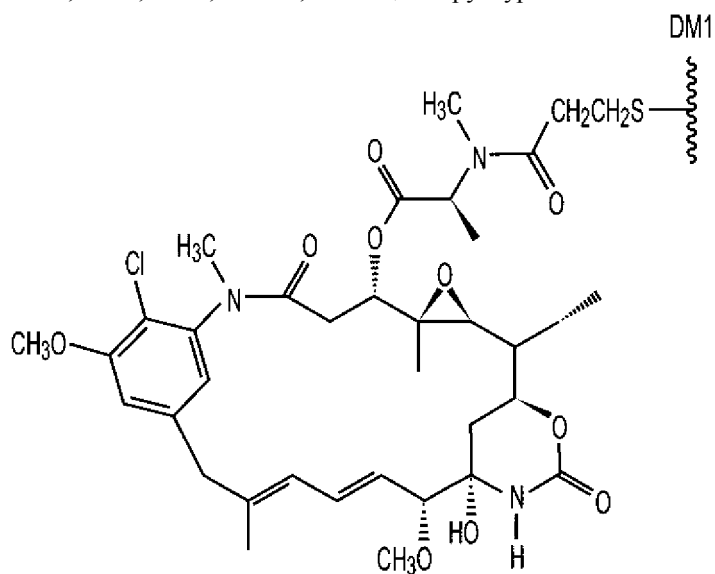
где волнистая линия указывает на ковалентное присоединение атома серы лекарственного фрагмента майтанзиноиды к линкеру ADC. Каждый R может независимо представлять собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил. Алкиленовая цепь, присоединяющая амидную группу к атому серы, может быть метанилом, этанилом или пропилом, то есть m равен 1, 2 или 3 (патент США № 633410; патент США № 5208020; Chad et al., *Cancer Res.*, vol. 52, pp. 127-131, 1992; Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 93, pp. 8618-8623, 1996).

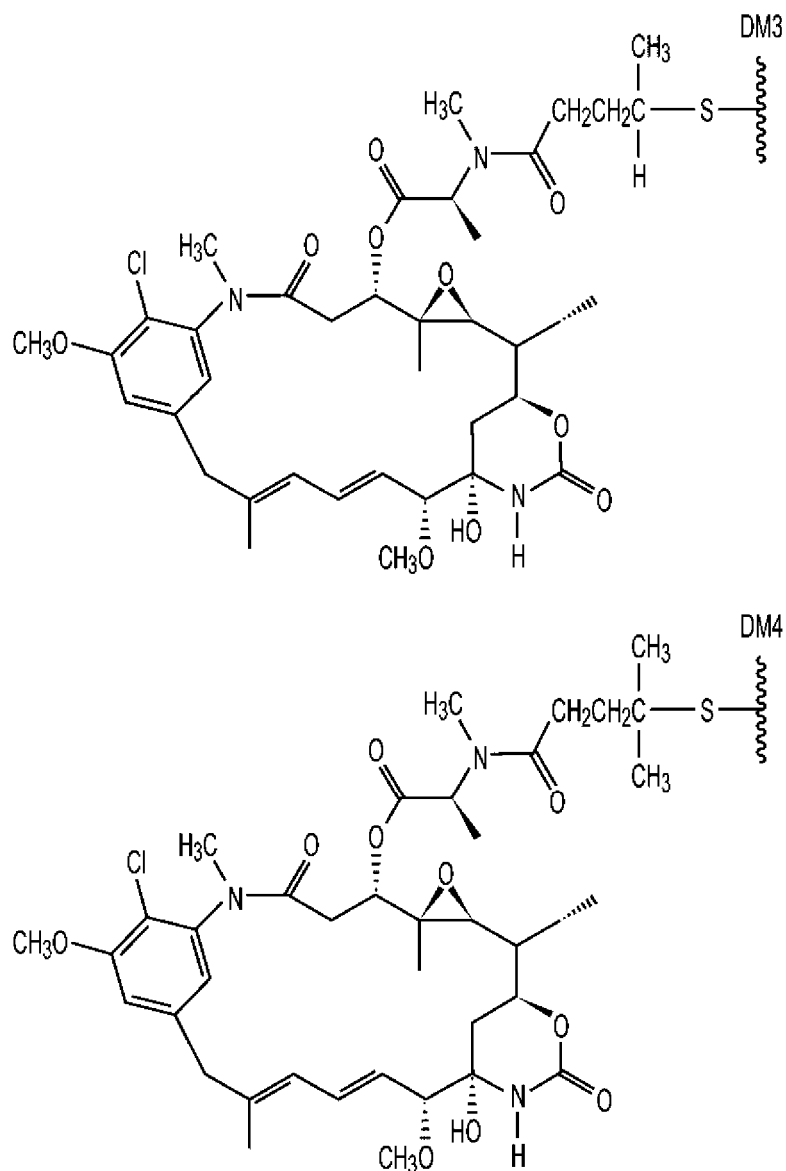
Все стереоизомеры вышеуказанного лекарственного фрагмента майтанзиноиды рассматриваются для соединений по настоящему изобретению, то есть для любой комбинации конфигураций R и S на хиральных углеродах (патент США №№ 7276497; 6913748; 6441163; 633410 (RE39151); 5208020; Widdison et al. (2006) *J. Med. Chem.* 49:4392-4408).

В некоторых вариантах осуществления лекарственный майтанзиноидный фрагмент имеет следующую стереохимию:



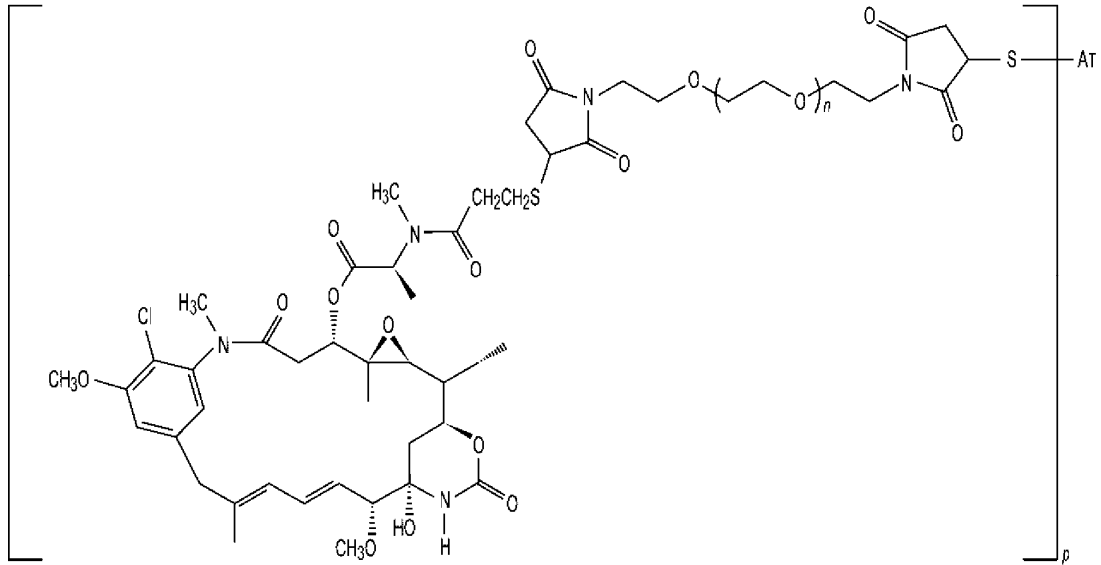
Иллюстративные варианты осуществления лекарственных фрагментов майтанзиноидов включают, но не ограничиваются ими, DM1; DM3; и DM4, имеющие структуры



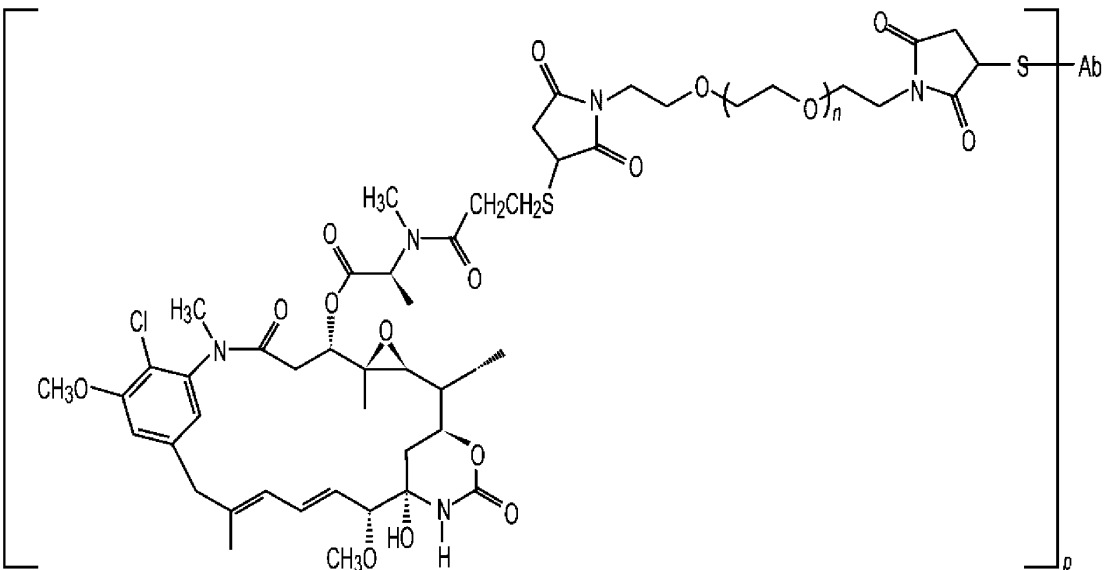
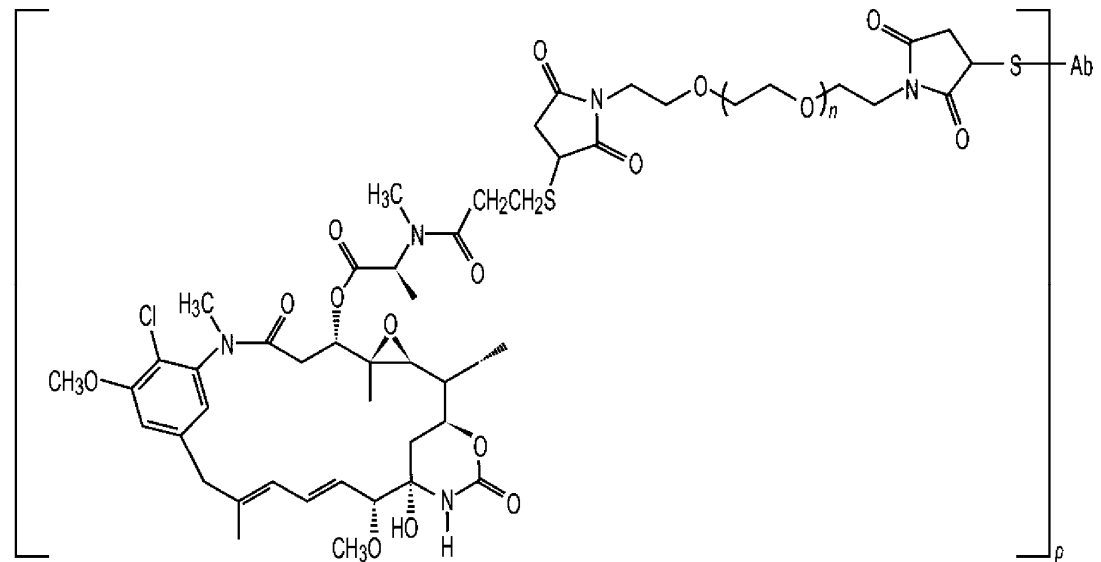


где волнистая линия указывает на ковалентное присоединение атома серы лекарственного средства к линкеру (L) конъюгата антитело-лекарственное средство.

Иллюстративные конъюгаты антитело-лекарственное средство, где DM1 связан через линкер ВМРЕО с тиоловой группой антитела, имеют структуру и сокращение: где Ат представляет собой антитело; n равен 0, 1 или 2; и p равен от 1 до около 20. В некоторых вариантах осуществления p равен от 1 до 10, p равен от 1 до 7, p равен от 1 до 5 или p равен от 1 до 4.



Иммюноконъюгаты, содержащие майтанзиноиды, способы их получения и их терапевтическое применение описаны, например, в патентах США №№ 5208020 и 5416064; US 2005/0276812 A1; и европейском патенте EP 0425235 B См. также Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 93, pp. 8618-8623, 1996; и Chari et al., Cancer Research, vol. 52, pp. 127-131, 1992.



Иммуноконъюгаты, содержащие майтанзиноиды, способы их получения и их терапевтическое применение описаны, например, в патентах США №№ 5208020 и 5416064; US 2005/0276812 A1; и европейском патенте EP 0425235 B1; см. также Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 93, pp. 8618-8623, 1996; и Chari et al., Cancer Research, vol. 52, pp. 127-131, 1992.

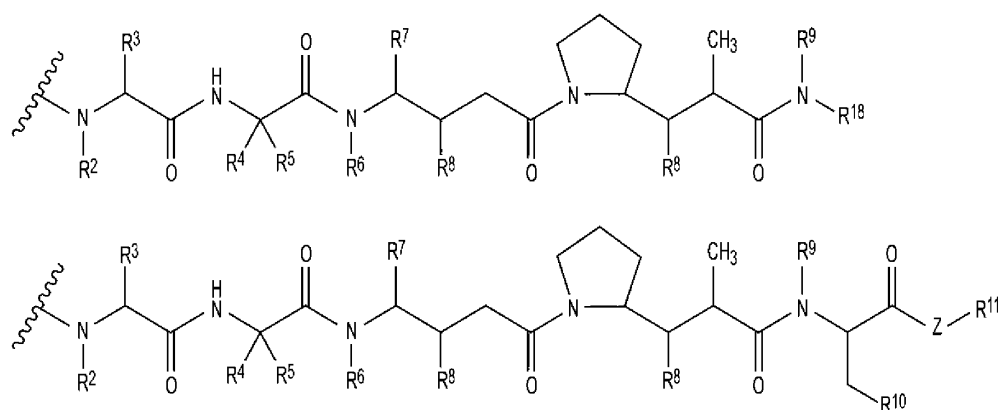
В некоторых вариантах осуществления конъюгаты антитело-майтанзиноид могут быть получены путем химического связывания антитела с молекулой майтанзиноида без значительного уменьшения биологической активности либо антитела, либо молекулы майтанзиноида; см., например, патент США № 5208020. В некоторых вариантах осуществления ADC со средним числом 3-4 молекул майтанзиноидов, конъюгированных на молекулу антитела, продемонстрировал эффективность в усилении цитотоксичности клеток-мишеней без отрицательного влияния на функцию или растворимость антитела. В некоторых случаях ожидается, что даже одна молекула токсина/антитела повысит цитотоксичность по сравнению с использованием голого антитела.

Примеры линкерных групп для получения конъюгатов антитело-майтанзиноид включают, например, группы, описанные в данном документе, и группы, раскрытые в патенте США № 5208020; патенте EP 0425235 B1; Chari et al., Cancer Research, vol. 52, pp. 127-131, 1992; US 2005/0276812 A1; и US 2005/016993 A1.

## 2. Ауристатины и доластатины.

Лекарственные фрагменты включают доластатины, ауристатины и их аналоги и производные (патенты США №№ 5635483, 5780588, 5767237 и 6124431). Ауристатины являются производными соединения доластатина-10 морских моллюсков. Не собираясь связывать себя какой-либо конкретной теорией, было показано, что доластатины и ауристатины влияют на динамику микротрубочек, гидролиз GTP, а также ядерное и клеточное деление (Woyke et al., Antimicrob. Agents and Chemother., vol. 45, pp. 3580-3584, 2001) и обладают противораковыми свойствами (патент США № 5663149) и противогрибную активность (Pettit et al., Antimicrob. Agents Chemother., vol. 42, pp. 2961-2965, 1998). Лекарственный фрагмент доластатин/ауристин может быть присоединен к антителу через N- (амино) конец или C- (карбоксильный) конец пептидного лекарственного фрагмента (WO 02/088172; Doronina et al., Nature Biotechnology, vol. 21, pp. 778-784, 2003; Francisco et al., Blood, vol. 102, pp. 1458-1465, 2003).

Иллюстративные варианты осуществления ауристинина включают связанные с N-концом лекарственных фрагментов монометилауристинина De и Df, раскрытые в патентах США №№ 7498298 и 7659241.



где волнистая линия De и Df указывает на сайт ковалентного связывания с антителом или компонентом антитело-линкер и независимо в каждом месте

R<sup>2</sup> выбран из H и C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила;

R<sup>3</sup> выбран из H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикла, арила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкиларила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикла), C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикла и C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикла);

R<sup>4</sup> выбран из H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикла, арила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкиларила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикла), C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикла и C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкил (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикла);

R<sup>5</sup> выбран из H и метила;

или R<sup>4</sup> и R<sup>5</sup> вместе образуют карбоциклическое кольцо и имеют формулу -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>-, где R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> независимо выбраны из H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила и C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикла, а n выбран из 2, 3, 4, 5 и 6;

R<sup>6</sup> выбран из H и C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила;

R<sup>7</sup> выбран из H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикла, арила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкиларила, C<sub>1</sub>-

C<sub>8</sub> алкил-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикла), C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикла и C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикла);

каждый R<sup>8</sup> независимо выбран из H, OH, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикла и O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила);

R<sup>9</sup> выбран из H и C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила;

R<sup>10</sup> выбран из арила или C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикла;

Z представляет собой O, S, NH или NR<sup>12</sup>, где R<sup>12</sup> представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил;

R<sup>11</sup> выбран из H, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> алкила, арила, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикла, -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-R<sup>14</sup>, или -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>;

m равно целому числу от 1 до 1000;

$R^{13}$  представляет собой  $C_2-C_8$  алкил;

$R^{14}$  представляет собой H или  $C_1-C_8$  алкил;

е в каждом случае независимо представляет собой H, COOH,  $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ ,  $-(CH_2)_n-SO_3H$ , или  $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_8$  алкил;

е в каждом случае независимо представляет собой H,  $C_1-C_8$  алкил, или  $-(CH_2)_n-COOH$ ;

$R^{18}$  выбран из  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -арила,  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$  гетероцикла), и  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$  карбоцикла); и n равно целому числу от 0 до 6.

В одном варианте  $R^3$ ,  $R^4$  и  $R^7$  независимо представляют собой изопропил или втор-бутил, а  $R^5$  представляет собой -H или метил. В иллюстративном варианте осуществления каждый из  $R^3$  и  $R^4$  представляет собой изопропил,  $R^5$  представляет собой -H и  $R^7$  представляет собой втор-бутил.

В еще одном варианте осуществления каждый из  $R^2$  и  $R^6$  представляет собой метил, и  $R^9$  представляет собой -H.

В еще одном варианте осуществления в каждом случае  $R^8$  представляет собой  $-OCH_3$ .

В иллюстративном варианте осуществления каждый из  $R^3$  и  $R^4$  представляет собой изопропил, каждый из  $R^2$  и  $R^6$  представляет собой метил,  $R^5$  представляет собой -H,  $R^7$  представляет собой втор-бутил, в каждом случае  $R^8$  представляет собой  $-OCH_3$ , и  $R^9$  представляет собой -H.

В одном варианте осуществления Z представляет собой -O- или -NH-.

В одном варианте осуществления  $R^{10}$  представляет собой арил.

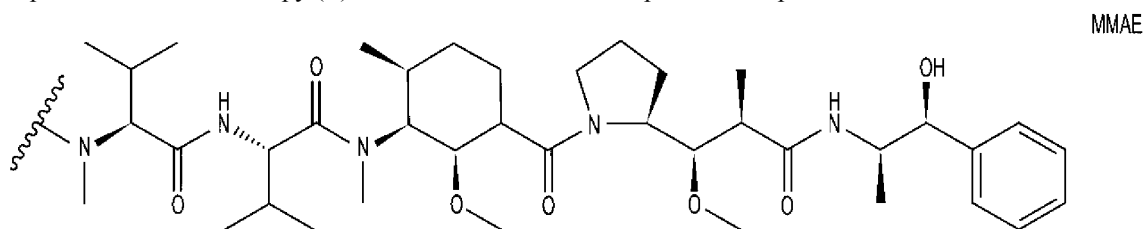
В иллюстративном варианте осуществления  $R^{10}$  представляет собой -фенил.

В иллюстративном варианте осуществления, когда Z представляет собой -O-,  $R^{11}$  представляет собой -H, метил или трет-бутил.

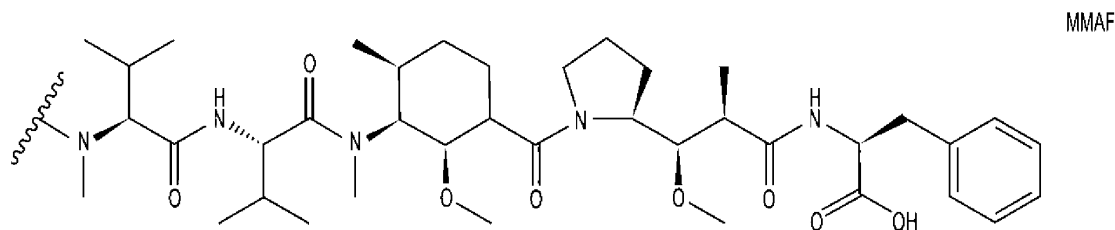
В одном варианте осуществления, когда Z представляет собой -NH-,  $R^{11}$  представляет собой  $-CH(R^{15})_2$ , где  $R^{15}$  представляет собой  $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ , и  $R^{16}$  представляет собой  $-C_1-C_8$  алкил или  $-(CH_2)_n-COOH$ .

В еще одном варианте осуществления, когда Z представляет собой -NH-,  $R^{11}$  представляет собой  $-CH(R^{15})_2$ , где  $R^{15}$  представляет собой  $-(CH_2)_n-SO_3H$ .

Примером ауристати́на формулы De является MMAE, где волнистая линия указывает на ковалентное присоединение к линкеру (L) конъюгата антитело-лекарственное средство:



Примером ауристати́на формулы De является MMAF



где волнистая линия указывает на ковалентное присоединение к линкеру (L) конъюгата антитело-лекарственное средство:

Другие иллюстративные варианты осуществления включают соединения монометилвалина, имеющие фенилаланин-карбоксильные модификации на С-конце пентапептидного ауристати́нового лекарственного фрагмента (WO 2007/008848), и соединения монометилвалина, имеющие модификации фенилаланиновой боковой цепи на С-конце пентапептидного ауристати́нового лекарственного фрагмента (WO 2007/008603).

Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления ADC формулы I, содержащих MMAF и различные линкерные компоненты, дополнительно включают At-МС-РАВ-MMAF и At-РАВ-MMAF. Иммуноконъюгаты, содержащие MMAF, присоединенный к антителу линкером, который не протеолитически расщепляем, обладают активностью, сравнимой с иммуноконъюгатами, содержащими MMAF, присоединенный к антителу протеолитически расщепляемым линкером (Doronina et al., Biosconjugate Chem., vol. 17, pp. 114-124, 2006). В некоторых таких вариантах осуществления считается, что на высвобождение лекарственного средства влияет деградация антител в клетке.

Как правило лекарственные фрагменты на основе пептидов могут быть получены путем образования пептидной связи между двумя или более аминокислотами и/или пептидными фрагментами. Такие пептидные связи могут быть получены, например, в соответствии со способом жидкофазного синтеза

(см., например, E. Schroder and K. Liibke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press).

Лекарственные фрагменты ауристин/доластин в некоторых вариантах осуществления могут быть получены в соответствии со следующими способами из: патентов США №№ 7498298; 5635483; 5780588; Pettit et al., J. Am. Chem. Soc. vol. 87, pp. 5463-5465, 1998; Pettit et al., Anti-Cancer Drug Design, vol. 13, pp. 243277, 1998; Pettit et al., Synthesis, vol. 6, pp. 719-725, 1996; Pettit et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans, vol. 15, pp. 859-863, 1996; и Doronina, Nat. Biotechnol., vol. 21, pp. 778-784, 2003.

В некоторых вариантах осуществления лекарственные фрагменты ауристин/доластин формул De, такие как MMAE и De, такие как MMAF, и промежуточные соединения лекарственное средство-линкер и их производные, такие как MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF, и MC-vc-PAB-MMAE могут быть получены с использованием способов, описанных в патенте США № 7498298; Doronina et al., Bioconjugate Chem., vol. 17, pp. 114-124, 2006; и Doronina et al., Nat. Biotech., vol. 21, pp. 778-784, 2003, а затем конъюгировали с представляющим интерес антителом.

### 3. Калихеамицин.

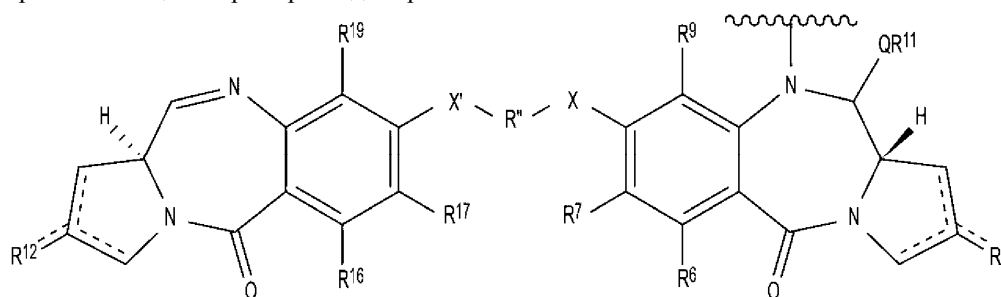
В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат содержит антитело или фрагмент антитела, конъюгированные с одной или более молекулами калихеамицина. Семейство калихеамициновых антибиотиков и их аналоги способны продуцировать двухцепочечные разрывы ДНК в субпиколярных концентрациях (Hinman et al., Cancer Research, vol. 53, pp. 3336-3342, 1993; Lode et al., Cancer Research, vol. 58, pp. 2925-2928, 1998). Калихеамицин имеет внутриклеточные участки действия, но в некоторых случаях нелегко проникает через плазматическую мембрану. Следовательно, клеточное поглощение этих агентов посредством опосредованной антителами интернализации может в некоторых вариантах осуществления значительно усилить их цитотоксические эффекты. Неограничивающие иллюстративные способы получения конъюгатов антитело-лекарственное средство с лекарственным фрагментом калихеамицином описаны, например, в патентах США №№ 5712374; 5714586; 5739116; и 5767285.

### 4. Пирролобензодиазепины.

В некоторых вариантах осуществления ADC содержит пирролобензодиазепин (PBD). В некоторых вариантах осуществления димеры PBD распознают специфические последовательности ДНК и связываются с ними. О натуральном продукте антрамицина, PBD, впервые сообщили в 1965 году (Leimgruber et al., J. Am. Chem. Soc, vol. 87, pp. 5793-5795, 1965; Leimgruber et al., J. Am. Chem. Soc, vol. 87, pp. 57915793, 1965). С тех пор сообщалось о ряде PBD, как природных, так и аналогов (Thurston et al., Chem Rev. vol. 1994, pp. 433-465 1994, включая димеры трициклического каркаса PBD (патенты США №№ 6884799; 7049311; 7067511; 7265105; 7511032; 7528126; и 7557099) Не собираясь связывать себя какой-либо конкретной теорией, считается, что структура димера придает соответствующую трехмерную форму для изоспиральности с малой бороздкой В-формы ДНК, что приводит к плотному прилеганию в сайте связывания (Kohn, In Antibiotics III. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975); Hurley and Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Res., vol. 19, pp. 230-237, 1986). Было показано, что димерные соединения PBD, содержащие C2 арильные заместители, могут использоваться в качестве цитотоксических агентов (Hartley et al., Cancer Res., vol. 70, pp. 6849-6858, 2010; Antonow, J. Med. Chem. vol. 53, pp. 2927-2941, 2010; Howard et al., Bioorganic and Med. Chem. Letters, vol. 19, pp. 6463-6466, 2009).

Димеры PBD были конъюгированы с антителами, и было показано, что полученный ADC обладает противораковыми свойствами. Неограничивающие примеры сайтов связывания на димере PBD включают пятичленное пиррольное кольцо, связь между звеньями PBD и иминную группу N10-C11 (WO 2009/016516; US 2009/304710; US 2010/047257; US 2009/036431); US 2011/0256157; WO 2011/130598).

Неограничивающими примерами димерных компонентов PBD ADC являются



и их соли и сольваты,

где волнистая линия указывает на сайт ковалентного присоединения к линкеру;

пунктирные линии указывают на необязательное наличие двойной связи между C1 и C2 или C2 и C3;

R<sup>2</sup> независимо выбран из H, OH, =O, =CH<sub>2</sub>, CN, R, OR, =CH-R<sup>D</sup>, =C(R<sup>D</sup>)<sub>2</sub>, O-SO<sub>2</sub>-R, CO<sub>2</sub>R и COR, и необязательно дополнительно выбран из галогена или дигалогена, где R<sup>D</sup> независимо выбран из R, CO<sub>2</sub>R, COR, CHO, CO<sub>2</sub>H и галогена;

R<sup>6</sup> и R<sup>9</sup> независимо выбраны из H, R, OH, OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NRR, NO<sub>2</sub>, MeaSn и галогена;

R<sup>7</sup> независимо выбран из H, R, OH, OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NRR', NO<sub>2</sub>, MeaSn и галогена;



Q независимо выбран из O, S и NH;

$R^{11}$  представляет собой или H, или R, или, где Q представляет собой O,  $SO_3M$ , где M представляет собой катион металла;

R и R', каждый независимо, выбран из необязательно замещенных 1-8 алкила,  $C_{1-12}$  алкила,  $C_{3-8}$  гетероциклила,  $C_{3-20}$  гетероцикла и  $C_{5-20}$  арильных групп, и необязательно по отношению к группе  $NRR'$ , R и R' вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенное 4-, 5-, 6- или 7-членное гетероциклическое кольцо;  $R^{12}$ ,  $R^{16}$ ,  $R^{19}$  и  $R^{17}$  имеют значения, определенные для  $R^2$ ,  $R^6$ ,  $R^9$  и  $R^7$ , соответственно;

R'' представляет собой  $C_{3-12}$  алкиленовую группу, эта цепь может быть прервана одним или более гетероатомами, например, O, S, N (H), NMe и/или ароматическими кольцами, например, бензолом или пиридином, которые необязательно замещены; и

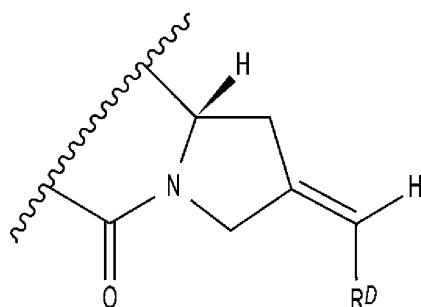
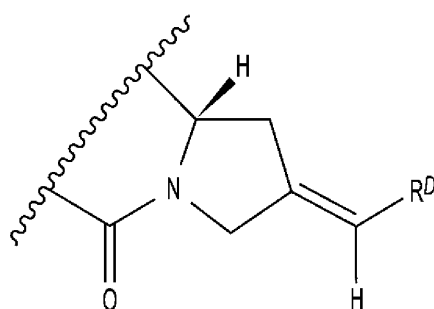
X и X' независимо выбраны из O, S и N(H).

В некоторых вариантах осуществления каждый из R и R' независимо выбран из необязательно замещенных  $C_{1-12}$  алкильных,  $C_{3-20}$  гетероциклических и  $C_{5-20}$  арильных групп, и необязательно по отношению к группе  $NRR'$ , R и R' вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенное 4-, 5-, 6- или 7-членное гетероциклическое кольцо. В некоторых вариантах осуществления  $R^9$  и  $R^{19}$  представляют собой H. В некоторых вариантах осуществления  $R^6$  и  $R^{16}$  представляют собой H.

В некоторых вариантах осуществления  $R^7$  представляют собой  $R^{17}$ , оба представляют собой  $OR^{7A}$ , где  $R^{7A}$  представляет собой необязательно замещенный  $C_{1-4}$  алкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^{7A}$  представляет собой Me. В некоторых вариантах осуществления  $R^{7A}$  представляет собой  $StoPh$ , где Ph представляет собой фенильную группу. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой O. В некоторых вариантах осуществления  $R^{11}$  представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления существует двойная связь между  $C_2$  и  $C_3$  в каждом мономерном звене.

В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  и  $R^{12}$  независимо выбраны из H и R. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  и  $R^{12}$  независимо представляют собой R. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  и  $R^{12}$  независимо друг от друга необязательно замещены  $C_{5-20}$  арилом или  $C_{5-7}$  арилом или  $C_{8-10}$  арилом. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  и  $R^{12}$  независимо представляют собой необязательно замещенный фенил, тиенил, нафтил, пиридил, хинолинил или изохинолинил. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  и  $R^{12}$  независимо выбраны из  $=O$ ,  $=CH_2$ ,  $=CH-R^D$ , и  $=C(R^D)_2$ . В некоторых вариантах осуществления каждый из  $R^2$  и  $R^{12}$   $=CH_2$ . В некоторых вариантах осуществления каждый из  $R^2$  и  $R^{12}$  представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $R^2$  и  $R^{12}$  равен O. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $R^2$  и  $R^{12}$  представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  и/или  $R^{12}$  независимо представляют собой  $=C(R^D)_2$ . В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  и/или  $R^{12}$  независимо представляют собой  $=CH-R^D$ .

В некоторых вариантах осуществления, когда  $R^2$  и/или  $R^{12}$  представляют собой  $=CH-R^D$ , каждая группа может независимо иметь любую конфигурацию, приведенную ниже



В некоторых вариантах осуществления  $a=CH-R^D$  находится в конфигурации (I). В некоторых вари-

антах осуществления R" представляет собой C3 алкиленовую группу или C5 алкиленовую группу.

Линкеры PBD-димер-*val-cit-PAB-AT* и PBD-димер-Phe-Lys-PAB-At расщепляются протеазой, в то время как линкер PBD-димер-малеимид-ацеталь является кислотоллабильным.

Димеры PBD и ADC, содержащие димеры PBD, могут быть получены способами, известными в данной области техники; см., например, WO 2009/016516; US 2009/304710; US 2010/047257; US 2009/036431; US 2011/0256157; WO 2011/130598.

#### 5. Антрациклины.

В некоторых вариантах осуществления ADC может содержать антрациклин. Антрациклины представляют собой антибиотические соединения, которые проявляют цитотоксическую активность. Не имея намерения быть связанными какой-либо конкретной теорией, исследования показали, что антрациклины могут убивать клетки при помощи ряда различных механизмов, включая: 1) внедрение молекул лекарственного средства в ДНК клетки, тем самым ингибируя ДНК-зависимый синтез нуклеиновых кислот; 2) выработку при помощи лекарственного средства свободных радикалов, которые затем вступают в реакцию с клеточными макромолекулами, вызывая повреждение клеток, и/или 3) взаимодействие молекул лекарственного средства с клеточной мембраной (см., например, C. Peterson et al., "Transport And Storage Of Anthracycline In Experimental Systems And Human Leukemia" в Anthracycline Antibiotics In Cancer Therapy, N. R. Bachur, "Free Radical Damage" id. at pp. 97-102). Из-за своего цитотоксического потенциала антрациклины использовались для лечения многих видов злокачественных новообразований, таких как лейкемия, карцинома молочной железы, карцинома легкого, аденокарцинома яичников и саркомы (см., например, P.H-Wiernik, в Anthracycline: Current Status And New Developments, p. 11).

Неограничивающие примеры антрациклинов включают доксорубин, эпирубин, идарубин, дауномицин, неморубин и их производные. Получены и изучены иммуноконъюгаты и пролекарственные средства даунорубина и доксорубина. (Kratz et al., Current Med. Chem., vol. 13, pp. 477-523, 2006; Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters, vol. 16, pp. 358-362, 1996; Torgov et al., Bioconj. Chem., vol. 16, pp. 717-721, 2005; Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 97, pp. 829-834, 2000; Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters, vol. 12, pp. 1529-1532, 2002; King et al., J. Med. Chem., vol. 45, pp. 43364343, 2002; EP 0328147; патент США № 6630579). Конъюгат антитело-лекарственное средство BR96-доксорубин специфически реагирует с опухоль-ассоциированным антигеном Льюис-Y и был оценен в исследованиях фазы I и II (Saleh et al., J. Clin. Oncology, vol. 18, pp. 2282-2292, 2000; Ajani et al., Cancer Jour., vol. 6, pp. 78-81, 2000; Tolcher et al., J. Clin. Oncology, vol. 17, pp. 478-484, 1999).

PNU-159682 представляет собой мощный метаболит (или производное) неморубина (Quintieri et al., Clinical Cancer Research, vol. 11, pp. 1608-1617, 2005). Неморубин представляет собой полусинтетический аналог доксорубина с 2-метоксиморфолиногруппой гликозид-амино доксорубина и проходит клиническую оценку (Grandi et al., Cancer Treat. Rev. vol. 17, pp. 133-138, 1990; Ripamonti et al., Brit. J. Cancer, vol. 65, pp. 703-707, 1992), включая исследования фазы II/III по гепатоцеллюлярной карциноме (Sun et al., Proceedings of the American Society for Clinical Oncology, vol. 22, Absl448, 2003; Quintieri, Proceedings of the American Association of Cancer Research, vol. 44:1st Ed, Abs 4649, 2003; Pacciarini et al., Jour. Clin. Oncology, vol. 24, p. 14116, 2006).

Антрациклины, включая PNU-159682, могут быть конъюгированы с антителами через несколько сайтов связывания и различные линкеры (US 2011/0076287; W02009/099741; US 2010/0034837; WO 2010/009124), включая линкеры, описанные в данном документе.

Линкер PNU-159682 малеимид-ацеталь-At является кислотоллабильным, в то время как линкеры PNU-159682-*val-cit-PAB-AT*, PNU-159682-*val-cit-PAB-спейсер-AT* и PNU-159682-*val-cit-PAB-спейсер (R<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)-At* расщепляются протеазой.

#### 6. Другие лекарственные фрагменты.

Лекарственные фрагменты также включают гелданамицин (Mandler et al., J. Nat. Cancer Inst, vol. 92, pp. 1573-1581, 2000; Mandler et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters, vol. 10, pp. 1025-1028, 2000; Mandler et al., Bioconjugate Chem., vol. 13, pp. 786-791, 2002); и ферментативно активные токсины и их фрагменты, включая, помимо прочего, А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, цепь модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAPS), ингибитор *momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор мыльнянки лекарственной, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотечены; смотри, например, WO 93/21232.

Лекарственные фрагменты также включают соединения с нуклеолитической активностью (например, рибонуклеазу или эндонуклеазу ДНК).

В определенных вариантах осуществления иммуноконъюгат может содержать высокорadioактивный атом. Для производства конъюгированных с радиоактивными изотопами антител доступны различные радиоактивные изотопы. Примеры включают <sup>211</sup>At, <sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>90</sup>Y, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>153</sup>Sm, <sup>212</sup>Bi, <sup>32</sup>P, <sup>212</sup>Pb и радиоактивные изотопы Lu. В некоторых вариантах осуществления, когда радиоактивный конъюгат используется для обнаружения, он может содержать радиоактивный атом для скинтиграфических исследований, например, <sup>99</sup>Tc или <sup>123</sup>I, или спиновую метку для изображений ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (так-

же известную как магнитно-резонансная томография, МРТ), например, цирконий-89, йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо. Цирконий-89 может образовывать комплекс с различными хелатирующими агентами с металлами и конъюгирован с антителами, например, для ПЭТ-визуализации (WO 2011/056983).

Радио- или другие метки могут быть включены в иммуноконъюгат известными способами. Например, пептид может быть биосинтезирован или химически синтезирован с использованием подходящих предшественников аминокислот, содержащих, например, один или более атомов фтора-19 вместо одного или более атомов водорода. В некоторых вариантах осуществления такие метки, как  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$  и  $^{111}\text{In}$ , могут быть присоединены через остаток цистеина в антителе. В некоторых вариантах осуществления иттрий-90 может быть присоединен через остаток лизина антитела. В некоторых вариантах осуществления способ IODOGEN (Fraker et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 80, pp. 49-57, 1978) можно использовать для включения йода-123. В "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) описаны некоторые другие способы.

В определенных вариантах осуществления иммуноконъюгат может содержать антитело, конъюгированное с ферментом, активирующим пролекарство. В некоторых таких вариантах осуществления фермент, активирующий пролекарство, превращает пролекарство (например, пептид-химиотерапевтический агент, см. WO 81/01145) в активное лекарственное средство, такое как противораковое лекарственное средство. Такие иммуноконъюгаты полезны в некоторых вариантах реализации в антителозависимой ферментно-опосредованной пролекарственной терапии ("ADEPT"). Ферменты, которые могут быть конъюгированы с антителом, включают, но не ограничиваются ими, щелочные фосфатазы, которые используются для превращения фосфатсодержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; арилсульфатазы, которые используются для превращения сульфатсодержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; цитозиндезаминаза, которая используется для превращения нетоксичного 5-фторцитозина в противораковое лекарственное средство 5-фторурацил; протеазы, такие как протеаза *segtatia*, термолиз, субтилизин, карбоксипептидазы и катепсины (такие как катепсины В и L), которые используются для превращения содержащих пептиды пролекарств в свободные лекарственные средства; D-аланилкарбоксипептидазы, которые используются для превращения пролекарств, содержащих заместители D-аминокислоты; ферменты, расщепляющие углеводы, такие как P-галактозидаза и нейраминидаза, которые полезны для превращения гликозилированных пролекарств в свободные лекарственные средства; P-лактамаза, которая используется для превращения лекарств, дериватизированных с P-лактамами, в свободные лекарства; и пенициллинамидазы, такие как амидаза пенициллина V и амидаза пенициллина G, которые используются для превращения лекарственных, дериватизированных по их аминным атомам азота феноксиацетильной или фенилацетильной группами, соответственно, в лекарственные средства, не связанные с белками плазмы крови. В некоторых вариантах осуществления ферменты могут быть ковалентно связаны с антителами методами рекомбинантной ДНК, хорошо известными в данной области техники; см., например, Neuberger et al., *Nature*, vol. 312, pp. 604-608, 1984.

### iii) Содержание лекарственного средства.

Содержание лекарственного средства представлено  $p$ , средним числом лекарственных фрагментов на антитело в молекуле с формулой I. Содержание лекарственного средства может варьироваться от 1 до 20 лекарственных фрагментов (D) на антитело. ADC с формулой I включают наборы антител, конъюгированных с рядом лекарственных фрагментов, от 1 до 20. Среднее количество лекарственных фрагментов на антитело, применяемого при составлении ADC из смеси для реакций конъюгации может быть охарактеризовано обычными методами, такими как масс-спектропия, анализ на основе ИФА и ВЭЖХ. Также может быть определено количественное распределение ADC в пересчете на  $p$ . В некоторых случаях разделение, очистка и характеристика гомогенных ADC, где  $p$  равно определенному значению для ADC с другим содержанием лекарственного средства, могут быть достигнуты при помощи таких методов, как обращенно-фазовая ВЭЖХ или электрофорез.

Для некоторых конъюгатов антитело-лекарственное средство  $p$  может быть ограничено количеством сайтов связывания на антителе. Например, когда присоединение представляет собой тиол цистеина, как в некоторых иллюстративных вариантах осуществления, приведенных выше, антитело может иметь только одну или более тиоловых групп цистеина или может иметь только одну или более достаточно реакционноспособных тиоловых групп, через которые может быть присоединен линкер. В определенных вариантах осуществления более высокое содержание лекарственного средства, например,  $p > 5$ , может вызывать агрегацию, нерастворимость, токсичность или потерю клеточной проницаемости некоторых конъюгатов антитело-лекарственное средство. В определенных вариантах осуществления среднее содержание лекарственного средства для ADC составляет от 1 до около 8; от около 2 до около 6; или от около 3 до около 5. Действительно, было показано, что для некоторых ADC оптимальное соотношение компонентов лекарственного средства на антитело может быть меньше 8 и может составлять от около 2 до около 5 (патент США № 7498298).

В определенных вариантах осуществления меньшее, чем теоретическое максимальное количество лекарственных фрагментов конъюгировано с антителом во время реакции конъюгации. Антитело может содержать, например, остатки лизина, которые не взаимодействуют с промежуточным соединением ле-

карственное средство-линкер или линкерным реагентом, как обсуждается ниже. Как правило, антитела не содержат много свободных и реакционноспособных тиоловых групп цистеина, которые могут быть связаны с лекарственным фрагментом; действительно, большинство тиоловых остатков цистеина в антителах существует в виде дисульфидных мостиков. В определенных вариантах осуществления антитело можно восстановить при помощи восстанавливающего агента, такого как дитиотреитол (DTT) или трикарбонилэтилфосфин (ТСЕР), в условиях частичного или полного восстановления для образования реакционноспособных тиоловых групп цистеина. В определенных вариантах осуществления антитело подвергают денатурирующим условиям для выявления реактивных нуклеофильных групп, таких как лизин или цистеин.

Содержание лекарственного средства (соотношение лекарственное средство/антитело) в ADC можно контролировать разными способами, например: (i) ограничение молярного избытка промежуточного соединения лекарственное средство-линкер или линкерного реагента по сравнению с антителом, (ii) ограничение времени или температуры реакции конъюгации и (iii) частичные или ограничивающие условия восстановления для модификации тиола цистеина.

Следует понимать, что если более чем одна нуклеофильная группа взаимодействует с промежуточным соединением лекарственного средства или линкерным реагентом, тогда полученный продукт представляет собой смесь ADC с распределением одного или более лекарственных фрагментов, прикрепленных к антителу. Среднее количество молекул лекарственного средства на антитело можно рассчитать из смеси при помощи анализа методом двойного ИФА с использованием двух типов антител, который специфичен для антитела и специфичен для лекарственного средства. Отдельные ADC могут быть идентифицированы в смеси при помощи масс-спектропии и разделены при помощи ВЭЖХ, например, хроматографии с гидрофобным взаимодействием (см., например, McDonagh et al., *Prot. Engr. Design & Selection*, vol. 19, pp. 299-307, 2006; Hamblett et al., *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, pp. 7063-7070, 2004). В определенных вариантах осуществления гомогенный ADC с одинаковым содержанием лекарственного средства может быть выделен из смеси для конъюгации при помощи электрофореза или хроматографии.

iv) Определенные способы получения иммуноконъюгатов.

Иммуноконъюгат, который представляет собой ADC с формулой I, может быть получен при помощи нескольких способов с использованием реакций органической химии, условий и реагентов, известных специалистам в данной области техники, включая: (1) реакция нуклеофильной группы антитела с бивалентным линкерным реагентом с образованием Ат-L через ковалентную связь с последующей реакцией с лекарственным фрагментом D; и (2) реакция нуклеофильной группы лекарственного фрагмента с двухвалентным линкерным реагентом с образованием D-L через ковалентную связь с последующей реакцией с нуклеофильной группой антитела. Иллюстративные способы получения ADC с формулой I по последнему пути описаны в патенте США № 7498298.

Нуклеофильные группы антител включают, но не ограничиваются: (i) N-концевые аминокислоты, (ii) аминокислоты боковой цепи, например, лизин, (iii) тиоловые группы боковой цепи, например, цистеин и (iv) гидроксильные или аминокислоты сахара, где антитело гликозилировано. Аминные, тиоловые и гидроксильные группы являются нуклеофильными и способны реагировать с образованием ковалентных связей с электрофильными группами линкерных фрагментов и линкерных реагентов, включая: (i) активные сложные эфиры, такие как сложные эфиры NHS, сложные эфиры HOBT, галоформаты и галогенангидриды; (ii) алкил- и бензилгалогениды, такие как галогенацетамиды; и (iii) альдегиды, кетоны, карбоксильные и малеимидные группы. Определенные антитела имеют восстанавливаемые дисульфиды между цепями, то есть цистеиновые мостики. Антитела можно сделать реактивными для конъюгации с линкерными реагентами путем обработки восстанавливающим агентом, таким как DTT (дитиотреитол) или трикарбонилэтилфосфин (ТСЕР), так что антитело полностью или частично восстанавливается. Таким образом, каждый цистеиновый мостик теоретически образует два реактивных тиоловых нуклеофила. Дополнительные нуклеофильные группы могут быть введены в антитело путем модификации остатков лизина, например, путем реакции остатков лизина с 2-иминотиолоном (реагент Траута), что приводит к превращению амина в тиол. Реактивные тиоловые группы также могут быть введены в антитело путем введения одного, двух, трех, четырех или более остатков цистеина (например, путем получения вариантов антител, содержащих один или более аминокислотных остатков ненативного цистеина).

Конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению также могут быть получены реакцией между электрофильной группой на антителе или фрагменте антитела, такой как альдегидная или кетон-карбонильная группа, с нуклеофильной группой на линкерном реагенте или лекарственном средстве. Подходящие нуклеофильные группы линкерного реагента включают, но не ограничиваются ими, гидразид, оксим, амина, гидразин, тиосемикарбазон, гидразинкарбоксилат и арилгидразид. В одном варианте осуществления антитело модифицировано для введения электрофильных фрагментов, которые способны реагировать с нуклеофильными заместителями линкерного реагента или лекарственного средства. В еще одном варианте осуществления сахара гликозилированных антител могут быть окислены, например, с периодатными окисляющими реагентами с образованием альдегидных или кетонных групп, которые могут реагировать с аминокислотными линкерными реагентами или лекарственными фрагментами. Полученные группы иминных оснований Шиффа могут образовывать стабильную связь или могут быть восстановле-

ны, например, боргидридными реагентами с образованием стабильных аминовых связей. В одном варианте осуществления реакция углеводной части гликозилированного антитела либо с галактозоксидазой, либо с метапериодатом натрия может давать карбонильные (альдегидные и кетоновые) группы в антителе, которые могут реагировать с соответствующими группами лекарственного средства (Hermanson, Bioconjugate Techniques). В другом варианте осуществления антитела, содержащие N-концевые остатки серина или треонина, могут реагировать с метапериодатом натрия, что приводит к образованию альдегида вместо первой аминокислоты (Geoghegan & Stroh, Bioconjugate Chem., vol. 3, pp. 138-146, 1992; патент США № 5362852). Такой альдегид может реагировать с лекарственным фрагментом или линкерным нуклеофилом.

Примеры нуклеофильных групп на лекарственном фрагменте включают, но не ограничиваются ими: аминовые, тиоловые, гидроксильные, гидразиновые, оксимовые, гидразиновые, тиосемикарбазоновые, гидразинкарбоксилатные и арилгидразидные группы, способные реагировать с образованием ковалентных связей с электрофильными группами на линкерных фрагментах и линкерные реагенты, в том числе: (i) активные сложные эфиры, такие как сложные эфиры NHS, сложные эфиры HOBT, галоформиа-ты и галогенангидриды; (ii) алкил- и бензилгалогениды, такие как галогенацетамиды; (iii) альдегиды, кетоны, карбоксильные и малеимидные группы.

Неограничивающие иллюстративные сшивающие реагенты, которые можно использовать для получения ADC, описаны в данном документе в разделе, озаглавленном "Иллюстративные линкеры". Способы использования таких сшивающих реагентов для связывания двух фрагментов, включая белковый фрагмент и химический фрагмент, известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий антитело и цитотоксический агент, может быть получен, например, при помощи рекомбинантных методов или пептидного синтеза. Молекула рекомбинантной ДНК может содержать области, кодирующие антитело, и цитотоксические части конъюгата, либо смежные друг с другом, либо разделенные областью, кодирующей линкерный пептид, который не нарушает желаемых свойств конъюгата.

В еще одном варианте осуществления антитело или фрагмент антитела можно конъюгировать с "рецептором" (таким как стрептавидин) для использования в предварительном нацеливании на опухоль, где конъюгат антитело/фрагмент антитела-рецептор вводят пациенту с последующим удалением несвязанного конъюгата из системы кровообращения с использованием очищающего агента, а затем введение "лиганда" (например, авидина), который конъюгирован с цитотоксическим агентом (например, лекарственным средством или радионуклеотидом).

C. Способы и композиции для диагностики и обнаружения.

В определенных вариантах осуществления любое из антител к CTLA4 или фрагментов антител, предложенных в данном документе, можно использовать для обнаружения присутствия CTLA4 в биологическом образце. В контексте данного документа термин "выявление" включает количественное или качественное выявление. В определенных вариантах осуществления любое из антител к CTLA4 или фрагментов антител, предложенных в данном документе, можно использовать для обнаружения присутствия CTLA4 в биологическом образце.

Дополнительный аспект изобретения относится к антителу к CTLA4 или фрагменту антитела по изобретению для диагностики и/или мониторинга злокачественного новообразования или другого заболевания, при котором уровни экспрессии CTLA4 увеличиваются или уменьшаются по сравнению с нормальным физиологическим уровнем по меньшей мере в одном месте в теле.

В предпочтительном варианте осуществления антитела или фрагменты антител по изобретению могут быть помечены детектируемой молекулой или субстанцией, например, флуоресцентной молекулой, радиоактивной молекулой или любой другой меткой, известной в данной области техники, как описано выше. Например, антитело или фрагмент антитела по изобретению можно пометить радиоактивной молекулой. Например, подходящие радиоактивные молекулы включают, но не ограничиваются ими, радиоактивные атомы, используемые для скинтиграфических исследований, такие как  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{186}\text{Re}$ , и  $^{188}\text{Re}$ . Антитела или фрагменты антител по изобретению также могут быть помечены спиновой меткой для получения изображений ядерного магнитного резонанса (ЯМР), такой как йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо. После введения антитела определяется распределение радиоактивно меченного антитела внутри пациента. Можно использовать любой подходящий известный способ. Некоторые неограничивающие примеры включают компьютерную томографию (КТ), позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), магнитно-резонансную томографию (МРТ), флуоресценцию, хемилюминесценцию и сонографию.

Антитела или фрагменты антител по изобретению могут быть полезны для диагностики и определения стадии злокачественного новообразования и заболеваний, связанных со сверхэкспрессией CTLA4. Злокачественные новообразования, связанные с избыточной экспрессией CTLA4, могут включать плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, рак поджелудочной железы, глиально-клеточные опухоли, такие как глиобластома и нейрофиброматоз, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак груди, рак толстой кишки, меланому, колоректальный рак, рак эндометрия, рак слюнных желез, рак почки, почечно-клеточный рак, рак

предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, рак печени, саркомы, гематологические злокачественные новообразования (лейкозы), астроцитомы и различные типы рака головы и шеи или других гиперпролиферативных заболеваний, экспрессирующих или сверхэкспрессирующих CTLA4.

Антитела или фрагменты антител по изобретению могут быть полезны для диагностики заболеваний, отличных от злокачественных новообразований, для которых экспрессия CTLA4 повышена или снижена. Обе (растворимые или клеточные формы CTLA4 могут использоваться для таких диагнозов. Как правило, такие способы диагностики включают применение биологического образца, полученного от пациента. Термин "биологический образец" охватывает множество типов образцов, полученных от субъекта, которые могут использоваться в диагностических или мониторинговых исследованиях. Биологические образцы включают, но не ограничиваются ими, кровь и другие жидкие образцы биологического происхождения, образцы твердых тканей, такие как биоптат или культура ткани или клетки, полученные из них, и их потомство. Например, биологические образцы включают клетки, полученные из образца ткани, взятого у индивидуума, у которого подозревается злокачественное новообразование, связанное со сверхэкспрессией CTLA4, и в предпочтительных вариантах осуществления из глиомы, рака желудка, легкого, поджелудочной железы, молочной железы, предстательной железы, почек, печени и эндометрия. Биологические образцы включают клинические образцы, клетки в культуре, супернатанты клеток, клеточные лизаты, сыворотку, плазму, биологическую жидкость и образцы тканей.

В конкретном варианте осуществления изобретение представляет собой способ диагностики злокачественного новообразования, связанного со сверхэкспрессией CTLA4 у субъекта, путем обнаружения CTLA4 на клетках субъекта с использованием антитела по изобретению. В частности, указанный способ может включать следующие этапы:

(a) приведение в контакт биологического образца субъекта с антителом или фрагментом антитела согласно изобретению в условиях, подходящих для того, чтобы антитело или фрагмент антитела образовывали комплексы с клетками в биологическом образце, которые экспрессируют CTLA4; и

(b) обнаружение и/или количественное определение указанных комплексов, при этом обнаружение указанных комплексов указывает на злокачественное новообразование, связанное со сверхэкспрессией CTLA4.

Чтобы отслеживать прогрессирование злокачественного новообразования, способ согласно изобретению можно повторять в разное время, чтобы определить, увеличивается или уменьшается связывание антител с образцами, на основании чего можно определить, прогрессирует, регрессирует или стабилизируется злокачественное новообразование.

В конкретном варианте осуществления изобретение представляет собой способ диагностики заболевания, связанного с экспрессией или сверхэкспрессией CTLA4 или уменьшением или увеличением уровня растворимой формы CTLA4. Примеры таких заболеваний могут включать иммунологические нарушения человека, тромботические заболевания (тромбоз и атеротромбоз) и сердечно-сосудистые заболевания.

В одном варианте осуществления предложено антитело к CTLA4 или фрагмент антитела для применения в способе диагностики или обнаружения. В дополнительном аспекте предложен способ обнаружения присутствия CTLA4 в биологическом образце. В дополнительном аспекте предложен способ количественного определения CTLA4 в биологическом образце. В определенных вариантах осуществления способ включает приведение биологического образца в контакт с антителом к CTLA4 или фрагментом антитела, как описано в данном документе, в условиях, допускающих связывание антитела к CTLA4 или фрагмента антитела с CTLA4, и определение того, образуется ли комплекс между антителом к CTLA4 или фрагментом антитела и CTLA4. Такой способ можно проводить *in vitro* или *in vivo*. В одном варианте осуществления антитело к CTLA4 или фрагмент антитела используют для выбора субъектов, подходящих для терапии. В некоторых вариантах осуществления терапия будет включать введение субъекту антитела или фрагмента антитела к CTLA4.

В определенных вариантах осуществления предложены меченые антитела к CTLA4 или фрагменты антител. Метки включают, но не ограничиваются ими, метки или фрагменты, которые обнаруживаются напрямую (такие как флуоресцентные, хромофорные, электронно-плотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), а также фрагменты, такие как ферменты или лиганды, которые обнаруживаются косвенно, например, посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия. Иллюстративные метки включают, но не ограничиваются ими, радиоизотопы  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ , и  $^{131}\text{I}$ , флуорофоры, такие как хелаты редкоземельных элементов или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон, люциферазы, например, люцифераза светлячков, и бактериальная люцифераза (патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, пероксидаза хрена (ПХ), щелочная фосфатаза, Р-галактозидаза, глюкоамилаза, лизоцим, сахаридоксидазы, например, глюкозооксидаза, галактозооксидаза, и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, гетероциклические оксидазы, такие как уриказа и ксантинооксидаза, в сочетании с ферментом, который использует перекись водорода для окисления предшественника красителя, такого как ПХ, лактопероксидаза или микропероксидаза, биотин/авидин, спиновые метки, метки бактериофага, стабильные свободные радикалы и тому подобное.

D. Фармацевтические составы.

Антитела к CTLA4 или фрагменты антител обладают активностью в отношении уничтожения клеток. Эта активность по уничтожению клеток распространяется на несколько различных типов клеточных линий. Кроме того, эти антитела или фрагменты антител, однажды конъюгированные с цитотоксическим агентом, могут уменьшать размер опухоли и могут проявлять пониженную токсичность. Таким образом, антитела к CTLA4, их фрагменты или иммуноконъюгаты могут быть полезны для лечения пролиферативных заболеваний, связанных с экспрессией CTLA4. Антитела, фрагменты или иммуноконъюгаты можно использовать отдельно или в комбинации с любым подходящим агентом или другими традиционными способами лечения.

Антитело к CTLA4 или фрагмент антитела можно использовать для лечения заболеваний, связанных с экспрессией, сверхэкспрессией или активацией CTLA4. Нет никаких особых ограничений в отношении типов злокачественного новообразования или ткани, которые можно лечить, кроме требований к экспрессии CTLA4. Пример включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, рак поджелудочной железы, глиально-клеточные опухоли, такие как глиобластома и нейрофиброматоз, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак груди, рак толстой кишки, меланому, колоректальный рак, рак эндометрия, рак слюнных желез, рак почки, почечно-клеточный рак, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, рак печени, саркомы, гематологические злокачественные новообразования (лейкозы), астроцитомы и различные типы рака головы и шеи или других гиперпролиферативных заболеваний. Более предпочтительными злокачественными новообразованиями являются глиома, рак желудка, легкого, поджелудочной железы, молочной железы, предстательной железы, почек, печени и рак эндометрия.

Антитела к CTLA4 или фрагменты антител являются потенциальными активаторами врожденного иммунного ответа и, таким образом, могут использоваться при лечении иммунологических нарушений человека, таких как сепсис. Антитело к CTLA4 или фрагмент антитела по изобретению также можно использовать в качестве адъювантов для иммунизации, например, для вакцин, и в качестве противомикробных агентов, например, против бактерий, вирусов и паразитов.

Антитело к CTLA4 или фрагмент антитела можно использовать для защиты от, предотвращения или лечения тромботических заболеваний, таких как венозный и артериальный тромбоз и атеротромбоз. Антитело или фрагмент антитела к CTLA4 также можно использовать для защиты от сердечно-сосудистых заболеваний, предотвращения или лечения сердечно-сосудистых заболеваний, а также для предотвращения или подавления проникновения вирусов, таких как вирусы Ласса и Эбола, и для лечения вирусных инфекций.

В каждом из вариантов осуществления способов лечения, описанных в данном документе, антитело к CTLA4, фрагмент антитела или иммуноконъюгат антитела к CTLA4 или фрагмента антитела можно доставлять способом, совместимым с общепринятыми методологиями, связанными с лечением заболевания или нарушения, для которого требуется лечение. В соответствии с данным изобретением эффективное количество антитела, фрагмента антитела или иммуноконъюгата вводят субъекту, нуждающемуся в таком лечении, в течение времени и при условиях, достаточных для предотвращения или лечения заболевания или нарушения. Таким образом, аспект изобретения относится к способу лечения заболевания, связанного с экспрессией CTLA4, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела, фрагмента антитела или иммуноконъюгата по изобретению.

Для введения антитело к CTLA4, фрагмент антитела или иммуноконъюгат можно приготовить в виде фармацевтической композиции. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к CTLA4, фрагмент антитела или иммуноконъюгат, может быть составлена в соответствии с известными способами получения фармацевтических композиций. В таких способах терапевтическая молекула, как правило, комбинируется со смесью, раствором или композицией, содержащей фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтически приемлемый носитель представляет собой материал, который может переноситься пациентом-реципиентом. Стерильный фосфатно-солевой буферный раствор является одним из примеров фармацевтически приемлемого носителя. Другие подходящие фармацевтически приемлемые носители хорошо известны специалистам в данной области техники. (См., например, Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 19<sup>th</sup> ed. 1995)) Составы могут дополнительно включать один или более эксципиентов, консервантов, солюбилизаторов, буферных агентов, альбумин для предотвращения потери белка на поверхности флаконов и т.д.

Форма фармацевтических композиций, способ введения, дозировка и режим, естественно, зависят от патологического состояния, подлежащего лечению, тяжести заболевания, возраста, массы и пола пациента и т.д. Эти соображения могут быть приняты во внимание квалифицированным специалистом при составлении подходящих фармацевтических композиций. Фармацевтические композиции по изобретению могут быть составлены для местного, перорального, парентерального, интраназального, внутривенного, внутримышечного, подкожного или интраокулярного введения и т.п.

Предпочтительно фармацевтические композиции содержат носители, которые фармацевтически приемлемы для состава, который можно вводить путем инъекции. Это могут быть, в частности, изотонические, стерильные, солевые растворы (мононатрий- или динатрийфосфат, хлорид натрия, калия, кальция

или магния и т.п. или смеси таких солей) или сухие, особенно лиофилизированные композиции, которые при добавлении, например, стерилизованной воды или физиологического раствора позволяют получать инъекционные растворы.

В некоторых вариантах осуществления агенты, регулирующие тоничность, иногда известные как "стабилизаторы", присутствуют для регулирования или поддержания тоничности жидкости в композиции. При использовании с большими заряженными биомолекулами, такими как белки и антитела, их часто называют "стабилизаторами", поскольку они могут взаимодействовать с заряженными группами боковых цепей аминокислот, тем самым уменьшая возможность меж- и внутримолекулярных взаимодействий. Агенты, регулирующие тоничность, могут присутствовать в любом количестве от 0,1% до 25 мас.%, предпочтительно от 1 до 5% от фармацевтической композиции. Предпочтительные агенты, регулирующие тоничность, включают многоатомные сахарные спирты, предпочтительно трехатомные или высшие сахарные спирты, такие как глицерин, эритрит, арабит, ксилит, сорбит и маннит.

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

Неионные поверхностно-активные вещества или детергенты (также известные как "смачивающие агенты") могут использоваться, чтобы способствовать сольubilизации терапевтического агента, а также для защиты терапевтического белка от агрегации, вызванной перемешиванием, что также позволяет подвергать композицию поверхностному напряжению сдвига, не вызывая денатурации активного терапевтического белка или антитела. Неионные поверхностно-активные вещества могут присутствовать в диапазоне концентраций от около 0,05 мг/мл до около 1,0 мг/мл, предпочтительно от около 0,07 мг/мл до около 0,2 мг/мл.

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

Дозы, используемые для введения, можно адаптировать в зависимости от различных параметров и, в частности, в зависимости от используемого способа введения, соответствующей патологии или, альтернативно, от желаемой продолжительности лечения. Для получения фармацевтических композиций эффективное количество антитела или фрагмента антитела может быть растворено или диспергировано в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде.

Фармацевтические формы, подходящие для инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии; составы, включающие кунжутное масло, арахисовое масло или водный пропиленгликоль; и стерильные порошки для немедленного получения стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко набрать при помощи шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы.

Растворы активных соединений в виде свободного основания или фармакологически приемлемых солей можно приготовить в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом. Дисперсии также могут быть приготовлены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, и в маслах. В обычных условиях хранения и использования эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

Антитело к CTLA4 или фрагмент антитела могут быть включены в композицию в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают кислотно-аддитивные соли (образованные со свободными аминогруппами белка) и которые образованы с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, шавев-



левая, винная, миндальная, и тому подобное. Соли, образованные свободными карбоксильными группами, также могут быть производными неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин, прокаин и т.п.

Носитель также может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.д.), их подходящие смеси и растительные масла. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов могут достигать при помощи различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобного. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические средства, например, сахара или хлорид натрия. Длительное всасывание композиций, вводимых путем инъекции, может быть достигнуто путем использования в композициях агентов, замедляющих всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные инъекционные растворы готовят путем включения активных соединений в необходимом количестве в подходящий растворитель с одним или более различными перечисленными выше другими ингредиентами в соответствии с требованиями и с последующей стерилизацией на фильтрах. В общем случае дисперсии готовят путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный базовый раствор, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами приготовления являются технологии вакуумной сушки и сублимационной сушки, которые приводят к получению порошка активного ингредиента плюс любой дополнительный активный ингредиент из его ранее стерильно-профильтрованного раствора.

Также предполагается получение большего количества или высококонцентрированных растворов для прямой инъекции, где предполагается, что использование диметилсульфоксида (ДМСО) в качестве растворителя приведет к чрезвычайно быстрому проникновению, доставляя высокие концентрации активных агентов к небольшой области опухоли.

После приготовления растворы будут вводить способом, совместимым с дозированной композицией, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы легко вводятся в виде различных лекарственных форм, таких как растворы для инъекций, описанные выше, но также можно использовать капсулы для высвобождения лекарственного средства и тому подобное.

Например, для парентерального введения в водном растворе, раствор при необходимости должен быть подходящим образом забуферен и жидкий разбавитель сначала должен быть доведен до изотонического состояния добавлением достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Такие конкретные водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутривнутрибрюшинного введения. В связи с этим специалистам в данной области техники в свете настоящего изобретения будет известна стерильная водная среда, которая может быть использована. Например, одну дозу можно растворить в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавить к 1000 мл жидкости для гиподермоклиза, либо ввести в предполагаемое место инфузии (см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15-е издание, страницы 1035-1038 и 1570-1580). В зависимости от состояния субъекта, получающего лечение, дозировка будет определенным образом изменена. Лицо, ответственное за введение, в любом случае будет определять подходящую дозу для каждого субъекта индивидуально.

Антитела или фрагменты антител могут быть включены в терапевтическую смесь для доставки от около 0,0001 до 10,0 миллиграммов, или от около 0,001 до 5 миллиграмм, или от около 0,001 до 1 миллиграмма, или от около 0,001 до 0,1 миллиграмма, или от около 0,1 до 1,0, или даже около 10 миллиграмм на дозу. Также можно вводить многократные дозы через выбранные интервалы времени.

В дополнение к соединениям, составленным для парентерального введения, такого как внутривенная или внутримышечная инъекция, другие фармацевтически приемлемые формы включают, например, таблетки или другие твердые вещества для перорального приема; капсулы с замедленным высвобождением; и любую другую форму, используемую в настоящее время.

В определенных вариантах осуществления предполагается применение липосом и/или наночастиц для введения антител или фрагментов антител в клетки-хозяева. Специалистам в данной области техники известно образование и применение липосом и/или наночастиц.

Нанокапсулы, как правило, могут удерживать соединения стабильным и воспроизводимым образом. Чтобы избежать побочных эффектов из-за внутриклеточной полимерной перегрузки, такие ультратонкие частицы (размером около 0,1 мкм) должны быть сконструированы с использованием полимеров, способных разлагаться *in vivo*. Биоразлагаемые наночастицы на основе полиалкилцианоакрилата, которые удовлетворяют этим требованиям, рассматриваются для использования в настоящем изобретении, и такие частицы можно легко получить.

Липосомы образуются из фосфолипидов, которые диспергированы в водной среде и спонтанно образуют мультиламеллярные концентрические двухслойные везикулы (также называемые мультиламел-

лярными везикулами (MLV)). MLV, как правило, имеют диаметр от 25 нм до 4 мкм. Обработка MLV ультразвуком приводит к образованию небольших однослойных везикул (SUV) с диаметром в диапазоне от 200 до 500 Å, содержащих водный раствор в ядре. Физические характеристики липосом зависят от pH, ионной силы и присутствия двухвалентных катионов.

Фармацевтические составы, содержащие антитело к CTLA4 или фрагмент антитела, как описано в данном документе, получают путем смешивания такого антитела или фрагмента антитела, имеющего желаемую степень чистоты, с одним или более необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители являются в общем случае нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают, но не ограничиваются этим, буферные вещества, например, фосфат, цитрат и другие органические соли; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (например, хлорид октадецилдиметилбензилламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензэтония; фенол; бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, например, метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и m-крезол); низкомолекулярные (содержащие менее 10 остатков) полипептиды; белки, например, сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, например, поливинилпирролидон; аминокислоты, например, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, например, ЭДТА; сахара, например, сахарозу, маннит, трегалозу или сорбит; солеобразующие противоионы, например, натрия; металлсодержащие комплексы (например, комплексы Zn-белок) и/или неионогенные сурфактанты, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Примеры фармацевтически приемлемых носителей в данном документе дополнительно включают средства, обеспечивающие внутритканевое распределение лекарственных средств, таких как растворимые нейтрально-активные гликобелки, содержащие гиалуронидазу (sHASEGP), например, растворимые гликобелки PH-20 человека, содержащие гиалуронидазу, такие как gHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Некоторые примеры sHASEGP и способы применения, в том числе gHuPH20, описаны в публикациях патентов США №№ 2005/0260186 и 2006/0104968. В одном аспекте sHASEGP объединяют с одним или более дополнительными глюкозаминогликаназами, такими как хондроитиназы.

Иллюстративные лиофилизированные составы антител описаны в патенте США № 6267958. Водные составы антител включают те, которые описаны в патенте США № 6171586 и W02006/044908, последние составы содержат гистидин-ацетатный буфер.

Состав, описанный в данном документе, может также содержать более одного активного ингредиента, если необходимо для лечения конкретного показания. Предпочтительно ингредиенты с взаимодополняющей активностью, которые не влияют отрицательно друг на друга, могут быть объединены в единый состав. Например, может быть желательно обеспечить антагонист РЭФР (такой как эрлотиниб), антиангиогенный агент (такой как антагонист РЭФР, который может быть антителом к РЭФР) или химиотерапевтический агент (такой как таксоид или агент на основе платины) в дополнение к антителу к CTLA4, фрагменту антитела или иммуноконъюгату по настоящему изобретению. Такие активные ингредиенты присутствуют в надлежащей комбинации в количествах, которые эффективны для предполагаемого применения.

В одном варианте осуществления антитело к CTLA4, фрагмент антитела или иммуноконъюгат по настоящему изобретению комбинируют в составе с другим антителом или фрагментом антитела против антигена, выбранного из PD1, PD-L1, AXL, ROR2, CD3, HER2, B7-H3, ROR1, SFRP4 и белок WNT, включая WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16. Комбинация может быть в форме двух отдельных молекул: антитела к CTLA4, фрагмента антитела или иммуноконъюгата по настоящему изобретению и другого антитела или фрагмента антитела. Альтернативно, комбинация также может представлять собой форму одной молекулы с аффинностью связывания как с CTLA4, так и с другим антигеном, таким образом образуя полиспецифическое (например, биспецифическое) антитело.

Активные ингредиенты могут быть инкапсулированы в микрокапсулы, полученные, например, методами коацервации или межфазной полимеризации. Например, можно использовать гидроксиметилцеллюлозу или желатиновые микрокапсулы и полиметилметацилатные микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах для доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микро-сферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсиях. Такие методы раскрыты в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Можно получить препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело или фрагмент антитела, причем матрицы могут быть представлены в форме, например, пленок или микрокапсул.

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

Е. Терапевтические способы и композиции.

Любые из антител к CTLA4 или фрагментов антител, предложенных в данном документе, можно использовать в терапевтических способах. В одном аспекте предусмотрено антитело к CTLA4 или фрагмент антитела для использования в качестве лекарственного средства. В дополнительных аспектах антитело к CTLA4 или фрагмент антитела для применения при лечении злокачественного новообразования (например, рака груди, немелкоклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы, рака мозга, рака поджелудочной железы, мозга, почек, яичников, желудка, лейкоза, рака эндометрия матки, толстой кишки, предстательной железы, щитовидной железы, печени, остеосаркомы и/или меланомы). В определенных вариантах осуществления предложено антитело к CTLA4 или фрагмент антитела для применения в способе лечения. В определенных вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к CTLA4 или фрагмент антитела для применения в способе лечения индивидуума, страдающего от злокачественного новообразования, включающем введение индивидууму эффективного количества антитела к CTLA4 или фрагмента антитела. В определенных вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело или фрагмент антитела к CTLA4 для применения в способе лечения индивидуума, страдающего иммунологическим нарушением (например, аутоиммунным заболеванием), сердечно-сосудистым заболеванием (например, атеросклерозом, гипертонией, тромбозом), инфекционным заболеванием (например, вирусом Эбола, вирусом Марбург) или диабетом, включающем введение индивидууму эффективного количества антитела к CTLA4 или фрагмента антитела. В одном таком варианте осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, например, как описано ниже. В дополнительных вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к CTLA4 или фрагмент антитела для применения в ингибировании ангиогенеза, ингибировании пролиферации клеток, ингибировании иммунной функции, ингибирования секреции воспалительных цитокинов (например, из связанных с опухолью макрофагов), ингибировании сосудистой сети опухоли (например, внутриопухолевой сосудистой сети или связанной с опухолью сосудистой сети) и/или ингибировании функции стромы опухоли.

В определенных вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело или фрагмент антитела к CTLA4 для применения в способе ингибирования ангиогенеза, ингибирования пролиферации клеток, ингибирования иммунной функции, ингибирования секреции воспалительных цитокинов (например, из связанных с опухолью макрофагов), ингибирования сосудистой сети опухоли (например, внутриопухолевой сосудистой сети или связанной с опухолью сосудистой сети), и/или ингибирование функции стромы опухоли у индивидуума, включающем введение индивидууму эффективного количества антитела к CTLA4 или фрагмента антитела для ингибирования ангиогенеза, ингибирования пролиферации клеток, ингибирования иммунной функции, ингибирования секреции воспалительных цитокинов (например, из связанных с опухолью макрофагов), ингибирования развития сосудистой сети опухоли (например, внутриопухолевой сосудистой сети или связанной с опухолью сосудистой сети) и/или ингибирования функции стромы опухоли. "Индивидуум" согласно любому из вышеуказанных вариантов осуществления предпочтительно является человеком.

В дополнительном аспекте в изобретении предложено применение антитела к CTLA4 или фрагмента антитела при производстве или приготовлении лекарственного препарата. В одном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для лечения злокачественного новообразования (в некоторых вариантах осуществления рака груди, немелкоклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы, рака мозга, рака поджелудочной железы, мозга, почек, яичников, желудка, лейкоза, рака эндометрия матки, толстой кишки, предстательной железы, щитовидной железы, печени, остеосаркомы и/или меланомы). В дополнительном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения злокачественного новообразования, включающем введение индивидууму, страдающему от злокачественного новообразования, эффективного количества лекарственного средства. В дополнительном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения иммунологического нарушения (например, аутоиммунного нарушения), сердечно-сосудистого расстройства (например, атеросклероза, гипертонии, тромбоза), инфекционного заболевания (например, вируса Эбола, вируса Марбург) или диабета, включающем введение индивидууму эффективного количества антитела к CTLA4 или фрагмента антитела. В одном таком варианте осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, например, как описано ниже. В дополнительном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для ингибирования ангиогенеза, ингибирования пролиферации клеток, ингибирования иммунной функции, ингибирования секреции воспалительных цитокинов (например, из связанных с опухолью макрофагов), ингибирования сосудистой сети опухоли (например, внутриопухолевой сосудистой сети или связанной с опухолью сосудистой сети) и/или ингибирования функции стромы опухоли. В дополнительном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для применения в способе ингибирования ангиогенеза, ингибирования пролиферации клеток, ингибирования иммунной функции, ингибирования секреции воспалительных цитокинов (например, из связанных с опухолью макрофагов), ингибирования сосудистой сети опухоли (например, внутриопухолевой сосудистой сети или связанной с опухолью сосудистой сети), и/или ингибирования функции стромы опухоли у индивидуума, включающее введение индивидууму количества, эффективно-

го для лекарственного средства для ингибирования ангиогенеза, ингибирования пролиферации клеток, стимулирования иммунной функции, индукции секционирования воспалительных цитокинов (например, из связанных с опухолью макрофагов), ингибирования развития сосудистой сети опухоли (например, внутриопухолевой сосудистой сети или связанной с опухолью сосудистой сети) и/или ингибирования функции стромы опухоли. "Индивидуум" согласно любому из вышеуказанных способов может представлять собой человека.

В дополнительном аспекте изобретение обеспечивает способ лечения злокачественного новообразования. В одном варианте осуществления способ включает введение индивидууму, страдающему от такого злокачественного новообразования, эффективного количества антитела к CTLA4 или фрагмента антитела. В дополнительных случаях способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, например, как описано ниже. "Индивидуум" согласно любому из вышеуказанных способов может представлять собой человека.

В дополнительном аспекте изобретение обеспечивает способ лечения иммунологического нарушения (например, аутоиммунного нарушения), сердечно-сосудистого нарушения (например, атеросклероза, гипертонии, тромбоза), инфекционного заболевания (например, вируса Эбола, вируса Марбург) или диабета. В дополнительных случаях способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, например, как описано ниже. "Индивидуум" согласно любому из вышеуказанных способов может представлять собой человека.

В дополнительном аспекте изобретение обеспечивает способ ингибирования ангиогенеза, ингибирования пролиферации клеток, ингибирования иммунной функции, ингибирования секреции воспалительных цитокинов (например, из связанных с опухолью макрофагов), ингибирования сосудистой сети опухоли (например, внутриопухолевой сосудистой сети или связанной с опухолью сосудистой сети) и/или ингибирования функции стромы опухоли у индивидуума. В одном варианте осуществления способ включает введение индивидууму эффективного количества антитела к CTLA4 или фрагмента антитела для ингибирования ангиогенеза, ингибирования пролиферации клеток, стимуляции иммунной функции, индукции секреции воспалительных цитокинов (например, из связанных с опухолью макрофагов), ингибирования развития сосудистой сети опухоли (например, внутриопухолевой сосудистой сети или связанной с опухолью сосудистой сети) и/или ингибирования функции стромы опухоли. В одном варианте осуществления изобретения индивидуум представляет собой человека.

В дополнительном аспекте изобретение относится к фармацевтическим составам, содержащим любое из антител к CTLA4 или фрагментов антител, предложенных в данном документе, например, для использования в любом из вышеуказанных терапевтических способов. В одном варианте осуществления фармацевтический состав содержит любое из антител к CTLA4 или фрагментов антител, предложенных в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В еще одном варианте осуществления фармацевтический состав содержит любое из антител к CTLA4 или фрагментов антител, предложенных в данном документе, и по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент, например, как описано ниже.

При каждом лечении, описанном выше, антитела или фрагменты антител по изобретению можно использовать по отдельности, в качестве иммуноконъюгатов или в комбинации с другими агентами в терапии. Например, антитело по изобретению можно вводить одновременно, по меньшей мере, с одним дополнительным терапевтическим агентом. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой антиангиогенный агент. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой антагонист ФРЭС (в некоторых вариантах реализации антитело к ФРЭС, например, бевацизумаб). В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой антагонист РЭФР (в некоторых вариантах осуществления, эрлотиниб). В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент и/или цитостатический агент. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой таксоид (например, паклитаксел) и/или платиновый агент (например, карбоплатин). В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой агент, усиливающий иммунитет или иммунную систему пациента.

Такие комбинированные терапии, указанные ранее, охватывают комбинированное введение (в котором два или более терапевтических агента включены в одну и ту же или отдельные композиции), а также раздельное введение, и в этом случае, введение антитела или фрагмента антитела может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента и/или адьюванта. Антитела или фрагменты антител также можно использовать в сочетании с лучевой терапией.

Антитела к CTLA4 или фрагменты антител могут быть составлены, дозированы и введены способом, совместимым с надлежащей медицинской практикой. Факторы, которые следует учитывать в этом контексте, включают конкретное заболевание, которое лечат, конкретное млекопитающее, которое лечат, клиническое состояние отдельного пациента, причину расстройства, место доставки агента, способ вве-

дения, схему введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Антитело или фрагмент антитела необязательно должно быть, но может быть составлено с одним или более агентами, используемыми в настоящее время для предотвращения или лечения рассматриваемого расстройства. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антитела или фрагмента антитела, присутствующего в составе, типа расстройства или лечения и других факторов, обсуждаемых выше. Они, как правило, используются в тех же дозировках и с путями введения, как описано в данном документе, или приблизительно от 1 до 99% дозировок, описанных в данном документе, или в любой дозировке и любым путем, который эмпирически/клинически определен как подходящий.

Для профилактики или лечения заболевания подходящая доза антитела или фрагмента антитела (при использовании отдельно или в комбинации с одним или более другими дополнительными терапевтическими агентами) будет зависеть от типа заболевания, которое подлежит лечению, типа антитела или фрагмента антитела, степени тяжести и течения заболевания, того, вводится ли антитело или фрагмент антитела в профилактической или терапевтической цели, предыдущей терапии, истории болезни пациента и ответа на антитело или фрагмент антитела, а также предписания лечащего врача. Антитело или фрагмент антитела легко вводить пациенту однократно или в течение серии курсов лечения. В зависимости от типа и степени тяжести заболевания, около 1 мкг антитела или фрагмента антитела/кг массы тела пациента до 40 мг антитела или фрагмента антитела/кг массы тела пациента может быть начальной дозой кандидата для введения пациенту, будь то, например, одним или более отдельными введениями или непрерывной инфузией. Одна типичная суточная доза может варьироваться от около 1 мкг антитела или фрагмента антитела/кг массы тела пациента до 100 мг антитела или фрагмента антитела/кг массы тела пациента или более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. В случае повторных введений в течение нескольких суток или более, в зависимости от состояния, лечение, как правило, проводят до достижения желаемой степени подавления симптомов заболевания. Такие дозы можно вводить периодически, например, каждую неделю или каждые три недели (например, так, чтобы пациент получал от около двух до около двадцати, или, например, около шести доз антитела или фрагмента антитела). Может быть введена начальная более высокая нагрузочная доза, за которой следует одна или несколько более низких доз. Однако, могут быть полезными другие схемы приема лекарственного средства. Прогресс этой терапии легко контролировать при помощи обычных методов и тестов.

Конкретные дозировки антитела к CTLA4 или фрагмента антитела по настоящему изобретению, которые можно вводить для профилактики или лечения заболевания у субъекта, могут составлять около 0,3, 0,6, 1,2, 18, 2,4, 3,0, 3,6, 4,2, 4,8, 5,4, 6,0, 6,6, 7,2, 7,8, 8,4, 9,0, 9,6 или 10,2 мг антитела или фрагмента антитела/кг массы тела пациента. В определенных вариантах осуществления дозировка может находиться в диапазоне 0,3-2,4, 2,4-4,2, 4,2-6,0, 6,0-7,8, 7,8-10,2, 10,2-12, 12-14, 14-16, 16-18 или 18-20 мг антитела или фрагмента антитела/кг массы тела пациента. Дозировка антитела или фрагмента антитела останется прежней при введении в форме биспецифического антитела, в комбинации с другим ингибитором иммунной контрольной точки или другим антителом или фрагментом антитела или в виде иммуноконъюгата. Кроме того, полипептид, обладающий активностью к CTLA4, будет вводиться в тех же количествах, что и антитело или фрагмент антитела.

Единичная доза фармацевтического состава по настоящему изобретению может содержать антитело к CTLA4 или фрагмент антитела по настоящему изобретению в количестве от около 45 мкг антитела или фрагмента антитела от около 13600 мг или около от 45 мкг антитела или фрагмент антитела от около 5440 мг. В некоторых вариантах осуществления единичная доза фармацевтического состава по настоящему изобретению может содержать антитело к CTLA4 или фрагмент антитела по настоящему изобретению в количестве от 135 мг до 1387 мг, или такое количество, как 135, 235, 335, 435, 535, 635, 735, 835, 935, 1035, 1135, 1235, 1387 мг. В определенных вариантах осуществления количество антитела к CTLA4 или фрагмента антитела по настоящему изобретению в единичной дозе фармацевтического состава находится в диапазоне 135-235, 235-335, 335-435, 435-535, 535-635, 635-735, 735-835, 835-935, 935-1035, 1035-1135, 1135-1235, 1235-1387 мг. Количество антитела или фрагмента антитела в единичной дозе фармацевтического препарата останется неизменным при введении в форме биспецифического антитела, в комбинации с другим ингибитором иммунной контрольной точки или в виде иммуноконъюгата, или в комбинации с другим антителом или фрагментом антитела против другого антигена, как раскрыто в данном документе. Кроме того, полипептид, обладающий активностью к CTLA4, будет включен в единичную дозу фармацевтического состава в тех же количествах, что и антитело или фрагмент антитела.

В одном примере антитело к CTLA4 или фрагмент антитела могут быть конъюгированы с другой молекулой ингибитора иммунных контрольных точек или могут образовывать часть биспецифического антитела с другим ингибитором иммунных контрольных точек.

Молекула другого ингибитора иммунной контрольной точки может быть антителом или фрагментом антитела против другой иммунной контрольной точки, помимо CTLA4. Комбинация может представлять собой антитело к CTLA4 или фрагмент антитела, описанные в этой заявке, и другую молекулу ингибитора иммунной контрольной точки, вводимую в виде отдельных молекул или в виде биспецифического антитела. Такое биспецифическое антитело обладает связывающей активностью с CTLA4 и второй связывающей активностью с другой иммунной контрольной точкой.

Иммунная контрольная точка может быть выбрана из LAG3, TIM3, TIGIT, VISTA, BTLA, OX40, CD40, 4-1BB, PD-1, PD-L1 и GITR (Zahavi and Weiner, International Journal of Molecular Sciences, vol. 20, 158, 2019). Дополнительные иммунные контрольные точки включают B7-H3, B7-H4, KIR, A2aR, CD27, CD70, DR3 и ICOS (Manni et al., Immune checkpoint blockade and its combination therapy with small-molecule inhibitors for cancer treatment, Bbcan, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.12.002>, 2018).

Иммунная контрольная точка предпочтительно представляет собой PD-1 или PD-L1.

Следует понимать, что любой из вышеуказанных составов или любой из терапевтических способов могут быть осуществлены с использованием фрагмента антитела или иммуноконъюгата согласно изобретению вместо или в дополнение к антителу к CTLA4.

Повышение иммунной функции хозяина для борьбы с опухолями является предметом растущего интереса. Обычные методы включают (i) стимулирование АПК, такое как (a) инъекция в опухоль ДНК, кодирующей чужеродные аллоантигены МНС, или (b) трансфекцию биопсированных опухолевых клеток генами, которые увеличивают вероятность распознавания иммунного антигена (например, иммуностимулирующими цитокинами, ГМ-КСФ, костимулирующие молекулы B7.1, B7.2) опухоли, (iii) адоптивную клеточную иммунотерапию или лечение активированными опухолеспецифическими Т-клетками.

Адоптивная клеточная иммунотерапия включает выделение инфилтрирующих опухоль Т-лимфоцитов хозяина, увеличение популяции *in vitro*, например, посредством стимуляции ИЛ-2 или опухолью, или и тем, и другим. Кроме того, выделенные Т-клетки, которые являются дисфункциональными, также могут быть активированы путем применения *in vitro* антител к PD-L1 по изобретению. Затем активированные таким образом Т-клетки могут быть повторно введены в организм хозяина. Один или более из этих способов можно использовать в комбинации с введением антитела, фрагмента антитела или иммуноконъюгата по настоящему изобретению.

Традиционные способы лечения злокачественного новообразования включают следующее: (i) лучевую терапию (например, лучевую терапию, терапию рентгеновским излучением, облучение) или использование ионизирующего излучения для уничтожения раковых клеток и уменьшения размеров опухолей. Лучевая терапия может проводиться либо наружно при помощи внешней лучевой терапии (ДЛТ), либо внутренне при помощи брахитерапии; (ii) химиотерапию или применение цитотоксических лекарственных средств, которые, как правило, влияют на быстро делящиеся клетки; (iii) таргетные терапии или агенты, которые специфически влияют на deregулированные белки раковых клеток (например, ингибиторы тирозинкиназы иматиниб, гефитиниб; моноклональные антитела, фотодинамическая терапия); (iv) иммунотерапию или усиление иммунного ответа хозяина (например, вакцина); (v) гормональную терапию или блокаду гормона (например, когда опухоль чувствительна к гормонам), (vi) ингибитор ангиогенеза или блокаду образования и роста кровеносных сосудов, и (vii) паллиативный уход или лечение, направленное на улучшение качества ухода за больным для уменьшения боли, тошноты, рвоты, диареи и кровотечения. В более агрессивных схемах лечения могут использоваться обезболивающие препараты, такие как морфин и оксикодон, противорвотные средства, такие как ондансетрон и апрепитант.

При лечении злокачественного новообразования любой из ранее описанных традиционных способов повышения противоракового иммунитета может проводиться до, после или одновременно с введением антител к CTLA4 или фрагментов антител. Кроме того, антитела к CTLA4 или их фрагменты можно вводить до, после или одновременно с традиционными методами лечения злокачественного новообразования, такими как введение связывающих опухоль антител (например, моноклональных антител, токсин-конъюгированных моноклональных антител) и/или введение химиотерапевтических агентов.

**Е. Промышленные изделия и наборы.**

В другом аспекте изобретения предложено промышленное изделие, содержащее антитело к CTLA4 или фрагмент антитела и другие материалы, полезные для лечения, профилактики и/или диагностики нарушений, описанных выше. Изделие содержит контейнер и размещенную с контейнером или находящуюся на нем этикетку или вкладыш в упаковку. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты с растворами для в/в введения и т.д. Контейнеры можно формировать из различных материалов, например, из стекла или пластика. Контейнер содержит композицию, одну или в комбинации с другой композицией, эффективной в лечении, профилактике и/или диагностировании патологического состояния, и может иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может представлять собой пакет для растворов для внутривенного введения или флакон с пробкой, прокалываемой при помощи иглы для подкожных инъекций). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой антитело или фрагмент антитела по изобретению. На этикетке или листке-вкладыше в упаковке указано то, что композиция используется для выбранного патологического состояния. Кроме того, изделие может содержать (a) первый контейнер с содержащейся в нем композицией, причем композиция содержит антитело или фрагмент антитела по изобретению; и (b) второй контейнер с содержащейся в нем композицией, причем композиция содержит дополнительный цитотоксический или иной терапевтический агент. Промышленное изделие в этом варианте осуществления изобретения может дополнительно содержать вкладыш в упаковку, указывающий, что композиции могут использоваться для лечения конкретного патологического состояния. Альтернативно или дополнительно изделие может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый бу-

фер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буферный раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Дополнительно могут быть включены другие вещества, желательные с коммерческой и потребительской точки зрения, включая другие буферы, растворители, фильтры, иглы и шприцы.

Понятно, что любое из вышеуказанных промышленных изделий может включать иммуноконъюгат по изобретению вместо или в дополнение к антителу к CTLA4 или фрагменту антитела.

Наконец, изобретение также обеспечивает наборы, содержащие по меньшей мере одно антитело или фрагмент антитела по изобретению. Наборы, содержащие полипептид, антитела или фрагменты антител, или конъюгат антитело-лекарство по настоящему изобретению, находят применение в обнаружении экспрессии CTLA4 (увеличении или уменьшении) или в терапевтических или диагностических анализах. Наборы по настоящему изобретению могут содержать антитело, связанное с твердой подложкой, например, планшетом для культуры ткани или гранулами (например, гранулами сефарозы). Могут быть предложены наборы, которые содержат антитела для обнаружения и количественного определения CTLA4 *in vitro*, например, в ИФА или вестерн-блоттинге. Такое антитело, пригодное для обнаружения, может быть обеспечено меткой, такой как флуоресцентная или радиоактивная метка.

Наборы также содержат инструкции по их применению. В некоторых вариантах осуществления инструкции содержат инструкции, требуемые Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для диагностических наборов *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно содержат инструкции по диагностике присутствия или отсутствия спинномозговой жидкости в образце на основе присутствия или отсутствия CTLA4 в указанном образце. В некоторых вариантах осуществления наборы содержат одно или более антител или фрагментов антител. В других вариантах осуществления наборы дополнительно содержат один или более ферментов, ингибиторов ферментов или активаторов ферментов. В других вариантах осуществления наборы дополнительно содержат одно или более соединений для хроматографии. В еще других вариантах осуществления наборы дополнительно содержат одно или более соединений, используемых для приготовления образца для спектроскопического анализа. В дополнительных вариантах осуществления наборы дополнительно содержат сравнительный эталонный материал для интерпретации присутствия или отсутствия CTLA4 в соответствии с интенсивностью, цветовым спектром или другим физическим свойством индикатора.

Следующие ниже примеры иллюстрируют, но не ограничиваются ими, мягкие желатиновые капсулы по настоящему изобретению. Другие подходящие модификации и адаптации множества условий и параметров, обычно встречающихся в данной области техники и очевидных для специалистов в данной области техники, находятся в пределах объема изобретения.

#### Примеры

Пример 1. Условно активные биологические (СAB) антитела против CTLA4.  
В этом примере были получены антитела против CTLA4 (табл. 2).

Таблица 2

Условно активные антитела против CTLA4

Антитело к CTLA4	Варибельные области		Варибельная область	
	SEQ ID NO	легкой цепи	SEQ ID NO	тяжелой цепи
BA-087-05-19	SEQ ID NO	7	SEQ ID NO	8
BA-087-08-32	SEQ ID NO	9	SEQ ID NO	10
BA-087-01-07	SEQ ID NO	11	SEQ ID NO	12
BA-087-01-09	SEQ ID NO	13	SEQ ID NO	14
BA-087-03-03	SEQ ID NO	15	SEQ ID NO	16
BA-087-03-04	SEQ ID NO	17	SEQ ID NO	18
BA-087-04-04	SEQ ID NO	19	SEQ ID NO	20
BA-087-04-07	SEQ ID NO	21	SEQ ID NO	22
BA-087-05-02	SEQ ID NO	23	SEQ ID NO	24
BA-087-06-11	SEQ ID NO	25	SEQ ID NO	26
BA-087-08-09	SEQ ID NO	27	SEQ ID NO	28
BA-087-09-01-03	SEQ ID NO	29	SEQ ID NO	30
BA-087-09-01-02	SEQ ID NO	31	SEQ ID NO	32
BA-087-09-01-06	SEQ ID NO	33	SEQ ID NO	34
BA-087-09-02-02	SEQ ID NO	35	SEQ ID NO	36
BA-087-09-02-06	SEQ ID NO	37	SEQ ID NO	38

Эти антитела к CTLA4 были дополнительно охарактеризованы. Данные для антител BA-087-05-19 и BA-087-08-32 представлены в этой заявке.

Пример 2. Анализ на основе ИФА на связывающую активность антител к CTLA4.

Связывающую активность ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 с иммобилизованным рекомбинантным человеческим СТЛА4 определяли при помощи иммуноферментного анализа (ИФА) в буфере с pH 6,0 (pH опухолевого микроокружения) или в буфере с pH 7,4 (нормальный физиологический pH). Серийно разведенные ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 связывали с рекомбинантным внеклеточным доменом СТЛА4 человека, иммобилизованным в лунках. Количество связанных ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 определяли с использованием антитела к человеческому IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена (ПХ), которая затем реагировала с 3,3',5,5' тетраметилбензидином (ТМВ), колориметрическим субстратом, для получения окрашенного продукта. Поглощение в ОП в каждой лунке была пропорциональна количеству связанных ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32. Значения ЭК<sub>50</sub> при pH 6,0 для связывания с человеческим СТЛА4 рассчитывали с использованием модели нелинейной аппроксимации (вариабельный угловой коэффициент, четыре параметра) GraphPad Prism версии 7.03.

Значения ЭК<sub>50</sub> связывающей активности ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 с человеческим СТЛА4 при pH 6,0 и pH 7,4 показаны в табл. 3-4, а кривые связывания для репрезентативных экспериментов показаны на фиг. 3А-3В. Как ВА-087-05-19, так и ВА-087-0832 демонстрируют сходную связывающую активность при pH 6,0 и значительно сниженную связывающую активность при pH 7,4 с человеческим СТЛА4 по сравнению с ипилимумабом и аналогом ипилимумаба.

Таблица 3  
Связывающая активность ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 с человеческим СТЛА4 при pH

Способ	pH 6,8 ИФА			
Антиген	huCTLA-4			
Исследуемое изделие	ипилимумаб (№ AAQ2326)	ипи-аналог (№6960)	ВА-087-05-19 (№ 6972)	ВА-087-05-32 (№ 6978)
ЭК <sub>50</sub> (нг/мл)	1068	13,04	9,58	14,59
06/27/17				
ЭК <sub>50</sub> (нг/мл)				
06/29/17	5,85	6,10	659	8,57
ЭК <sub>50</sub> (нг/мл)				
06/11/17	5,10	5,26	8,55	6,17
ЭК <sub>50</sub> (нг/мл), Среднее +/- СО	7,21 +/- 3,03	0,13+/-4,27	8,18 +/- 1,61	9,78 +/- 1,34

Таблица 4  
Связывающая активность ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 с человеческим СТЛА4 при pH 7,0

Способ	pH 7,0 ИФА			
Антиген	huCTLA-4			
Исследуемое изделие	ипилимумаб (№ AAQ2326)	ипи-аналог (№6960)	ВА-087-05-19 (№ 6972)	ВА-087-05-32 (№ 6978)
ЭК <sub>50</sub> (нг/мл)				
06/27/17	11,16	10,95	35,82	Не рассчитано
ЭК <sub>50</sub> (нг/мл)				
06/29/17	3,71	3,67	93,37	Не рассчитано
ЭК <sub>50</sub> (нг/мл)				
06/11/17	3,08	3,08	50,18	Не рассчитано
ЭК <sub>50</sub> (нг/мл), Среднее +/- СО	7,21 +/- 3,03	6,41+/-3,96	59,79 +/- 29,95	Не рассчитано

Кроме того, связывающую активность ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 с иммобилизованным рекомбинантным внеклеточным доменом СТЛА4 яванского макака также определяли при помощи ИФА. ЭК<sub>50</sub> связывающей активности ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 с СТЛА4 яванского макака при pH 6,0 показан в табл. 5. Связывающая активность ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 с СТЛА4 яванского макака при pH 6,0 и pH 7,4 показана на фиг. 4А-4В.



Таблица 5

Связывающая активность ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 с СТЛА4 яванского макака при рН 6,0

Способ	рН 6,0 ИФА			
Антиген	суноСТЛА-4			
Исследуемое изделие	ипилимумаб (№ ААQ2326)	ипи-аналог (№6960)	ВА-087-05-19 (№ 6972)	ВА-087-05-32 (№ 6978)
ЭК <sub>50</sub> (нг/мл) 06/19/17	9,66	11,06	15,89	258,80
ЭК <sub>50</sub> (нг/мл) 06/27/17	20,99	11,17	39,72	292,10
ЭК <sub>50</sub> (нг/мл), Среднее +/- СО	15,34 +/- 7,99	11,12 +/- 0,08	27,68 +/- 16,53	275,45 +/- 19,23

ЭК<sub>50</sub> связывающей активности ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 при рН 6,0 опухолевого микроокружения, измеренного при помощи ИФА, составила 8,18 нг/мл и 9,78 нг/мл, соответственно, для человеческого СТЛА4, что аналогично ЭК<sub>50</sub>, определенному для ипилиумаба и аналога ипилиумаба. ВА-087-05-19 обладает сходной связывающей активностью с СТЛА4 человека и яванского макака при рН 6,0, в то время как ВА-087-08-32 имеет пониженную связывающую активность с СТЛА4 яванского кролика по сравнению с его связывающей активностью с СТЛА4 человека при рН 6,0. Падение связывающей активности ВА-087-08-32 с СТЛА4 яванского макака при рН 6,0, наблюдаемое в ИФА, по-видимому, является специфическим для анализа на основе ИФА, поскольку такое же падение не наблюдалось при использовании ПИР или проточной цитометрии. Связывающая активность ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 с СТЛА4 человека или яванского макака при нормальном физиологическом рН 7,4, измеренная при помощи ИФА, была значительно ниже, чем связывающая активность при рН 6,0.

Пример 3. рН-зависимая связывающая активность антител к СТЛА4.

Связывающую активность антител к СТЛА4 тестировали при помощи анализа на основе ИФА в диапазоне рН от 5,0 до 7,4. Рекombинантный внеклеточный домен СТЛА4 человека иммобилизовали в различных буферах рН в лунках (рН от 5,0 до рН 7,4), имитирующих рН опухолевого микроокружения (рН от 5,5 до рН 6,7) и нормальный физиологический рН (рН 7,4), а активность связывания измеряли с использованием ИФА. Антитела ВА-087-05-19 и ВА-087-0832 серийно разводили и измеряли их связывающую активность с внеклеточным доменом рекombинантного человеческого СТЛА4. Количество связанных антител ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 определяли с использованием конъюгированного с пероксидазой хрена (ПХ) антитела к человеческому IgG, которое затем реагировало с колориметрическим субстратом 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (ТМВ) для получения окрашенного продукта. Поглощение в ОП в каждой лунке была пропорциональна количеству связанных ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32.

Точка перегиба по значению рН (=50% связывающей активности при рН 6,0) для ВА-087-05-19 была рассчитана как рН 6,97, при этом 90% связывающей активности присутствует при рН 6,66. Точка перегиба по значению рН (=50% связывающей активности при рН 6,0) для ВА-087-08-32 была рассчитана как рН 6,43, при этом 90% связывающей активности наблюдали при рН 6,2.

Средние значения ОП (из 2 повторов) при различных рН наносили на график в зависимости от рН буфера с использованием программного обеспечения Softmax Pro (Molecular Devices). Аппроксимацию кривой проводили с использованием 4-параметрической модели, встроенной в программное обеспечение. Точка перегиба кривой рН (=50% связывающей активности при рН 6,0) равна параметру С эмпирического уравнения. Связывающая активность при рН 6,0 была установлена на 100%. Значение рН для 90% связывающей активности было интерполировано из подобранной кривой с использованием функции "InterpX" программного обеспечения Softmax Pro.

Средние значения рН для 50% и 90% активности для ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 были рассчитаны с использованием значений рН, полученных в экспериментах 1-4. В экспериментах 1-4 использовали ВА-087-05-19 (номер партии № 6972) и ВА-087-08-32 (номер партии № 6978). Другие партии ВА-087-05-19 (номер партии № 6901) и ВА-087-08-32 (номер партии № 6902) были использованы в эксперименте 5. Значения рН для 50% и 90% активности для ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32, определенные по данным эксперимента 5, были аналогичны средним значениям рН, рассчитанным с использованием значений рН из экспериментов 1-4; см. табл. 6.

pH-зависимое связывание ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32

Антитела	ВА-087-05-19		ВА-887-88-32	
	pH	pH (50%)	pH	pH
Эксперимент 1 (06282017)	6,76	7,04	6,39	6,55-
Эксперимент 2 (07062017)	6,55	6,99	6,16	6,37
Эксперимент 3 (07112017)	6,51	S.S3	6,17	6,33
Эксперимент 4 (07112817)	6, 81	7,02	6.IS	6,43
Среднее значение $\pm$ CO	6,66 $\pm$ 015	6,07 $\pm$ 0,16	6,23 $\pm$ 0,11	6,43 $\pm$ 0,10
Эксперимент 5 (06202817)	6,34	6,63	6,2	6,36

Связывающая активность ВА-087-05-019 и ВА-087-08-32, а также положительных контролей ипилиумаба и аналога ипилиумаба с рекомбинантным человеческим CTLA4 в буферах с различным pH показаны на фиг. 5. Точки перегиба pH-зависимого связывания для ВА-08705-19 и ВА-087-08-32 были рассчитаны как при pH 6,97, так и при pH 6,43, соответственно. 90% связывающих активностей для ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 наблюдали при pH 6,34 и pH 6,2 соответственно. Кроме того, более слабая связывающая активность как для ВА-087-05-19, так и для ВА-08708-32 была обнаружена при нормальном физиологическом pH 7,4 (фиг. 5).

Пример 4. Кинетика связывания антител к CTLA4.

Кинетику связывания антител ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 измеряли с использованием поверхностного плазмонного резонанса (ППР) на иммобилизованном рекомбинантном CTLA4 человека или яванского макака при pH 6,0 и pH 7,4. Внеклеточный домен CTLA4 (человека или яванского макака) был иммобилизован на поверхности сенсорного чипа. Были введены различные концентрации ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32, и взаимодействие связывания с иммобилизованным CTLA4 и контрольной поверхностью отслеживалось в режиме реального времени. Кинетику связывания рассчитывали с использованием модели Лангмюра 1:1, встроенной в программное обеспечение для анализа.

Антитело ВА-087-05-19 проявляло суб-наномолярную связывающую активность при pH 6,0. Связывающая активность снижается с pH 6,0 до pH 7,4 примерно в 2 раза ( $K_d$  [pH 6,0] = 0,5 нМ;  $K_d$  [pH 7,4] = 1,1 нМ). В дополнение к более низкой связывающей активности при pH 7,4, сигнал ППР при pH 7,4 достигает только около 20% уровня сигнала, обнаруженного при pH 6,0, что указывает на то, что только небольшая фракция присутствующего ВА-087-05-19 способна связываться с человеческим CTLA4 при pH 7,4; см. табл. 7.

Таблица 7

Связывающая активность ВА-087-05-19 с человеческим CTLA4 при различных значениях pH

pH 6,0			pH 7,4		
Ka [M*s]	Kd [s <sup>-1</sup> ]	KD [M]	Ka [M *s ]	Kd [s <sup>-1</sup> ]	KD [M]
1.34E+06	6.31E-04	4.72E-10	9.06E + 05	1.26E-03	1.39E-09
1.26E + 06	6.04E-04	4.81E-10	8.57E + 05	6,31E-04 6.69E-04	7.81E-10
1.10E + 06	5.98E-04	5.43E-10	8.44E + 05	9.43E-04	1.12E-09
<b>Средн.</b>			<b>Средн.</b>		
1.23E + 06	6.11E-04	4.99E-10	8.69E + 05	9.58E-04	1.10E-09

ВА-087-08-32 также проявлял суб-наномолярную связывающую активность при pH 6,0. Связывающая активность снижается с pH 6,0 до pH 7,4 в около 100 раз ( $K_D$  [pH 6,0] = 0,45 нМ;  $K_D$  [pH 7,4] = 45 нМ). Помимо более низкой связывающей активности при pH 7,4, сигнал ППР при pH достигает только около 10% уровня сигнала при pH 6,0, указывая на то, что только небольшая фракция присутствующего ВА-087-08-32 способна связываться с человеческим CTLA4 при pH 7,4; см. табл. 8.

Таблица 8

Связывающая активность ВА-087-08-32 с человеческим CTLA4 при различных pH

pH 6,0			pH 7,4		
Ka [M*s]	Kd [s <sup>-1</sup> ]	KD [M]	Ka [M *s ]	Kd [s <sup>-1</sup> ]	KD [M]
3.29E + 06	1.20E-03	3.65E-10	5.04E + 05	2.836E-02	5.25E-08
3.32E + 06	1,54E-03	4.63E-10	8.59E + 05	8.3E-03	1.49E-08
4.08E + 06	2.14E-03	5.24E-10	1.94E + 05	1.32E-02	6.83E-08
<b>Средн.</b>			<b>Средн.</b>		
3.56E + 06	1.63E-03	4. 51E-10	5.19E + 05	1,66E-02	4.52E-08

Коммерчески доступное антитело к CTLA4 ипилимумаб (Yervoу™) использовали в качестве контроля в тех же условиях, и было обнаружено, что связывающая активность очень похожа при pH 6,0 и pH 7,4 ( $K_d$  [pH 6,0] = 1,39 нМ;  $K_d$  [pH 7,4] = 1,37 нМ). Таким образом, связывающая активность ипилимумаба не зависела от pH; см. табл. 9. Результирующие сигналы ППР также очень похожи как при pH 6,0, так и при pH 7,4.

Таблица 9

Связывающая активность ипилимумаба с человеческим CTLA4 при различных pH

pH 6,0			pH 7,4		
Ka [M*s]	Kd [s <sup>-1</sup> ]	KD [M]	Ka [M *s ]	Kd [s <sup>-1</sup> ]	KD [M]
9.48E+05	1,39E-03	1.47E-09	1.12E + 06	1.16E-03	1.04E-09
8.19E + 05	9.47E-04	1.16E-09	1.13E + 06	1.52E-03	1.35E-09
7.72E + 05	1.19E-03	1,54E-09	1.17E + 06	2.02E-03	1.72E-09
<b>Средн.</b>			<b>Средн.</b>		
8.46E + 05	1.17E-03	1.39E-09	1.14E + 06	1.57E-03	1.37E-09

Связывающую активность антител ВА-087-05-19, ВА-087-08-32 и ипилимумаба с CTLA4 яванского макака тестировали в тех же условиях, что описаны выше для CTLA4 человека. Все три антитела имеют высокую скорость диссоциации, а сигнал ППР достигает равновесия при всех протестированных концентрациях антител.  $K_d$  рассчитывали путем нанесения точек на график максимума сигнала ППР при каждой концентрации по отношению к концентрации антитела. Эксперименты проводили в трех повторностях для каждого pH.

Антитело ВА-087-05-19 связывается с супоCTLA4 с  $K_d$  1,96 нМ при pH 6,0. При pH 7,4 расчет указывает на  $K_d > 100$  нМ. Антитело ВА-087-08-32 связывается с супоCTLA4 с  $K_d$  5,95 нМ при pH 6,0. При pH 7,4 результирующий сигнал ППР слишком низкий для расчета  $K_D$ . Антитело ипилимумаб связывается с супоCTLA4 с  $K_d$  6,58 нМ при pH 6,0 и  $K_d$  6,80 нМ при pH 7,4.

Пример 5. Анализ методом проточной цитометрии антител к CTLA4.

Активность связывания антител ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 с CTLA4 человека и яванского макака, экспрессированных на клеточной поверхности клеток CHO в буфере с pH 6,0 или в буфере с pH 7,4 измеряли при помощи (проточной цитометрии). Серийно разведенные ВА-087-05-19, ВА-087-08-32, ипилимумаб и аналог ипилимумаба добавляли к клеткам CHO, экспрессирующим CTLA4 человека или яванского макака. Количество антител, связанных с клетками, определяли количественно с использованием антител против человеческого IgG, конъюгированных с флуорофорами. Значения ЭК<sub>50</sub> при pH 6,0 и 7,4 в отношении связывания с клетками рассчитывали с использованием модели нелинейной аппроксимации (вариабельный угловой коэффициент, четыре параметра), встроенной в программное обеспечение GraphPad Prism (версия 7.03). Уровни экспрессии человеческого CTLA4 или CTLA4 яванского макака на поверхности клеток CHO определяли с использованием набора BD QuantiBRITE™ PE.

Для каждого антитела с использованием каждой клеточной линии проводили по меньшей мере, два независимых дублирующих эксперимента методом проточной цитометрии. Связывающая активность антител к человеческому CTLA4 на клетках CHO (CHO-huCTLA4) при pH 6,0 и 7,4 показана на фиг. 6А-6В. Связывающая активность антител к CTLA4 яванского макака с клетками CHO (CHO-супоCTLA4) при pH 6,0 и 7,4 показана на фиг. 7А-7В. Связывающие активности при различных концентрациях антител показаны на этих чертежах.

Было обнаружено, что связывающая активность ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 при pH 6,0, измерен-

ная при помощи проточной цитометрии, имеет средние ЭК<sub>50</sub> 350,1 и 243,4 нг/мл, соответственно, для человеческого CTLA4, и 316,2 нг/мл и 402,6 нг/мл, соответственно, для CTLA4 яванского макака. Было обнаружено, что связывающая активность ипилимумаба и аналога ипилимумаба при pH 6,0, измеренная при помощи проточной цитометрии, имеет средние ЭК<sub>50</sub> 341,1 и 325,4 нг/мл, соответственно, для человеческого CTLA4, и 337,5 нг/мл и 319,6 нг/мл, соответственно, для CTLA4 яванского макака. Связывающие активности ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 при pH 7,4 были слабее, чем связывающие активности при pH 6,0, даже при наивысшей испытанной концентрации.

Как ВА-087-05-19, так и ВА-087-08-32 связываются с человеческим CTLA4 и CTLA4 яванского макака с такой же аффинностью, как ипилимумаб и аналог ипилимумаба, при pH 6,0. Однако каждый из ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 имеет гораздо более слабую связывающую активность с CTLA4 человека и яванского макака при pH 7,4 по сравнению со связывающей активностью ипилимумаба и аналога ипилимумаба при pH 7,4. Не было обнаружено связывающей активности для клеток СНО, которые не экспрессировали CTLA4.

Наконец, при помощи проточной цитометрии также измеряли насыщение антителами клеток СНО, экспрессирующих CTLA4 человека или яванского макака, при pH 7,4 (фиг. 8А-8В). При pH 7,4 с клетками СНО связывалось меньше антител ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32, чем в случае контрольного аналога ипилимумаба.

Пример 6. Анализы на основе ИФА и анализы методом проточной цитометрии стабильности антител к CTLA4.

Связывающую активность антител ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 с человеческим CTLA4 при pH 6,0 в буфере и при pH 7,4 в буфере измеряли с использованием различных буферов. Как анализ на основе ИФА, так и анализ методом проточной цитометрии использовали для измерения связывающей активности. При анализе на основе ИФА серийно разведенные образцы ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 добавляли в лунки для человека, предварительно покрытые CTLA4 и соответствующим буфером. Количество связанных антител определяли количественно, используя конъюгированное с ПХ антитело к человеческому IgG. Поглощение при 450 нм при каждом измерении было пропорционально количеству связанных антител; см. данные по ИФА на фиг. 9А-9F. Значение ЭК<sub>50</sub> (в нг/мл) для связывания с человеческим CTLA4 определяли по поглощению при 450 нм в зависимости от концентрации антител с переменным угловым коэффициентом Prism четырехпараметрической кривой доза-ответ, которую рассчитывали с использованием модели нелинейной аппроксимации (переменный угловой коэффициент, четыре параметра), встроенной в программу GraphPad Prism (версия 7.03). Значения ЭК<sub>50</sub> для связывания с человеческим CTLA4, измеренные при помощи ИФА в различных буферах, приведены в табл. 10-11. Тестируемые буферы включали His-буфер (His), Трис-буфер (Tris), глутаминовый буфер (Glu) и без буфера.

Таблица 10

ЭК<sub>50</sub> ВА-087-05-19 в различных буферах, определенных при помощи ИФА

ЭК <sub>50</sub> (нг/мл)	ВА-087-05-19 (6972 His)		ВА-087-05-19 (6972 Tris)		ВА-087-05-19 (6972 Glu)		ВА-087-05-19 (6972)	
	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4
T0	15,41	54,36	5,913	42,37	10,89	110,2	6,258	54,55
T2W	7,042	75,81	10,14	36,54	2,663	21,95	6,258	54,55

Таблица 11

ЭК<sub>50</sub> ВА-087-08-32 в различных буферах, определенных при помощи ИФА

ЭК <sub>50</sub> (нг/мл)	ВА-087-08-32 (6978 His)		ВА-087-08-32 (6978 Tris)		ВА-087-08-32 (6978 Glu)		ВА-087-08-32 (6978)	
	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4
T0	37,99	490,8	17,06	1135	33,72	1189	22,23	1144
T2W	44,08	1075	13,99	1491	12,26	724	22,23	1144

В анализе методом проточной цитометрии серийно разведенные образцы ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 добавляли к клеткам, экспрессирующим CTLA4 человека. Количество связанных антител определяли с использованием конъюгированных с флуорофорами антител к человеческому IgG. СИФ в каждой реакции была пропорциональна количеству связанных антител. Связывающие активности, измеренные при помощи проточной цитометрии, показаны на фиг. 10А-10F. Значение ЭК<sub>50</sub> (в нг/мл) для связывания с человеческим CTLA4 на клетках определяли при помощи СИФ популяции синглетов против концентрации антител с переменным угловым коэффициентом Prism четырехпараметрической кривой доза-ответ, которую рассчитывали с использованием модели нелинейной аппроксимации (переменный угловой коэффициент, четыре параметра), встроенной в программу GraphPad Prism (версия 7.03). Значения ЭК<sub>50</sub> для связывания с человеческим CTLA4 на клетках СНО приведены в табл. 12, 13.

Таблица 12

ЭК<sub>50</sub> ВА-087-05-19 в различных буферах, определенных при помощи проточной цитометрии

ЭК <sub>50</sub> (нг/мл)	ВА-087-05-19 (6972 His)		ВА-087-05-19 (6972 Tris)		ВА-087-05-19 (6972 Glu)		ВА-087-05-19 (6972)	
	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4
T0	290,8	433,4	291,4	681,3	291	461,5	222,5	428,1
T2W	294,8	614,8	352,3	537,1	266,6	606,9	222,5	428,1

Таблица 13

ЭК<sub>50</sub> ВА-087-08-32 в различных буферах, определенных при помощи проточной цитометрии

ЭК <sub>50</sub> (нг/мл)	ВА-087-08-32 (6978 His)		ВА-087-08-32 (6978 Tris)		ВА-087-08-32 (6978 Glu)		ВА-087-08-32 (6978)	
	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4
TO	159	848,5	152,5	1259	149,6	813,5	158,4	867,5
T2W	144,8	1179	151,6	1540	176,4	1407	158,4	867,5

Пример 7. Анализ иммуногенности ВА-087-05-19 *in silico*.

В этом исследовании определяли потенциальную иммуногенность ВА-087-05-19 с использованием набора инструментов для скрининга иммуногенности *in silico* от EpiVax. Доступ к программному обеспечению осуществлялся через ISPR1, веб-интерфейс интерактивного скрининга и реинжиниринга белков. Используя варибельный домен ВА-087-05-19 в качестве входных данных, программное обеспечение использовали для оценки иммуногенного потенциала по нормализованной шкале и прогнозирования потенциального образования АКЛ.

Потенциальная иммуногенность ВА-087-05-19 была проанализирована и сравнена с известными антителами по нормализованной шкале. Данные демонстрируют, что ВА-087-05-19 имеет скорректированный по эпитопам регуляторных Т-клеток показатель EpiMatrix Protein Score, равный -27,70, и прогнозируемое Т-зависимое образование антител, равное 1,29%. Эта спрогнозированная низкая иммуногенность попадает в группу оптимальных антител (с низким эффекторным и высоким содержанием эпитопов регуляторных Т-клеток).

Пример 8. Функциональный анализ усиления секреции ИЛ-2 антителами против СТЛА4.

В этом примере была определена функциональная активность антител ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 в индукции секреции ИЛ-2 лимфоцитами человека, стимулированными стафилококковым энтеротоксином В (SEB). Серийно разведенные ВА-087-05-19, ВА-087-08-32, ипилимумаб и аналог ипилимумаба добавляли к мононуклеарным клеткам периферической крови человека (МКПК) от нормальных здоровых доноров, стимулированных SEB. Способность антител усиливать секрецию ИЛ-2 в стимулированных SEB МКПК человека определяли количественно с использованием набора ИФА для определения ИЛ-2.

Всего было проведено три независимых эксперимента. В культурах мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), стимулированных SEB, добавление ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 увеличивало продукцию ИЛ-2 по сравнению с уровнем, наблюдаемым при добавлении изотипического контроля на наблюдаемом уровне с ипилимумабом и аналогом ипилимумаба при pH 6,2, как показано на фиг. 11 А. С другой стороны, продукция ИЛ-2 не увеличивалась при добавлении ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 при pH 7,4, как показано на фиг. 11В.

При концентрации 10 мкг/мл ВА-087-05-19 способствовало в среднем 1,4-кратному увеличению, а ВА-087-08-32 стимулировало среднее 1,5-кратное увеличение продукции ИЛ-2 по сравнению с изотипическим контролем при pH 6,2. Аналогично увеличению, наблюдаемому с ипилимумабом и аналогом ипилимумаба. Эти результаты демонстрируют, что функциональные активности ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 эквивалентны активности, наблюдаемой с ипилимумабом и аналогом ипилимумаба при pH 6,2.

Пример 9. Анализ блокады СТЛА4 Promega® для антител к СТЛА4.

Активность антител ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 в блокировании взаимодействий между человеческим СТЛА4 и его лигандами (CD80 и CD87) определяли с использованием анализа блокады СТЛА4 Promega® *in vitro*. Серийно разведенные ВА-087-05-19, ВА-087-08-32, ипилимумаб и аналог ипилимумаба добавляли к эффекторным клеткам Jurkat с последующим добавлением клеток aAPC/Raji в соответствии с протоколом производителя. Блокада взаимодействий между СТЛА4 и его лигандами приводит к активации пути ИЛ-2, сконструированного в эффекторных клетках Jurkat, что количественно определяют при помощи набора для анализа люциферазы Bio-Gio®.

Результаты показали, что ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 способны блокировать взаимодействие между СТЛА4 и его лигандами (CD80/CD87) на аналогичном уровне, наблюдаемом с ипилимумабом и аналогом ипилимумаба при pH 6,0, как показано на фиг. 12А. Напротив, ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 были менее эффективны в блокировании взаимодействия СТЛА4 с его лигандами при pH 7,4, как показано на фиг. 12В. Эти результаты демонстрируют, что функциональные активности *in vitro* ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 эквивалентны активностям, наблюдаемым для ипилимумаба и аналога ипилимумаба при pH 6,0, значительно ниже, чем активности ипилимумаба и ипилимумаба в блокаде при pH 7,4.

Пример 10. Анализ методом проточной цитометрии для блокирования лиганда антителами к СТЛА4.

Активности ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 в отношении ингибирования взаимодействия человеческого СТЛА4 с его лигандами hB7-1 (hCD80) и hB7-2 (hCD86) анализировали при помощи проточной цитометрии для оценки конкурентного связывания при фиксированной концентрации ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 с клетками CHO, экспрессирующими человеческий СТЛА4, в присутствии различных концентраций hB7-1 и hB7-2. Количества ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32, связанных с клетками CHO-huCTLA4, определяли с использованием конъюгированного с флуорофорами антитела к человеческому IgG. Средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) в каждой реакции была пропорциональна количеству ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32, связанных с CHO-huCTLA4, как показано на фиг. 13А, 13В.

Кроме того, анализ методом проточной цитометрии использовали для определения конкурентного связывания серийно разведенных ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 с клетками СНО, экспрессирующими человеческий СТЛА4, в фиксированной концентрации hB7-1 и hB7-2. Количество hB7-1 и hB7-2, связанных с клетками СНО-huCTLA4, определяли количественно с использованием антитела к His и антитела к IgG мыши, конъюгированных с флуорофорами. СИФ в каждой реакционной смеси был пропорционален количеству hB7-1 и hB7-2, связанных с СНО-huCTLA4. Данные показали, что ВА-087-05-19 и ВА-087-0832 блокировали взаимодействие huCTLA4 с его лигандами, hB7-1 и hB7-2 на уровнях, аналогичных уровням, достигнутому ипилимумабом и аналогом ипилимумаба (фиг. 14А, 14В).

Данные демонстрируют, что ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 способны блокировать взаимодействие между человеческим СТЛА4 и его лигандами hB7-1 (hCD80) и hB7-2 (hCD86) так же эффективно, как ипилимумаб и аналог ипилимумаба. Конкурентный анализ методом проточной цитометрии проводили только при pH 6,0, поскольку ВА-087-05-19 и ВА-087-08-32 имеют очень ограниченное связывание при pH 7,4.

Способы, используемые в примерах.

Анализ на основе ИФА выполняли по следующему протоколу.

1. Покройте планшеты для ИФА 100 мкл 0,5 мкг/мл (эксперименты 06\_20\_17 и 06\_28\_17) или 1 мкг/мл (эксперименты 07\_06\_17 и 07\_11\_17) рекомбинантного антигена СТЛА4 в карбонатно-бикарбонатном покрывающем буфере.

2. Закройте планшеты герметизирующей пленкой и инкубируйте в течение ночи при 4°C.

3. Слейте жидкость с планшета и удалите остатки жидкости на стопку бумажных полотенец.

4. Дважды промойте лунки, распределив 200 мкл буфера для инкубации с различным pH в лунки в соответствии с картой образца, и полностью аспирируйте содержимое.

5. Добавьте 200 мкл буфера для инкубации с различным pH в лунки в соответствии с картой образца.

Накройте герметизирующей пленкой и поместите планшет на шейкер для планшетов (установленный на 200 об/мин) на 60 мин при комнатной температуре.

6. Слейте жидкость с планшета и удалите остатки жидкости на стопку бумажных салфеток.

7. Последовательно разведите тестируемые вещества в буферах для инкубации с различным pH до 250 нг/мл, 100 нг/мл или 25 нг/мл.

8. Добавьте в планшеты 100 мкл/лунка разведенных тестируемых веществ в соответствии с картой образца.

9. Накройте герметизирующей пленкой и поместите планшеты на шейкер для планшетов (установленный на 200 об/мин) на 60 мин при комнатной температуре.

10. Слейте жидкость с планшета и удалите остатки жидкости на стопку бумажных салфеток.

11. Промойте лунки трижды, распределив 200 мкл промывочных буферов с различным pH в лунки в соответствии с картой образца, и полностью аспирируйте содержимое.

12. Разведите конъюгированное с ПХ вторичное антитело в соотношении 1:2500 в буферах для инкубации с различным pH.

13. Добавьте 100 мкл конъюгированного с ПХ вторичного антитела, разведенного в инкубационных буферах с различным pH, в каждую лунку в соответствии с картой образца.

14. Накройте герметизирующей пленкой и поместите планшеты на шейкер для планшетов (установленный на 200 об/мин) на 60 мин при комнатной температуре.

15. Слейте жидкость с планшета и удалите остатки жидкости на стопку бумажных салфеток.

16. Промойте лунки трижды, распределив по 200 мкл промывочного буфера с различным pH в лунки в соответствии с картой образца и полностью аспирируйте содержимое.

17. Распределите по 50 мкл раствора субстрата ТМВ на лунку во все лунки планшетов. Инкубируйте при комнатной температуре 3 мин.

18. Добавьте 50 мкл 1N HCL на лунку во все лунки планшетов. Произведите считывание планшетов при 450 нм при помощи ридера для микропланшетов Molecular Device SpectraMax 190.

19. Получите исходные данные при ОП450 нм.

20. Средние значения ОП (из 2 повторов) при различных pH наносили на график в зависимости от pH буфера с использованием программного обеспечения Softmax Pro (Molecular Devices). Аппроксимацию кривой проводили с использованием 4-параметрической модели, встроенной в программное обеспечение. Точка перегиба кривой pH (50% связывающей активности) равна параметру С эмпирического уравнения. Связывающая активность при pH 6,0 была установлена на 100%. Значение pH для 90% связывающей активности было интерполировано из подобранной кривой с использованием функции "InterpX" программного обеспечения Softmax Pro.

Анализ методом поверхностного плазменного резонанса (ППР) выполняли по следующему протоколу:

Прибор SPR 2/4, ПНР-сенсоры для определения аффинности - Amine Flat, и набор Immobilization Buffer Kit производится Sierra Sensors. ППР-сенсор содержит четыре проточные кюветы (FC1-FC4), к каждой из которых можно обращаться по отдельности или группами. Внеклеточный домен СТЛА4 был

иммобилизован в FC2 и FC4, в то время как BSA был иммобилизован на FC1 и FC3 (контрольная поверхность).

Иммобилизацию проводили в соответствии с протоколом, предложенным поставщиком.

1. Активатор получали смешиванием 200 мМ EDC и 50 мМ NHS (Sierra Sensors) непосредственно перед инъекцией. Аминный сенсорный чип активировали в течение 480 с со смесью при скорости потока 25 мкл/мин.

2. 25 мкг/мл человеческого CTLA4 в 10 мМ NaAc (pH 5,0) вводили в FC2 и FC4 соответственно при скорости потока 25 мкл/мин в течение 480 с. Поверхность чипа дезактивировали 1 М этаноламино-НСI (Sierra Sensors), пропущенным через FC1-4 при скорости потока 25 мкл/мин в течение 480 с.

3. Контрольная поверхность была активирована и дезактивирована в тех же условиях, но без инъекции белка.

4. Рабочий буфер был изменен на PBST с требуемым pH перед инъекциями аналита. Прибор уравновешивали рабочим буфером в течение 1 ч перед первой инъекцией аналита.

5. Все инъекции аналитов производили со скоростью 25 мкл/мин при 25°C ВА-087-05-19 разбавляли в рабочем буфере (буфер PBST pH 6,0 или 7,4) до 5 мкг/мл (34,25 нМ), 2 мкг/мл (13,70 нМ), 1 мкг/мл (6,85 нМ), 0,5 мкг/мл (3,42 нМ), 0,2 мкг/мл (1,37 нМ) и 0 мкг/мл (0,0 нМ). ВА-087-08-32 разбавляли в рабочем буфере (буфер PBST pH 6,0 или 7,4) до 5 мкг/мл (34,25 нМ), 2 мкг/мл (13,70 нМ), 1 мкг/мл (6,85 нМ), 0,5 мкг/мл (3,42 нМ), 0,2 мкг/мл (1,37 нМ) и 0 мкг/мл (0,0 нМ).

100 мкл разбавленного аналита ВА-087-05-19 или ВА-087-08-32 инъецировали в проточные кюветы 1 и 2 (или 3 и 4) со скоростью 25 мкл/мин в течение 240-секундной фазы ассоциации с последующей диссоциацией в течение 360 с. Повторите 6 циклов обработки аналита в соответствии с концентрациями аналита в возрастающем порядке. Поверхность чипа регенерировали после каждого цикла анализа взаимодействия путем инъекции 6 мкл 10 мМ глицина (pH 2,0). Каждый набор был проведен в общей сложности 3 раза при одном и том же pH.

Проточную кювету 1 (или 3) без иммобилизованного белка использовали в качестве контрольной поверхности для вычитания эталона. Кроме того, данные с буфером только в качестве аналита (0 нМ аналита) вычитались из каждого цикла. Данные с двойным вычитанием были аппроксимированы при помощи прилагаемого программного обеспечения для анализа Analyzer R2 (Sierra Sensors) с использованием модели связывания 1:1. Молекулярную массу 146 кДа использовали для расчета молярных концентраций аналитов.

Анализ методом проточной сортировки (FACS) выполняли с использованием следующего протокола.

Окрашивание клеток для определения поверхностной экспрессии CTLA4 человека или яванского макака.

1. Посейте  $3 \times 10^6$  клеток в колбы T-75 и культивируйте в соответствии с инструкциями поставщиков.

2. В день анализа методом проточной цитометрии удалите питательную среду и утилизируйте ее.

3. Кратковременно промойте клеточный слой раствором PBS.

4. Добавьте 1,5 мл раствора Detachin в каждую из колб T-75. Подождите, пока слой клеток не диспергируется.

5. Добавьте 4,5 мл культуральной среды для соответствующих клеточных линий и ресуспендируйте клетки осторожным пипетированием.

6. Объедините клетки и перенесите суспензию клеток в коническую пробирку объемом 50 мл.

7. Подсчитайте клетки с окрашиванием трипановым синим перед центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин при 4°C.

8. Промойте клетки один раз PBS и перенесите  $3 \times 10^5$  клеток в пробирку Эппендорфа.

9. Добавьте 2 мкл мышинового анти-CTLA4 (PE-конъюгированный мышинный IgG1) или PE-конъюгированный изотипический мышинный IgG1 в 100 мкл раствора PBS с 1% BSA на пробирку и встряхивайте при 100 об/мин в течение одного часа на льду.

10. Промойте клетки трижды 150 мкл раствора PBS.

11. Зафиксируйте клетки с 4% PFA в течение 10 мин при комнатной температуре, затем один раз промойте клетки PBS.

12. Ресуспендируйте клетки в 100 мкл PBS и проанализируйте клетки на проточном цитометре NovoCyte.

Анализ клеток CHO, экспрессирующих CTLA4 человека или CTLA4 яванского макака, методом проточной цитометрии с использованием тестируемых антител.

1. Соберите клетки (как 3.3, этапы с 1 по 7), промойте клетки один раз с PBS.

2. Ресуспендируйте клетки в буфере для проточной цитометрии pH 6,0 или pH 7,4 до  $3 \times 10^6$  клеток/мл.

3. Аликвотируйте  $3 \times 10^5$  клеток в 100 мкл буфера для проточной цитометрии с pH 6,0 или pH 7,4 в 96-луночных планшетах с U-образным дном.

4. Осадите центрифигурованием клетки и слейте буфер.
5. Последовательно разведите исследуемые изделия в 3× разведениях, начиная с 10 мкг/мл (эксперименты 06-16-17, 06-26-17 и 06-28-17 для всего 8 точек данных или при 100 мкг/мл (эксперимент 071017 для всего 11 точек данных) в буфере для проточной цитометрии с pH 6,0 или pH 7,4.
6. Добавьте к клеткам 100 мкл/лунка разведенных исследуемых изделий, осторожно перемешайте и инкубируйте на льду при встряхивании (100 об/мин) в течение 1 ч.
7. Центрифуга клеток при 1500 об/мин в течение 5 мин при 4°C. Дважды промойте клетки 150 мкл промывочного буфера с pH 6,0 или pH 7,4.
8. Разведите козье антитело к человеческому IgG AF488 в соотношении 1:300 в буферах для проточной цитометрии с pH 6,0 или pH 7,4.
9. Добавьте к клеткам 100 мкл разведенного антитела, полученного на предыдущем этапе стадии, и инкубируйте на льду в течение 45 мин в защищенном от света месте.
10. Осадите центрифигурованием клетки и трижды промойте 150 мкл промывочного буфера с pH 6,0 или pH 7,4.
11. Зафиксируйте клетки 4% PFA, разведенным в IX PBS в течение 10 мин при комнатной температуре, затем промойте клетки IX PBS.
12. Ресуспенсируйте клетки в 100 мкл IX PBS.
13. Анализируйте клетки при помощи проточного цитометра NovoCyte, используя Ex488nm/Em530nm. Соберите не менее 20000 клеток.

Данные проточной цитометрии были проанализированы с использованием модели нелинейной аппроксимации (вариабельный угловой коэффициент, четыре параметра), встроенной в программу Graph-Pad Prism версии 7.03.

Анализ блокады CTLA4 PROMEGA®.

1. Перенесите флакон с эффекторными клетками CTLA4 Jurkat (CS186912) для размораживания и использования из хранилища жидкого азота на стол на сухом льду. Разморозьте флакон на водяной бане с температурой 37°C, пока клетки не разморозятся (около 2 мин). Во время оттаивания осторожно перемешайте и осмотрите визуально, не переворачивайте.
2. Осторожно перемешайте клеточную суспензию во флаконе путем пипетки вверх и вниз 2-3 раза и перенесите 0,8 мл в пробирку с надписью "Клетки CTLA4", содержащую 3,2 мл RPMI+10% FBS.
3. Осадите центрифигурованием клетки при 1500 об/мин в течение 10 мин и ресуспенсируйте в 1 мл RPMI+10% FBS. Хорошо перемешайте, разделите клеточную суспензию на две пробирки и центрифигуруйте клетки, промойте осадок один раз аналитической средой с pH 6,0 или pH 7,4, а затем ресуспенсируйте клеточный осадок в 2 мл аналитической среды с pH 6,0 или pH 7,4.
4. Немедленно внесите 25 мкл эффекторных клеток CTLA4 Jurkat во внутренние 60 лунок 96-луночного планшета согласно схеме.
5. Добавьте 100 мкл стерильной воды на лунку в неиспользуемые лунки, окружающие лунки для образцов.
6. Сделайте серийное разведение 3× исходного раствора исследуемого изделия в аналитической среде с pH 6,0 или pH 7,4 в двух экземплярах, начиная с 300 мкг/мл, чтобы получить точки данных 10-кратного разведения.
7. Внесите 25 мкл серийно разведенных 3× исходного раствора исследуемого изделия в лунки, содержащие 25 мкл эффекторных клеток CTLA4 Jurkat в соответствии с планом.
8. Перенесите флакон с клетками CTLA4 aAPC/Raji (CS 186911) для размораживания и использования из хранилища с жидким азотом на стол на сухом льду. Разморозьте флакон на водяной бане с температурой 37°C, пока клетки не разморозятся (около 2 мин). Во время оттаивания осторожно перемешайте и осмотрите визуально, не переворачивайте.
9. Осторожно перемешайте клеточную суспензию во флаконе путем пипетки вверх и вниз 2-3 раза и перенесите 0,8 мл в пробирку с надписью "Клетки aAPC/Raji", содержащую 7,2 мл RPMI+10% FBS.
10. Осадите центрифигурованием клетки при 1500 об/мин в течение 10 мин и ресуспенсируйте в 1 мл RPMI+10% FBS. Хорошо перемешайте, разделите клеточную суспензию на две пробирки и центрифигуруйте клетки, один раз промойте осадок аналитической средой с pH 6,0 или pH 7,4, а затем ресуспенсируйте клеточный осадок в 4 мл аналитической среды с pH 6,0 или pH 7,4.
11. Немедленно внесите 25 мкл клеток CTLA4 aAPC/Raji во внутренние 60 лунок аналитических планшетов, уже содержащих 50 мкл клеток и раствор антител. Общий объем анализа составляет 75 мкл.
12. Закройте планшеты крышкой и инкубируйте чашки в течение 16 ч при 37°C в инкубаторе с увлажнением с 5% CO<sub>2</sub>.
13. В течение 16-часового периода индукции нагрейте буфер Bio-Gio™ до температуры окружающей среды, используя водяную баню комнатной температуры, перед добавлением к субстрату Bio-Gio™.
14. Восстановите систему для анализа люциферазы Bio-Gio™, перенеся один флакон с буфером Bio-Gio™ во флакон с субстратом Bio-Gio.
15. После 16-часовой индукции извлеките планшеты для анализа из CO<sub>2</sub>-инкубатора и уравновесьте при температуре окружающей среды в течение 15 мин.



16. Добавьте 75 мкл реагента Bio-Gio™ во внутренние 60 лунок аналитических планшетов.

17. Инкубируйте планшеты в течение 5-10 мин при температуре окружающей среды.

18. Зафиксируйте люминесценцию на планшет-ридере SpectraMax i3X.

Однако следует понимать, что даже несмотря на то, что многочисленные характеристики и преимущества настоящего изобретения были изложены в предшествующем описании вместе с деталями структуры и функции изобретения, раскрытие является только иллюстративным, и изменения могут быть выполнены в деталях, особенно в вопросах формы, размера и расположения частей в соответствии с принципами изобретения, в полной мере, указанной широким общим значением терминов, в которых выражена прилагаемая формула изобретения.

Все документы, упомянутые в данном документе, включены в данное описание в качестве ссылки во всей своей полноте или, альтернативно, для обеспечения раскрытия, на которое они специально ссылались. Заявитель(и) не передавал какие-либо раскрытые варианты осуществления общественности, и в той степени, в которой любые раскрытые модификации или изменения могут буквально не подпадать под объем формулы изобретения, они считаются частью настоящего документа в соответствии с доктриной эквивалентов.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Анти-CTLA4 антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, включающее:

(a) CDR варибельной области легкой цепи, содержащие аминокислоты с 24 по 35, с 51 по 59 и с 90 по 98 SEQ ID NO: 7, и CDR варибельной области тяжелой цепи, содержащие аминокислоты с 26 по 35, с 50 по 66 и с 99 по 107 SEQ ID NO: 8;

(b) CDR варибельной области легкой цепи, содержащие аминокислоты с 24 по 35, с 51 по 59 и с 90 по 98 SEQ ID NO: 9, и CDR варибельной области тяжелой цепи, содержащие аминокислоты с 26 по 35, с 50 по 66 и с 99 по 107 SEQ ID NO: 10;

(c) CDR варибельной области легкой цепи, содержащие аминокислоты с 24 по 35, с 51 по 59 и с 90 по 98 SEQ ID NO: 11, и CDR варибельной области тяжелой цепи, содержащие аминокислоты с 26 по 35, с 50 по 66 и с 99 по 107 SEQ ID NO: 12;

(d) CDR варибельной области легкой цепи, содержащие аминокислоты с 24 по 35, с 51 по 59 и с 90 по 98 SEQ ID NO: 13, и CDR варибельной области тяжелой цепи, содержащие аминокислоты с 26 по 35, с 50 по 66 и с 99 по 107 SEQ ID NO: 14;

(e) CDR варибельной области легкой цепи, содержащие аминокислоты с 24 по 35, с 51 по 59 и с 90 по 98 SEQ ID NO: 15, и CDR варибельной области тяжелой цепи, содержащие аминокислоты с 26 по 35, с 50 по 66 и с 99 по 107 SEQ ID NO: 16;

(f) CDR варибельной области легкой цепи, содержащие аминокислоты с 24 по 35, с 51 по 59 и с 90 по 98 SEQ ID NO: 17, и CDR варибельной области тяжелой цепи, содержащие аминокислоты с 26 по 35, с 50 по 66 и с 99 по 107 SEQ ID NO: 18;

(g) CDR варибельной области легкой цепи, содержащие аминокислоты с 24 по 35, с 51 по 59 и с 90 по 98 SEQ ID NO: 19, и CDR варибельной области тяжелой цепи, содержащие аминокислоты с 26 по 35, с 50 по 66 и с 99 по 107 SEQ ID NO: 20;

(h) CDR варибельной области легкой цепи, содержащие аминокислоты с 24 по 35, с 51 по 59 и с 90 по 98 SEQ ID NO: 21, и CDR варибельной области тяжелой цепи, содержащие аминокислоты с 26 по 35, с 50 по 66 и с 99 по 107 SEQ ID NO: 22;

(i) CDR варибельной области легкой цепи, содержащие аминокислоты с 24 по 35, с 51 по 59 и с 90 по 98 SEQ ID NO: 23, и CDR варибельной области тяжелой цепи, содержащие аминокислоты с 26 по 35, с 50 по 66 и с 99 по 107 SEQ ID NO: 24;

(j) CDR варибельной области легкой цепи, содержащие аминокислоты с 24 по 35, с 51 по 59 и с 90 по 98 SEQ ID NO: 25, и CDR варибельной области тяжелой цепи, содержащие аминокислоты с 26 по 35, с 50 по 66 и с 99 по 107 SEQ ID NO: 26;

(k) CDR варибельной области легкой цепи, содержащие аминокислоты с 24 по 35, с 51 по 59 и с 90 по 98 SEQ ID NO: 27, и CDR варибельной области тяжелой цепи, содержащие аминокислоты с 26 по 35, с 50 по 66 и с 99 по 107 SEQ ID NO: 28;

(l) CDR варибельной области легкой цепи, содержащие аминокислоты с 24 по 35, с 51 по 59 и с 90 по 98 SEQ ID NO: 29, и CDR варибельной области тяжелой цепи, содержащие аминокислоты с 26 по 35, с 50 по 66 и с 99 по 107 SEQ ID NO: 30;

(m) CDR варибельной области легкой цепи, содержащие аминокислоты с 24 по 35, с 51 по 59 и с 90 по 98 SEQ ID NO: 31, и CDR варибельной области тяжелой цепи, содержащие аминокислоты с 26 по 35, с 50 по 66 и с 99 по 107 SEQ ID NO: 32;

(n) CDR варибельной области легкой цепи, содержащие аминокислоты с 24 по 35, с 51 по 59 и с 90 по 98 SEQ ID NO: 33, и CDR варибельной области тяжелой цепи, содержащие аминокислоты с 26 по 35, с 50 по 66 и с 99 по 107 SEQ ID NO: 34;

(o) CDR варибельной области легкой цепи, содержащие аминокислоты с 24 по 35, с 51 по 59 и с 90 по 98 SEQ ID NO: 35, и CDR варибельной области тяжелой цепи, содержащие аминокислоты с 26 по 35, с 50 по 66 и с 99 по 107 SEQ ID NO: 36; или



ра в опухолевом микроокружении к аффинности связывания с белком CTLA4 для других значений того же параметра в неопуховом микроокружении, составляющее по меньшей мере около 1,5:1, по меньшей мере около 2:1, по меньшей мере около 3:1, по меньшей мере около 4:1, по меньшей мере около 5:1, по меньшей мере около 6:1, по меньшей мере около 7:1, по меньшей мере около 8:1, по меньшей мере около 9:1, по меньшей мере около 10:1 или по меньшей мере около 20:1.

22. Анти-CTLA4 антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по любому из пп.1-21, отличающееся тем, что указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой химерное антитело, полиспецифическое антитело или гуманизованное антитело.

23. Иммуноконъюгат, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по любому из пп.1-22.

24. Иммуноконъюгат по п.23, отличающийся тем, что указанный иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один агент, выбранный из химиотерапевтического агента, радиоактивной молекулы, цитостатического агента и цитотоксического агента.

25. Иммуноконъюгат по п.24, содержащий по меньшей мере два указанных агента.

26. Иммуноконъюгат по п.24, отличающийся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела и по меньшей мере один агент ковалентно связаны с линкерной молекулой.

27. Иммуноконъюгат по п.24 и 26, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один агент выбран из майтанзиноидов, ауристатинов, доластатинов, калихеамицина, пирролобензодиазепинов и антрациклинов.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по любому из пп.1-22 или иммуноконъюгат по любому из пп.23-27 и

фармацевтически приемлемый носитель.

29. Фармацевтическая композиция по п.28, дополнительно содержащая агент, регулирующий тоничность.

30. Фармацевтическая композиция по любому из пп.28, 29, отличающаяся тем, что представлена в форме единичной дозы, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по любому из пп.1-22 или иммуноконъюгат по любому из пп.23-27 в количестве, составляющем около 135, 235, 335, 435, 535, 635, 735, 835, 935, 1035, 1135, 1235 или 1387 мг.

31. Фармацевтическая композиция по любому из пп.28, 29, отличающаяся тем, что представлена в форме единичной дозы, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по любому из пп.1-22 или иммуноконъюгат по любому из пп.23-27 в количестве, находящемся в диапазоне 135-235, 235-335, 335-435, 435-535, 535-635, 635-735, 735-835, 835-935, 935-1035, 1035-1135, 1135-1235 или 1235-1387 мг.

32. Фармацевтическая композиция по любому из пп.28-31, дополнительно содержащая молекулу ингибитора иммунной контрольной точки, которая отличается от антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела по любому из пп.1-22.

33. Фармацевтическая композиция по п.32, отличающаяся тем, что указанная молекула ингибитора иммунной контрольной точки представляет собой антитело или фрагмент антитела против иммунной контрольной точки.

34. Фармацевтическая композиция по п.33, отличающаяся тем, что указанная иммунная контрольная точка выбрана из LAG3, TIM3, TIGIT, VISTA, BTLA, OX40, CD40, 4-1BB, PD-1, PD-L1, GITR, B7-H3, B7-H4, KIR, A2aR, CD27, CD70, DR3 и ICOS.

35. Фармацевтическая композиция по п.34, отличающаяся тем, что указанная иммунная контрольная точка представляет собой PD-1 или PD-L1.

36. Фармацевтическая композиция по любому из пп.28-35, дополнительно содержащая антитело или фрагмент антитела против антигена, выбранного из PD1, PD-L1, AXL, ROR2, CD3, HER2, B7-H3, ROR1, SFRP4 и белка WNT.

37. Фармацевтическая композиция по п.36, отличающаяся тем, что указанный белок WNT выбран из WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11 и WNT16.

38. Способ лечения рака, включающий этап введения антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела по любому из пп.1-22, или иммуноконъюгата по любому из пп.23-27 или фармацевтической композиции по любому из пп.28-37 пациенту, страдающему раком.

39. Набор для диагностики или лечения, причем указанный набор содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по любому из пп.1-22, иммуноконъюгат по любому из пп.23-27 или фармацевтическую композицию по любому из пп.28-37, а также инструкции по применению указанного антитела или фрагмента антитела, иммуноконъюгата и/или фармацевтической композиции для диагностики или лечения.

40. Антитело к CTLA4, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем указанная переменная область тяжелой цепи содержит три определяющие комплементарность области, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 39-41, и указанная переменная область легкой цепи содержит три определяющие комплементарность области, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 42-44.

41. Антитело по п.40, отличающееся тем, что переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 и переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

42. Антитело по любому из пп.40, 41, отличающееся тем, что указанное антитело имеет более высокую аффинность связывания с белком CTLA4 для значений параметра в опухолевом микроокружении, чем для других значений того же параметра в неопуховом микроокружении.

43. Антитело по п.42, отличающееся тем, что указанный параметр представляет собой pH.

44. Антитело по п.43, отличающееся тем, что pH в опухолевом микроокружении находится в диапазоне значений от 5,0 до 6,8, а pH в неопуховом микроокружении находится в диапазоне значений от 7,0 до 7,6.

45. Антитело по любому из пп.40-44, отличающееся тем, что имеет отношение аффинности связывания с белком CTLA4 для значений параметра в опухолевом микроокружении к аффинности связывания с белком CTLA4 для других значений того же параметра в неопуховом микроокружении, составляющее по меньшей мере около 1,5:1, по меньшей мере около 2:1, по меньшей мере около 3:1, по меньшей мере около 4:1, по меньшей мере около 5:1, по меньшей мере около 6:1, по меньшей мере около 7:1, по меньшей мере около 8:1, по меньшей мере около 9:1, по меньшей мере около 10:1 или по меньшей мере около 20:1.

46. Антитело по любому из пп.40-45, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой химерное антитело или гуманизованное антитело.

47. Иммуноконъюгат, содержащий антитело по любому из пп.40-46.

48. Иммуноконъюгат по п.47, отличающийся тем, что указанный иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один агент, выбранный из химиотерапевтического агента, радиоактивной молекулы, цитостатического агента и цитотоксического агента.

49. Иммуноконъюгат по п.48, содержащий по меньшей мере два указанных агента.

50. Иммуноконъюгат по п.48, отличающийся тем, что антитело и указанный по меньшей мере один агент ковалентно связаны с линкерной молекулой.

51. Иммуноконъюгат по любому из пп.48 и 50, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один агент выбран из майтанзиноидов, ауристатинов, доластатинов, калихеамицина, пирролобензодиазепинов и антрациклинов.

52. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.40-46 или иммуноконъюгат по любому из пп.47-51 и фармацевтически приемлемый носитель.

53. Фармацевтическая композиция по п.52, дополнительно содержащая агент, регулирующий токсичность.

54. Способ лечения рака, включающий этап введения антитела по любому из пп.40-46, иммуноконъюгата по любому из пп.47-51 или фармацевтической композиции по любому из пп.52, 53 пациенту, имеющему рак.

55. Набор для диагностики или лечения, причем указанный набор содержит антитело по любому из пп.40-46, иммуноконъюгат по любому из пп.47-51 или фармацевтическую композицию по любому из пп.52, 53 и инструкции по применению указанного антитела, иммуноконъюгата и/или фармацевтической композиции для диагностики или лечения.

	CDR H1				CDR H2	
	10	20	30	40	50	60
BA-087-05-19-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSHYTMDWVRQAPGKLEWVS	FISYDGNKYYADSVKG			
BA-087-08-32-VH	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFTFSHYTMDWVRQAPGKLEWLG	FISYDGNKYYADSVKG				
BA-087-01-07-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSHYTMDWVRQATGQGLEWVMG	FISYHGNNKYYADSVKG			
BA-087-01-09-VH	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFTFSHYTMDWVRQARGQRLEWVMG	FIDYHGNNKYYADSVKG				
BA-087-03-03-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFSHYTMDWVRQPPGKLEWIG	FISYDGNKYYADSVKG				
BA-087-03-04-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFSHYTMDWVRQPPGKLEWIG	FISYDGNKYYADSVKG				
BA-087-01-09-VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKVSGFTFSHYTMDWVRQAPGKLEWVS	FISYHGNNKYYADSVKG				
BA-087-04-07-VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKVSGFTFSHYTMDWVRQAPGKLEWVS	FISYHGNNKYYADSVKG				
BA-087-05-02-VH	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFTFSHYTMDWVRQAPGKLEWLG	FISYDGNKYYADSVKG				
BA-087-06-11-VH	QVQLQESGPGLVKPKSQTLSLTCTVSGFTFSHYTMDWVRQAPGQGLEWVMG	FISYDGNKYYADSVKG				
BA-087-08-09-VH	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFTFSHYTMDWVRQAPGKLEWLG	FISYDGNKYYADSVKG				
BA-087-09-01-03-VH	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFTFSHYTMDWVRQAPGKLEWLG	FISYDGNKYYADSVKG				
BA-087-09-01-02-VH	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFTFSHYTMDWVRQAPGKLEWLG	FISYHGNNKYYADSVKG				
BA-087-09-01-06-VH	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFTFSHYTMDWVRQAPGKLEWLG	FISYIIGNYKYADSMKG				
BA-087-09-02-02-VH	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFTFSHYTMDWVRQAPGKLEWLG	FISYIIGNYKYADSVKG				
BA-087-09-02-06-VH	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFTFSHYTMDWVRQAPGKLEWLG	FISYIIGNYKYADSMKG				

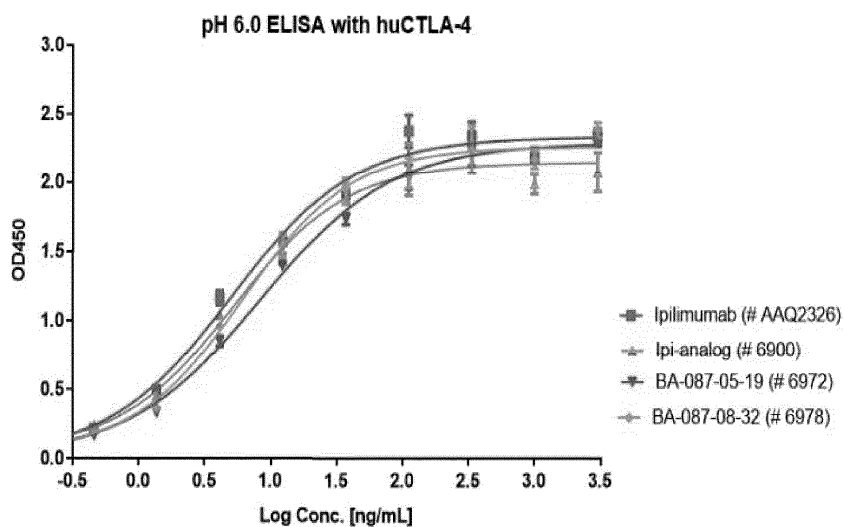
CDR H3																												
70	80	90	100	110																								
RF	TI	SR	DN	SK	NT	LY	LQ	MN	SL	RA	ED	TAV	YY	CART	IG	WL	GP	FD	Y	WG	Q	GT	L	V	T	V	S	SEQ ID NO:8
RF	TI	SR	DN	AK	NS	LY	LQ	MN	SL	RA	ED	TAV	YY	CART	IG	WL	GP	FD	Y	WG	Q	GT	L	V	T	V	S	SEQ ID NO:10
RF	TI	SR	DN	SK	NT	LY	LQ	MN	SL	RA	ED	TAV	YY	CART	IG	WL	GP	FD	Y	WG	Q	GT	L	V	T	V	S	SEQ ID NO:12
RF	TI	SR	DN	AK	NS	LY	LQ	MN	SL	RA	ED	TAV	YY	CART	IG	WL	GP	FD	Y	WG	Q	GT	L	V	T	V	S	SEQ ID NO:14
RF	TI	SR	DN	SK	NT	LY	LQ	MN	SL	RA	ED	TAV	YY	CART	IG	WL	GP	FD	I	WG	Q	GT	L	V	T	V	S	SEQ ID NO:16
RF	TI	SR	DN	SK	NT	LY	LQ	MN	SL	RA	ED	TAV	YY	CART	IG	WL	GP	FD	I	WG	Q	GT	L	V	T	V	S	SEQ ID NO:18
RF	TI	SR	DN	AK	NS	LY	LQ	MN	SL	RA	ED	TAV	YY	CART	IG	WL	GP	FD	Y	WG	Q	GT	L	V	T	V	S	SEQ ID NO:20
RF	TI	SR	DN	SK	NT	LY	LQ	MN	SL	RA	ED	TAV	YY	CART	IG	WL	GP	FD	Y	WG	Q	GT	L	V	T	V	S	SEQ ID NO:22
RF	TI	SR	DN	AK	NS	LY	LQ	MN	SL	RA	ED	TAV	YY	CART	IG	WL	GP	FD	Y	WG	Q	GT	L	V	T	V	S	SEQ ID NO:24
RF	TI	SR	DN	SK	NT	LY	LQ	MN	SL	RA	ED	TAV	YY	CART	IG	WL	GP	FD	Y	WG	Q	GT	L	V	T	V	S	SEQ ID NO:26
RF	TI	SR	DN	SK	NT	LY	LQ	MN	SL	RA	ED	TAV	YY	CART	IG	WL	GP	FD	Y	WG	Q	GT	L	V	T	V	S	SEQ ID NO:28
RF	TI	SR	DN	AK	NS	LY	LQ	MN	SL	RA	ED	TAV	YY	CART	IG	WL	GP	FD	Y	WG	Q	GT	L	V	T	V	S	SEQ ID NO:30
RF	TI	SR	DN	AK	NS	LY	LQ	MN	SL	RA	ED	TAV	YY	CART	IG	WL	GP	FD	Y	WG	Q	GT	L	V	T	V	S	SEQ ID NO:32
RF	TI	SR	DN	AK	NS	LY	LQ	MN	SL	RA	ED	TAV	YY	CART	IG	WL	GP	FD	Y	WG	Q	GT	L	V	T	V	S	SEQ ID NO:34
RF	TI	SR	DN	AK	NS	LY	LQ	MN	SL	RA	ED	TAV	YY	CART	IG	WL	GP	FD	Y	WG	Q	GT	L	V	T	V	S	SEQ ID NO:36
RF	TI	SR	DN	AK	NS	LY	LQ	MN	SL	RA	ED	TAV	YY	CART	IG	WL	GP	FD	Y	WG	Q	GT	L	V	T	V	S	SEQ ID NO:38

Фиг. 1

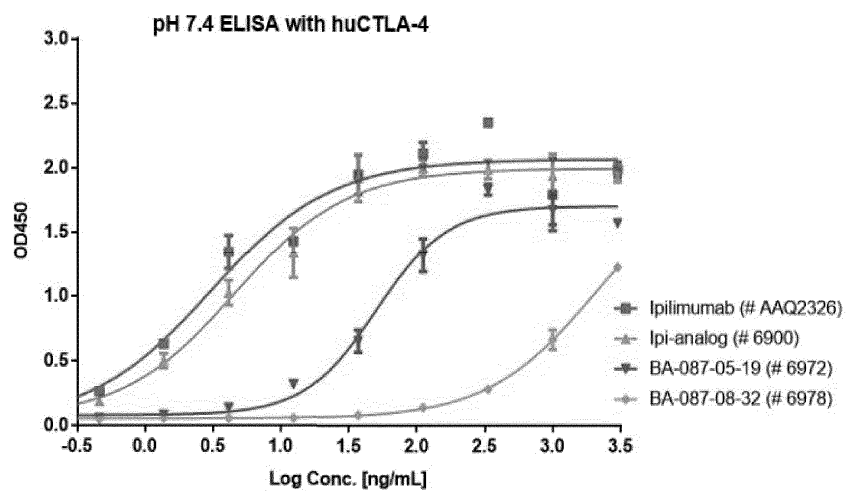
	CDR L1	CDR L2
	10      20      30      40      50	
BA-087-05-19-VK	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQYVGSSYLAWYLQKPGQSPQLLIY	GAFSRATGI
BA-087-08-32-VK	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQKPGKAPKLLIY	GAFSRATGV
BA-087-01-07-VK	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRISQYVGSSYLAWYQKPGKAPKLLIY	GAFSRATGI
BA-087-01-09-VK	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRISQYVGSSYLAWYQKPGKAPKLLIY	GAFSRATGI
BA-087-03-03-VK	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQYGGSSYLAWYQKPGKAPKLLIY	GAFSRATGV
BA-087-03-04-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQYGGSSYLAWYQKPGQAPRLLIY	GAFSRATGV
BA-087-04-04-VK	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQYVGSSYLAWYQKPGQAPRLLIY	GAFSRATGI
BA-087-04-07-VK	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRISQYVGSSYLAWYQKPGKAPKLLIY	GAFSRATGI
BA-087-05-02-VK	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQYVGSSYLAWYLQKPGQSPQLLIY	GAFSRATGV
BA-087-06-11-VK	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVGSSYLAWYQKPGQAPRLLIY	GAFSRATGI
BA-087-08-09-VK	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVGSSYLAWYQKPGKAPKLLIY	GAFSRATGV
BA-087-09-01-03-VK	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQKPGKAPKLLIY	GAFSRATGV
BA-087-09-01-02-VK	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQKPGKAPKLLIY	GAFSRATGV
BA-087-09-01-06-VK	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQKPGKAPKLLIY	GAFSRATGV
BA-087-09-02-02-VK	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQHVSSYLAWYQKPGKAPKLLIY	GAFSRATGV
BA-087-09-02-06-VK	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQHVSSYLAWYQKPGKAPKLLIY	GAFSRATGV

CDR L3		
	60      70      80      90      100	
PARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC	QDGGSSPWTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:7
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QDGGSSPWTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:9
PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFVYYC	QDGGSSPWTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:11
PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFVYYC	QDGGSSPWTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:13
PSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC	QDGGSSPWTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:15
PSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC	QDGGSSPWTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:17
PARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC	QDGGSSPWTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:19
PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFVYYC	QDGGSSPWTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:21
PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYC	QDGGSSPWTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:23
PARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC	QDGGSSPWTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:25
PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYC	QDGGSSPWTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:27
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QDGGSSPWTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:29
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QDGGSSPWTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:31
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QDGGSSPWTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:33
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QDGGSSPWTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:35
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QDGGSSPWTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:37

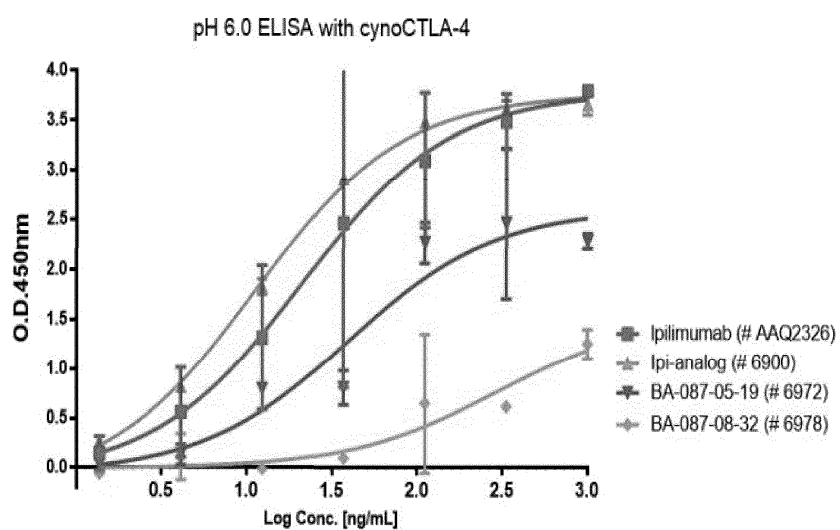
Фиг. 2



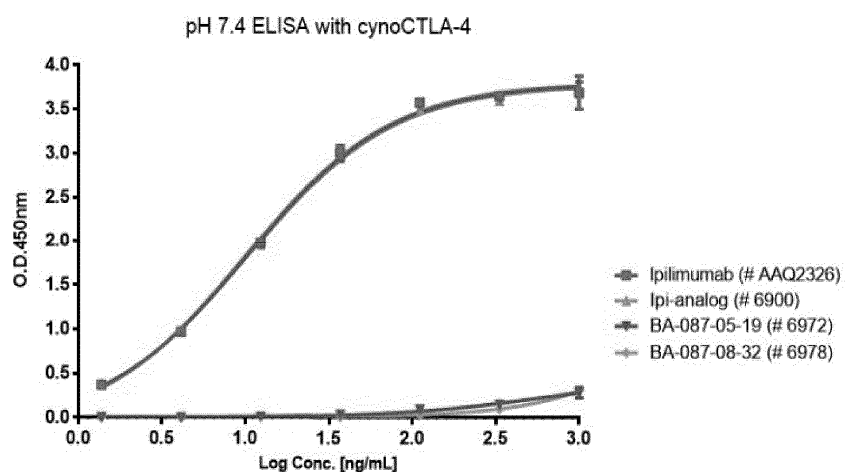
Фиг. 3A



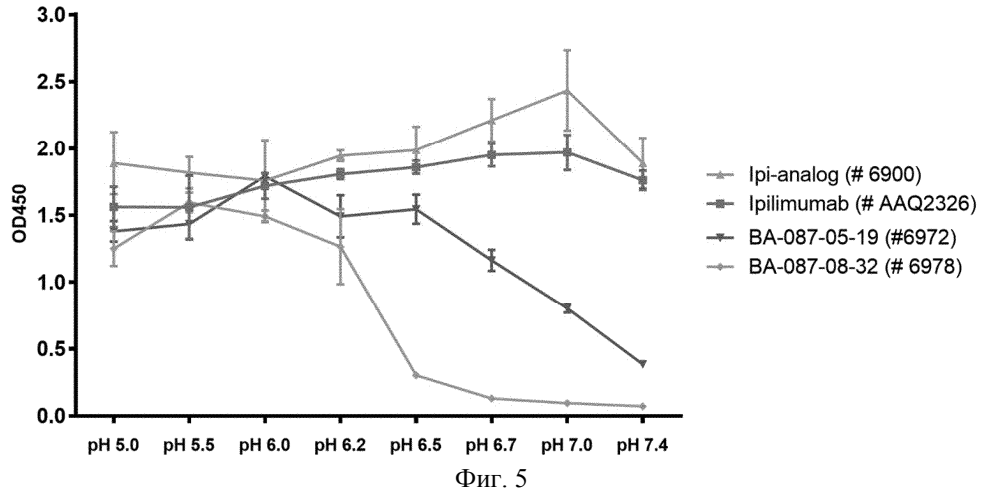
Фиг. 3B



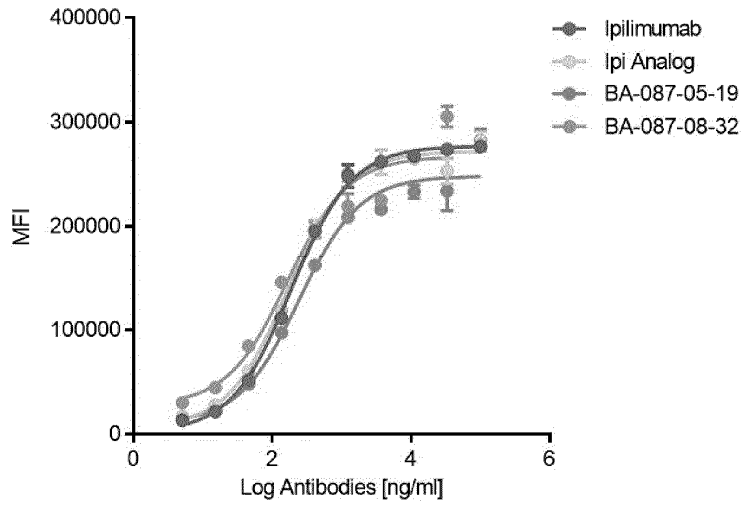
Фиг. 4A



Фиг. 4B



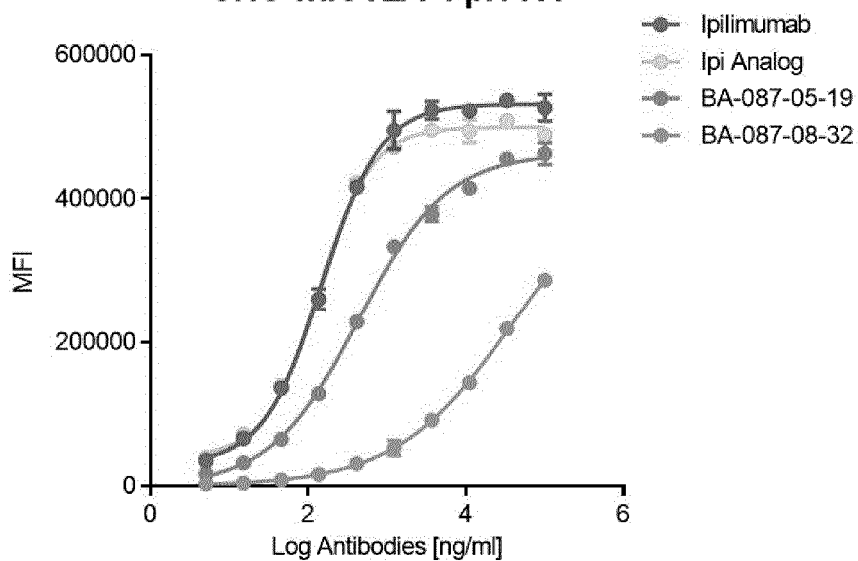
**CHO-huCTLA-4 pH 6.0**



	Ipilimumab	Ipi Analog	BA-087-05-19	BA-087-08-32
EC50	190.3	170	247.4	168.2

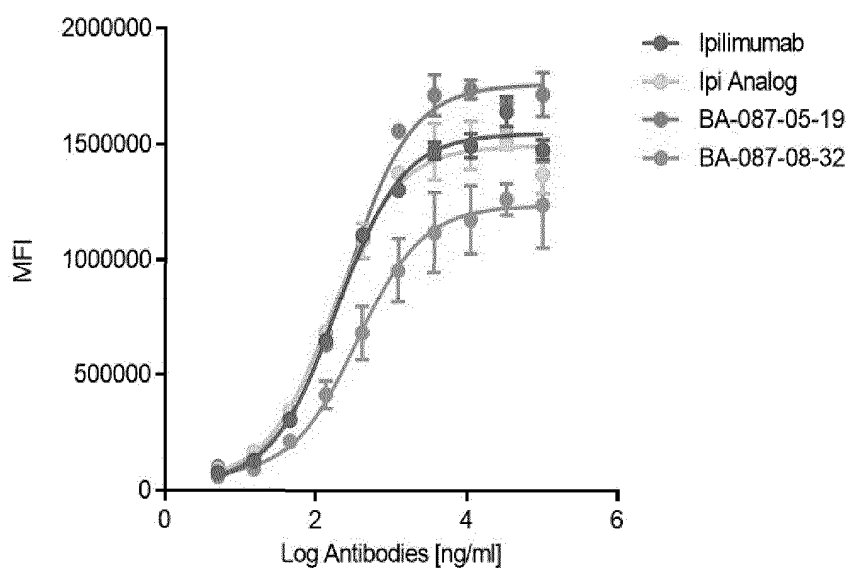
Фиг. 6А



**CHO-huCTLA-4 pH 7.4**

	Ipilimumab	Ipi Analog	BA-087-05-19	BA-087-08-32
EC50	150.9	133.7	437.6	41139

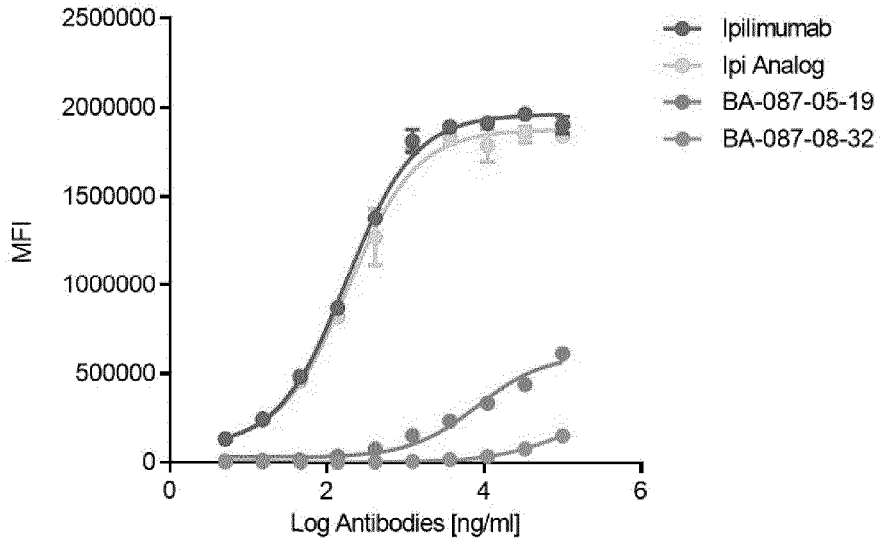
Фиг. 6B

**CHO- cynoCTLA-4 pH 6.0**

	Ipilimumab	Ipi Analog	BA-087-05-19	BA-087-08-32
EC50	189.8	161.4	242.3	353.9

Фиг. 7A

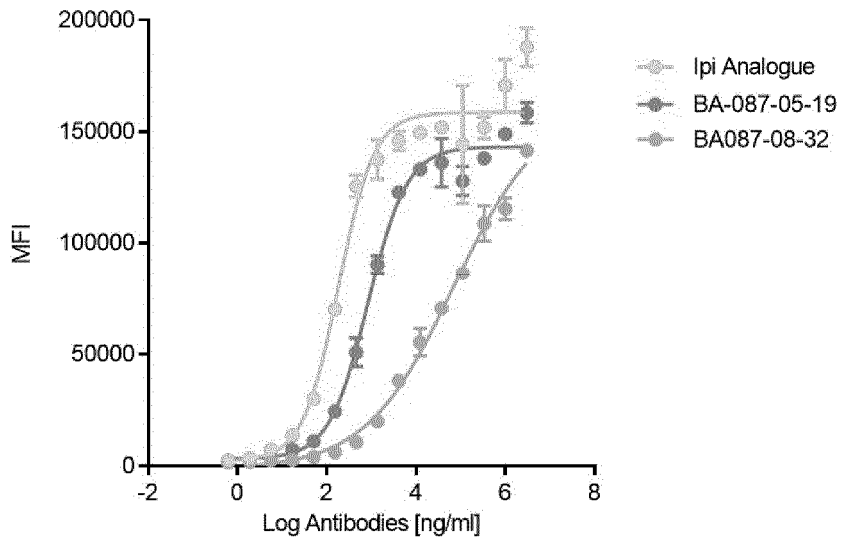
**CHO-cynoCTLA-4 pH 7.4**



	Ipilimumab	Ipi Analog	BA-087-05-19	BA-087-08-32
EC50	177.1	184.9	8275	83913

Фиг. 7B

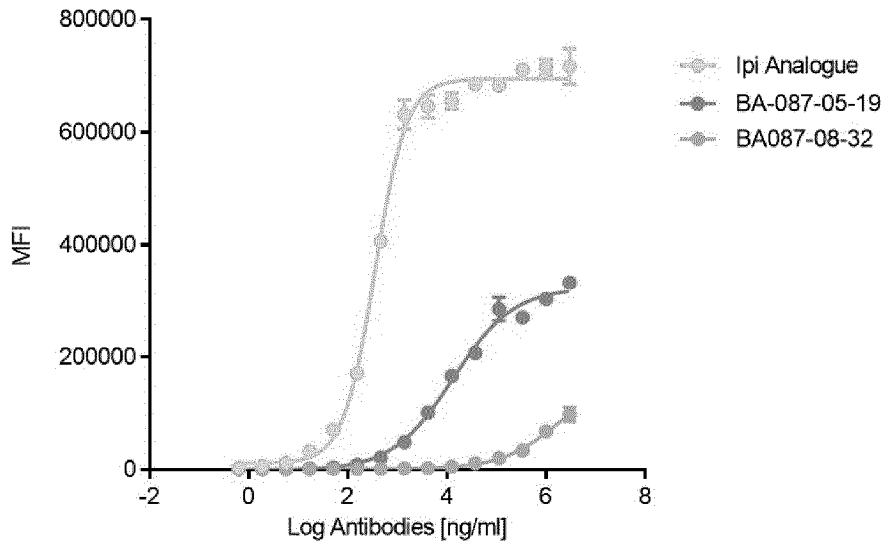
**CHO-huCTLA-4 Saturation at pH7.4**



	Ipi Analogue	BA-087-05-19	BA087-08-32
EC50	184.2	845.7	69573

Фиг. 8A

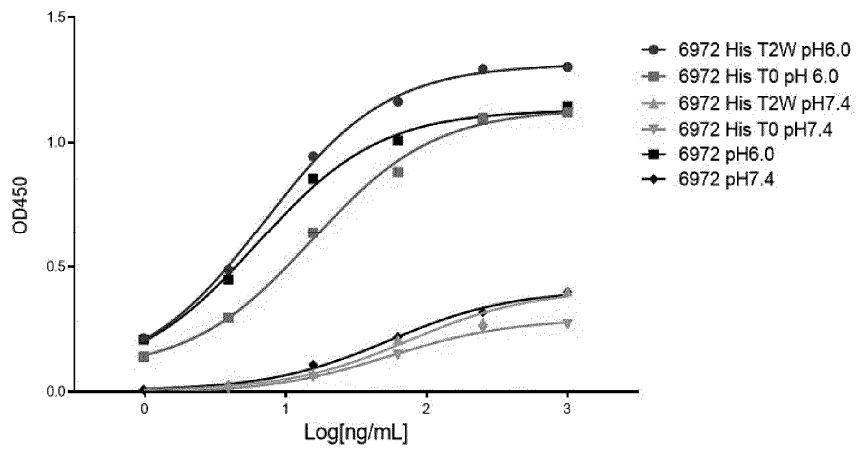
**CHO-cynoCTLA-4 Saturation at pH7.4**



	Ipi Analogue	BA-087-05-19	BA087-08-32
EC50	350.1	13003	1647448

Фиг. 8B

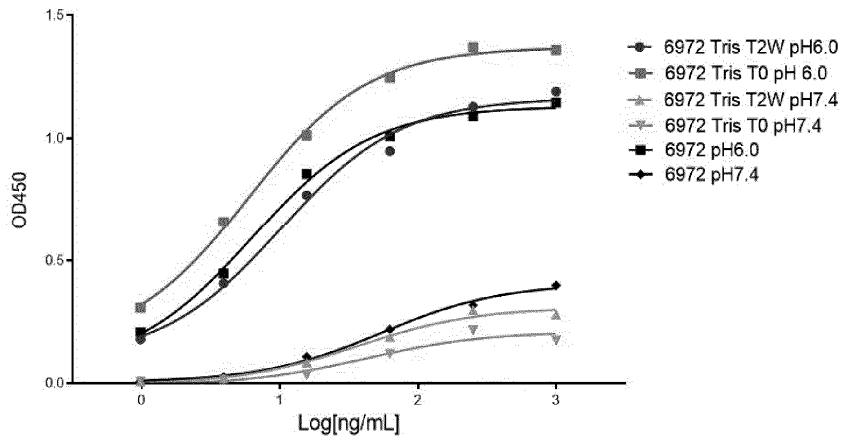
**BA-087-05-19 (6972 His)**



	6972 His T2W pH6.0	6972 His T0 pH 6.0	6972 His T2W pH7.4	6972 His T0 pH7.4	6972 pH6.0	6972 pH7.4
EC50	7.042	15.41	75.81	54.36	6.258	54.55

Фиг. 9A

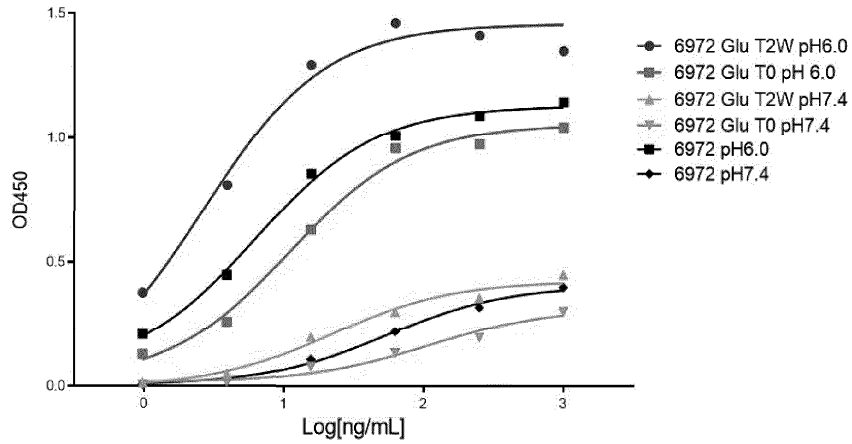
**BA-087-05-19 (6972 Tris)**



	6972 Tris T2W pH6.0	6972 Tris T0 pH 6.0	6972 Tris T2W pH7.4	6972 Tris T0 pH7.4	6972 pH6.0	6972 pH7.4
EC50	10.14	5.913	36.54	42.37	6.258	54.55

Фиг. 9B

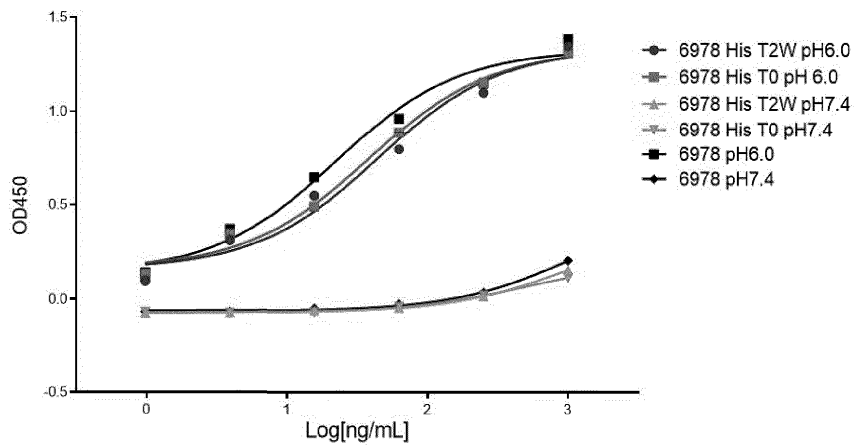
**BA-087-05-19 (6972 Glu)**



	6972 Glu T2W pH6.0	6972 Glu T0 pH 6.0	6972 Glu T2W pH7.4	6972 Glu T0 pH7.4	6972 pH6.0	6972 pH7.4
EC50	2.663	10.89	21.95	110.2	6.258	54.55

Фиг. 9C

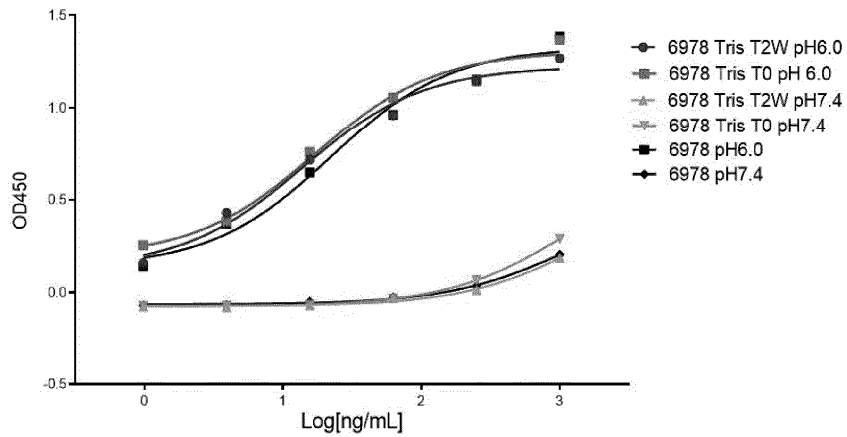
**BA-087-08-32 (6978 His)**



	6978 His T2W pH6.0	6978 His T0 pH 6.0	6978 His T2W pH7.4	6978 His T0 pH7.4	6978 pH6.0	6978 pH7.4
EC50	44.08	37.99	1075	490.8	22.23	1144

Фиг. 9D

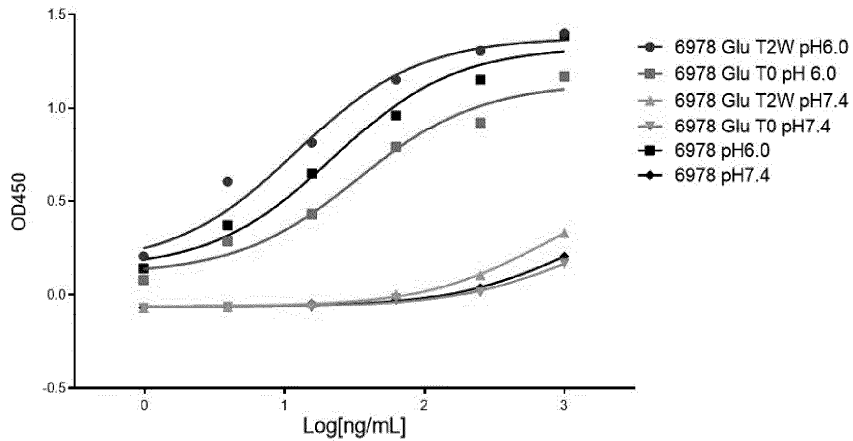
**BA-087-08-32 (6978 Tris)**



	6978 Tris T2W pH6.0	6978 Tris T0 pH 6.0	6978 Tris T2W pH7.4	6978 Tris T0 pH7.4	6978 pH6.0	6978 pH7.4
EC50	13.99	17.06	1491	1135	22.23	1144

Фиг. 9E

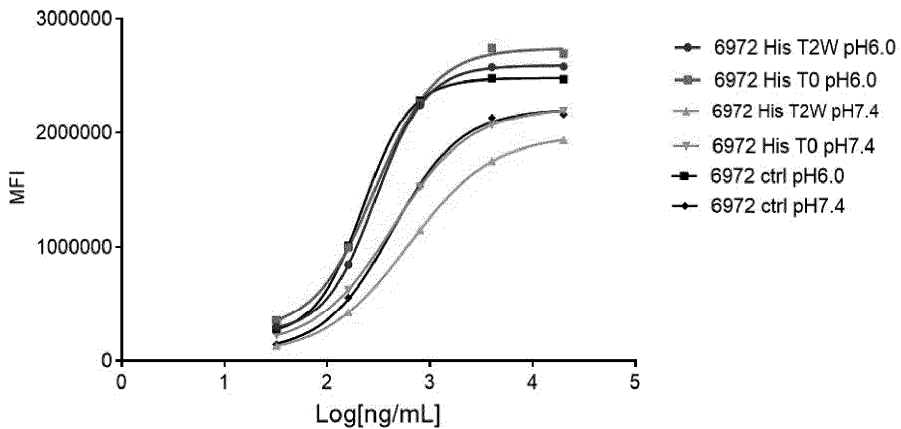
**BA-087-08-32 (6978 Glu)**



	6978 Glu T2W pH6.0	6978 Glu T0 pH 6.0	6978 Glu T2W pH7.4	6978 Glu T0 pH7.4	6978 pH6.0	6978 pH7.4
EC50	12.26	33.72	724	1189	22.23	1144

Фиг. 9F

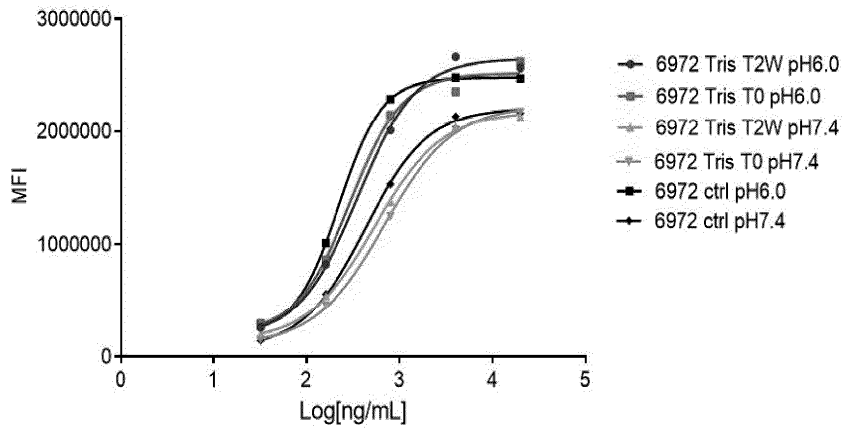
**BA-087-05-19 (6972 His)**



	6972 His T2W pH6.0	6972 His T0 pH6.0	6972 ctrl pH6.0	6972 His T2W pH7.4	6972 His T0 pH7.4	6972 ctrl pH7.4
EC50	294.8	290.8	222.5	614.8	433.4	428.1

Фиг. 10A

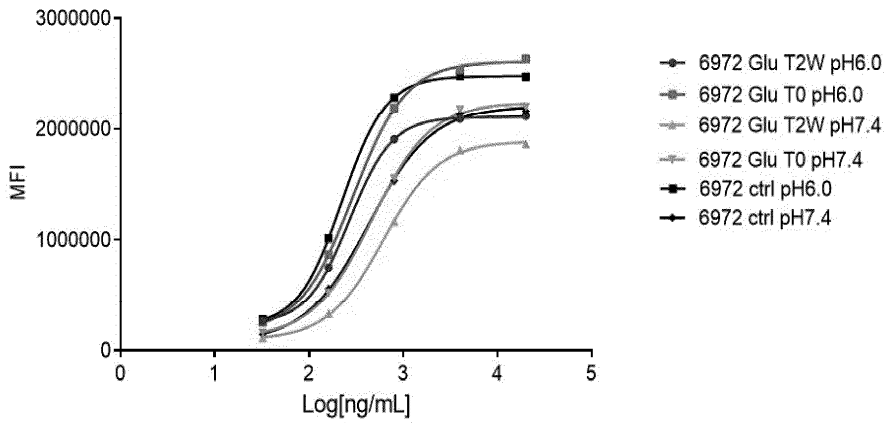
**BA-087-05-19 (6972 Tris)**



	6972 Tris T2W pH6.0	6972 Tris T0 pH6.0	6972 ctrl pH6.0	6972 Tris T2W pH7.4	6972 Tris T0 pH7.4	6972 ctrl pH7.4
EC50	352.3	291.4	222.5	537.1	681.3	428.1

Фиг. 10B

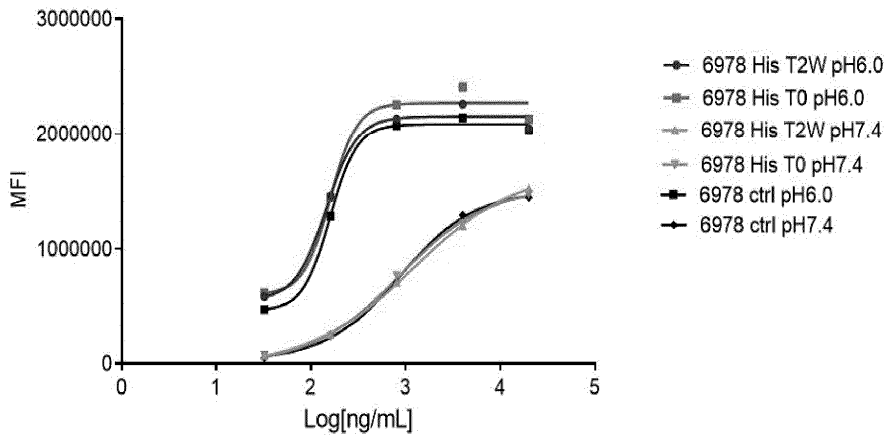
**BA-087-05-19 (6972 Glu)**



	6972 Glu T2W pH6.0	6972 Glu T0 pH6.0	6972 ctrl pH6.0	6972 Glu T2W pH7.4	6972 Glu T0 pH7.4	6972 ctrl pH7.4
EC50	266.6	291	222.5	606.9	461.5	428.1

Фиг. 10C

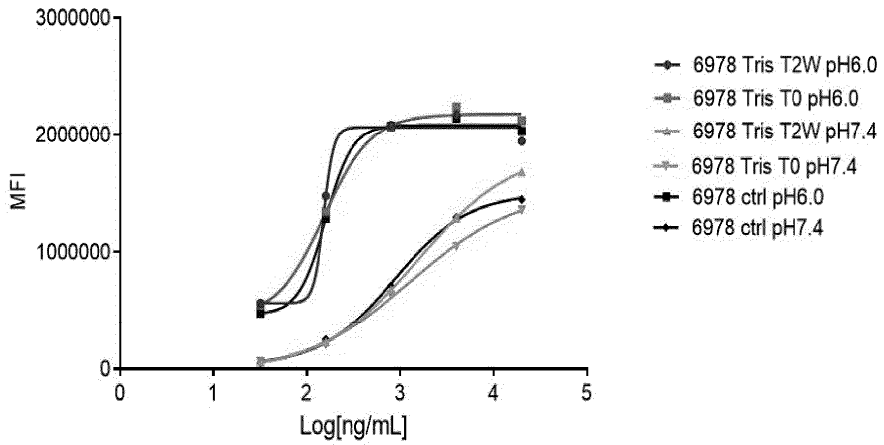
**BA-087-08-32 (6978 His)**



	6978 His T2W pH6.0	6978 His T0 pH6.0	6978 ctrl pH6.0	6978 His T2W pH7.4	6978 His T0 pH7.4	6978 ctrl pH7.4
EC50	144.8	159	158.4	1179	848.5	867.5

Фиг. 10D

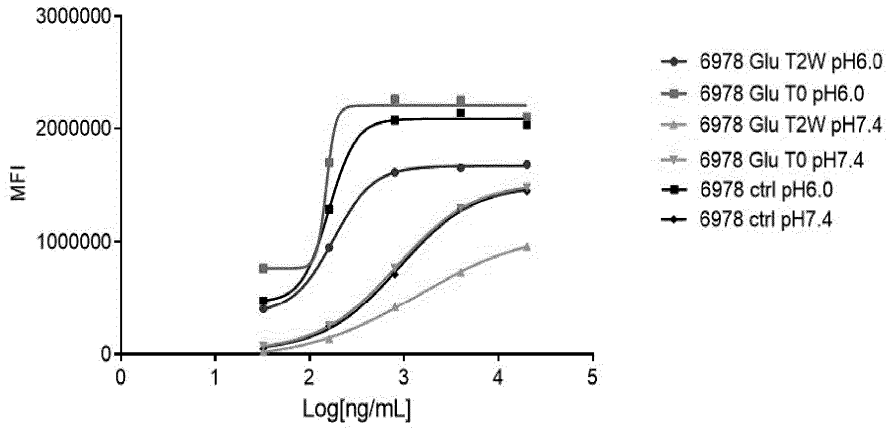
**BA-087-08-32 (6978 Tris)**



	6978 Tris T2W pH6.0	6978 Tris T0 pH6.0	6978 ctrl pH6.0	6978 Tris T2W pH7.4	6978 Tris T0 pH7.4	6978 ctrl pH7.4
EC50	~151.6	152.5	158.4	1540	1259	867.5

Фиг. 10Е

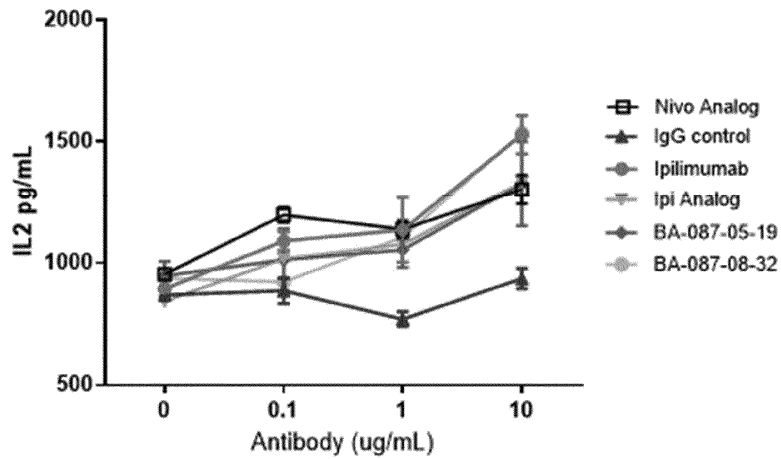
**BA-087-08-32 (6978 Glu)**



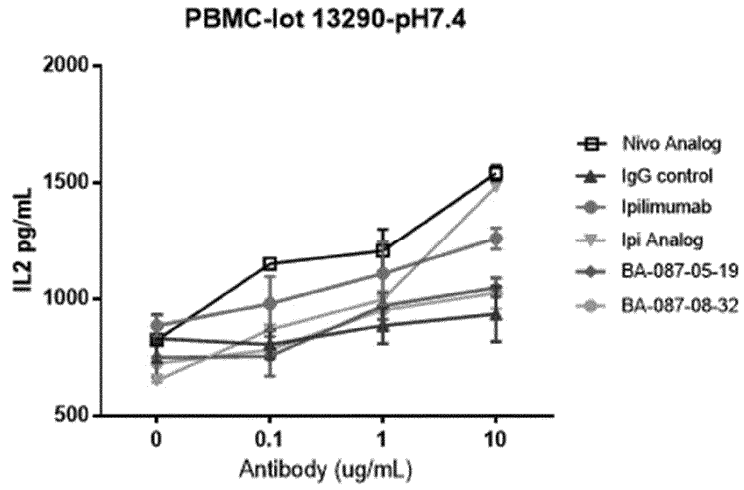
	6978 Glu T2W pH6.0	6978 Glu T0 pH6.0	6978 ctrl pH6.0	6978 Glu T2W pH7.4	6978 Glu T0 pH7.4	6978 ctrl pH7.4
EC50	176.4	~149.6	158.4	1407	813.5	867.5

Фиг. 10F

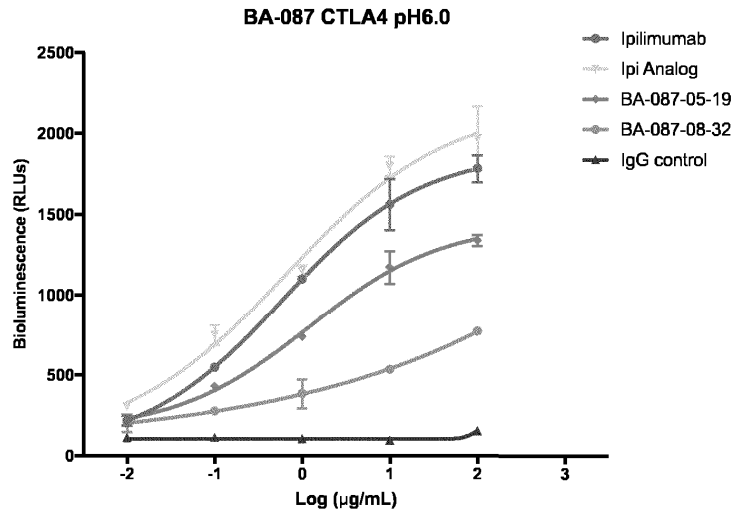
**PBMC-lot 13290-pH6.2**



Фиг. 11А



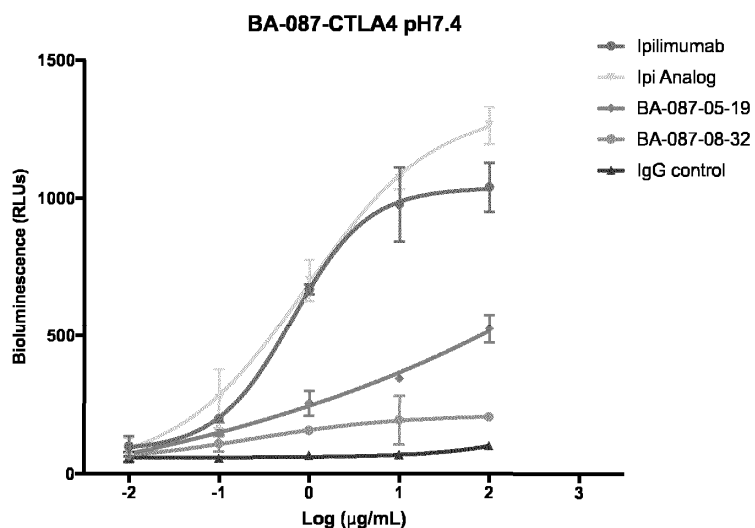
Фиг. 11В



	Ipilimumab	Ipi Analog	BA-087-05-19	BA-087-08-32	IgG control
EC50	0.5811	0.6523	1.195	~ 16504533325657	~ 91.71

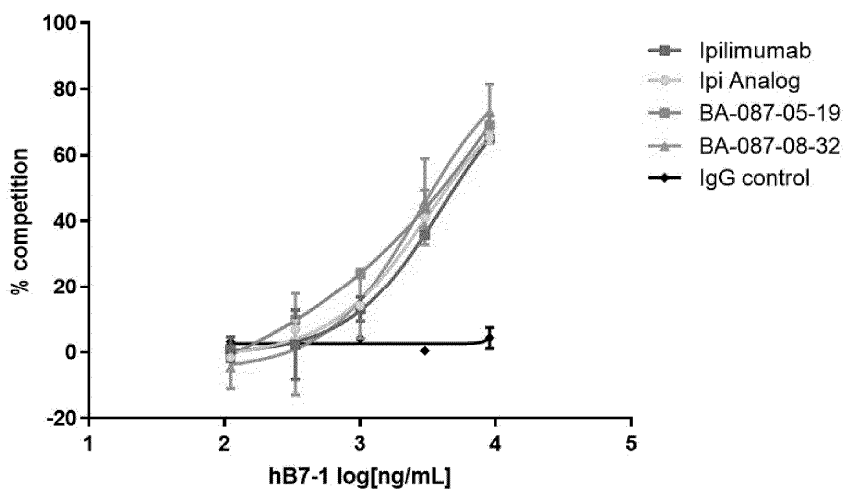
Фиг. 12А





	Ipilimumab	Ipi Analog	BA-087-05-19	BA-087-08-32	IgG control
EC50	0.6488	0.9095	~ 1.258e+025	0.2449	~ 258563

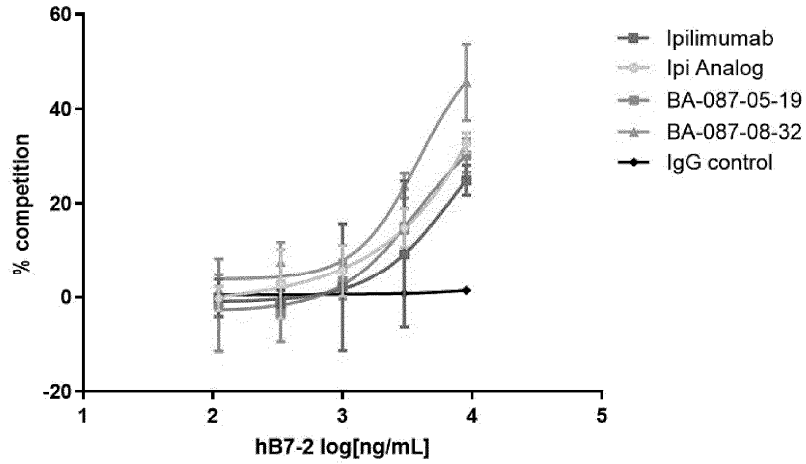
Фиг. 12В



	Ipi Analog	Ipilimumab	BA-087-05-19	BA-087-08-32	IgG control
EC50	3094	3957	~ 197808	2724	~ 29129

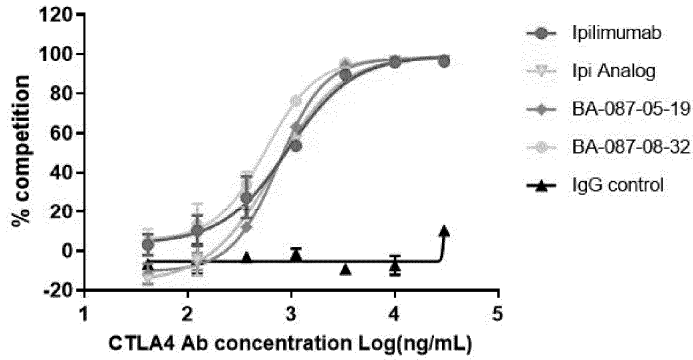
Фиг. 13А

047131



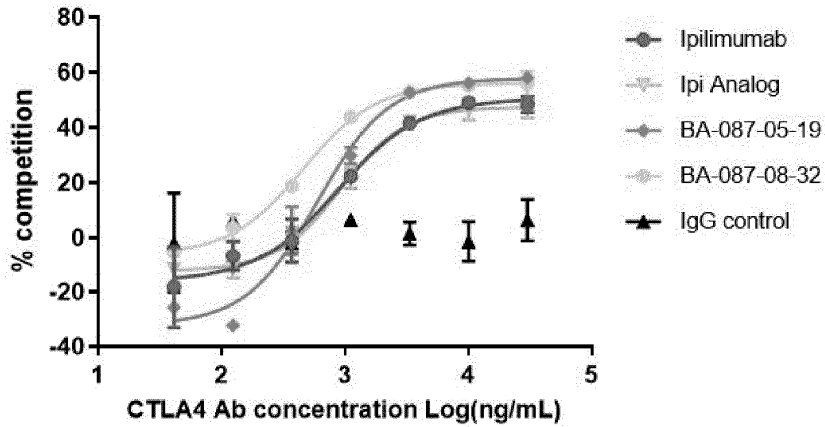
	Ipi Analog	Ipilimumab	BA-087-05-19	BA-087-08-32	IgG control
EC50	~ 2454034	7189	3729	3869	~ 228919

Фиг. 13В



	Ipilimumab	Ipi Analog	BA-087-05-19	BA-087-08-32	IgG control
EC50	920.3	689.4	744.9	566.8	~ 29949

Фиг. 14А



	Ipilimumab	Ipi Analog	BA-087-05-19	BA-087-08-32	IgG control
EC50	863.2	913.8	591.9	456.1	

Фиг. 14В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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