

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202393535** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2024.06.17**

(22) Дата подачи заявки  
**2022.06.24**

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 45/00* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 43/00* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01)

---

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ АНТИ-CTLA-4 АНТИТЕЛА**

---

(31) **2021-105823**

(32) **2021.06.25**

(33) **JP**

(86) **PCT/JP2022/025222**

(87) **WO 2022/270612 2022.12.29**

(71) Заявитель:

**ЧУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ  
КАЙСЯ; ОСАКА ЮНИВЕРСИТИ  
(JP)**

(72) Изобретатель:

**Катада Хитоси (SG), Тацуми Канако,  
Мацуда Ютака, Симидзу Сюн,  
Камимура Масаки, Комори Ясунори,  
Хори Юдзи, Игава Томоюки, Каваути  
Хироки, Хаяси Хироки, Сакагути  
Симон, Сусуму Хироаки (JP)**

(74) Представитель:

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

---

(57) Изобретение относится к анти-CTLA-4 антителам и способам получения и применения этих антител. В заявке также предусматривают нуклеиновые кислоты, кодирующие анти-CTLA-4 антитела, и клетки-хозяева, содержащие эти нуклеиновые кислоты. Кроме того, в настоящей заявке предусматривают полипептиды, содержащие вариант Fc-области, включающий изменения аминокислотной последовательности в исходной Fc-области, и способы получения и применения этих полипептидов.

**A1**

**202393535**

**202393535**

**A1**

## ПРИМЕНЕНИЕ АНТИ-CTLA-4 АНТИТЕЛА

5 Область техники

Настоящее изобретение относится к антителам к CTLA-4 (анти-CTLA-4 антителам) и способам применения этих антител. Настоящее изобретение также относится к полипептидам, включающим вариант Fc-области, которые включают изменение (изменения) в аминокислотной последовательности в исходной Fc-области, и к способам получения этих полипептидов.

Предшествующий уровень техники

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

CTLA-4 представляет собой гликопротеин, принадлежащий к надсемейству иммуноглобулинов, ген которого был клонирован из библиотеки клонов кДНК Т-клеток-киллеров, полученных от мышей в 1987 г. (см., например, NPL 2). Известно, что иммунный ответ Т-клеток подавляется посредством CTLA-4. В 1996 году сообщалось, что эффект регрессии опухоли наблюдался при введении антитела против CTLA-4 мышам-носителям рака, что соответствует представлению о том, что стимулирование активации Т-клеток путем подавления функции CTLA-4 приводит к регрессии рака (см., например, NPL 3). Оценка

эффективности анти-CTLA-4 антител у человека проводится с 2000 года, а моноклональное анти-CTLA-4 антитело человека (ипилимумаб) было одобрено Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в качестве первого в мире иммуностимулирующего терапевтического антитела в 2011 г. Было также произведено много моноклональных анти-CTLA-4 антител, отличных от ипилимумаба (см., например, PTL 1, PTL 2, PTL 3 и PTL 4), и их разработка в качестве лекарственных средств в настоящее время проводится. Такие лекарственные препараты, которые ингибируют иммунные контрольные точки, чтобы 5  
10  
нейтрализовать иммуносупрессивный механизм, тем самым повышая иммунореактивность, называются ингибиторами иммунных контрольных точек.

С другой стороны, ранее было известно, что среди Т-клеток есть клетки, обладающие иммуносупрессорной функцией, и они были идентифицированы как CD25- и CD4-положительные Т-клетки в 1995 г. и названы регуляторными Т-клетками (см., например, NPL 4). В 2003 году был идентифицирован ген Foxp3, который является основным геном и специфически экспрессируется в регуляторных Т-клетках, где регулирует их развитие и функцию. Foxp3 регулирует экспрессию различных генов, связанных с иммунным ответом, в качестве фактора транскрипции. В частности, Foxp3 участвует в конститутивной экспрессии CTLA-4 в регуляторных Т-клетках, и предполагают, что он играет важную роль в иммуносупрессорной функции регуляторных Т-клеток (см., например, NPL 5). 15  
20

Предполагают, что инфильтрация регуляторных Т-клеток в опухолевые ткани приводит к ослаблению или ингибированию механизма иммунного контроля за опухолью. Действительно, было обнаружено, что во многих карциномах человека наблюдают увеличение количества регуляторных Т-клеток (см., например, NPL 6), и сообщалось, что локальная инфильтрация регуляторных Т-клеток в опухоль может стать плохим прогностическим фактором рака у пациент. И наоборот, если регуляторные Т-клетки могут быть удалены из опухолевых тканей или уменьшены в них, ожидается, что это приведет к усилению противоопухолевого иммунитета. В настоящее время активно развивается иммунотерапия рака, нацеленная на регуляторные Т-клетки. 25  
30

Введение анти-CTLA-4 антитела, ипилимумаба, усиливает противоопухолевый иммунитет, но сообщалось, что оно вызывает аутоиммунные

заболевания, поскольку системно повышает иммунореактивность. В одном клиническом исследовании нежелательные явления наблюдались у 60% пациентов, которым вводили ипилимумаб, причем у многих из них были аутоиммунные заболевания, связанные с кожей или желудочно-кишечным трактом. В другом клиническом исследовании также сообщалось, что примерно у половины пациентов, которым вводили ипилимумаб, развились аналогичные аутоиммунные заболевания. Для подавления таких побочных эффектов в некоторых случаях пациенту, которому вводили ипилимумаб, вводят иммунодепрессант. Желательна разработка нового лекарственного средства, которое может поддерживать противоопухолевый иммунный ответ, одновременно подавляя такие побочные эффекты ингибиторов иммунных контрольных точек.

Желательно, чтобы при введении терапевтического антитела в живой организм его антиген-мишень специфически экспрессировался только в местах поражения. Однако во многих случаях один и тот же антиген экспрессируется также в участках, не имеющих поражений, в нормальных тканях и может вызывать побочные эффекты, нежелательные с точки зрения терапии. Например, хотя антитело против опухолевого антигена может проявлять цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток посредством ADCC и т.п., если тот же антиген также экспрессируется в нормальных тканях, антитело может также повреждать нормальные клетки. Для решения вышеуказанной проблемы была разработана технология, которая фокусируется на том явлении, что большое количество того или иного соединения присутствует в ткани-мишени (например, ткани опухоли) и создает антигенсвязывающую молекулу, у которой изменяется антигенсвязывающая активность в зависимости от концентрации соединения (см., например, PTL 11).

Антитела привлекают внимание как фармацевтические препараты из-за их высокой стабильности в крови и меньшего количества побочных эффектов (NPL 12 и NPL 13). Большинство имеющихся на рынке в настоящее время фармацевтических препаратов на основе антител представляют собой антитела человека подкласса IgG1. К настоящему времени проведено множество исследований эффекторных функций антител класса IgG, а именно антителозависимой клеточной цитотоксичности (далее обозначаемой как ADCC) и комплементзависимой цитотоксичности (далее обозначаемой как CDC).

Сообщалось, что среди класса человеческих IgG антитела подкласса IgG1 обладают самой высокой активностью ADCC и активностью CDC (NPL 14). Кроме того, антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), который представляет собой фагоцитоз клеток-мишеней, опосредованный антителами класса IgG, также был показан как одна из эффекторных функций антител (NPL 15 и NPL 16).

Чтобы антитела IgG проявляли ADCC, CDC и ADCP, Fc-область антитела должна связываться с рецептором антитела (далее обозначаемым как FcγR), присутствующим на поверхности эффекторных клеток, таких как клетки-киллеры, естественные клетки-киллеры и активированные макрофаги, а также к различным компонентам комплемента. Сообщается, что у человека семейство белков FcγR имеет изоформы FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa и FcγRIIIb, а также сообщалось об аллотипах каждого из них (NPL 17).

Усиление цитотоксических эффекторных функций, таких как ADCC, ADCP и CDC, привлекает внимание как перспективное средство усиления противоопухолевого эффекта антител. О важности эффекторных функций, опосредованных FcγR, для противоопухолевого эффекта антител сообщалось при использовании мышиных моделей (NPL 7 и NPL 8). Кроме того, наблюдалась корреляция между клиническими результатами у людей и аллотипом полиморфизма с высоким сродством FcγRIIIa (V158) и аллотипом полиморфизма с низким сродством (F158) (NPL 18). Аналогичным образом было также показано, что клинические эффекты варьируются в зависимости от аллотилов FcγRIIa (H131 и R131) (NPL 19). Эти сообщения показывают, что антитела, обладающие Fc-областью с оптимизированным связыванием с конкретным FcγR, будут опосредовать более мощные эффекторные функции и тем самым проявлять эффективные противоопухолевые эффекты.

Баланс связывающей активности антитела по отношению к активирующим рецепторам, состоящим из FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIIa и FcγRIIIb, и к ингибирующему рецептору, состоящему из FcγRIIb, является важным элементом оптимизации эффекторных функций антитела. Используя Fc-область с повышенной активностью связывания с активирующими рецепторами и пониженной активностью связывания с ингибирующими рецепторами, можно придать антителу оптимальные эффекторные функции (NPL 20). Было показано, что важны для связывания между Fc-областью и FcγR несколько

аминокислотных остатков в шарнирной области антитела и домене CH2, а также сахарная цепь, прикрепленная к Asn в положении 297 согласно нумерации EU, которая связана с доменом CH2 (NPL 14, NPL 21 и NPL 22). С акцентом на этот сайт связывания к настоящему времени были изучены варианты Fc-области с различными свойствами связывания FcγR, и были получены варианты Fc-области с более высокой активностью связывания с активирующими FcγR (PTL 5, PTL 6, NPL 9 и NPL 10).. Например, Lazaг с соавт. заменили Ser в положении 239, Ala в положении 330 и Ile в положении 332 согласно нумерации EU в IgG1 человека на Asp, Leu и Glu соответственно и тем самым успешно увеличили его связывание с FcγRIIIa(V158) человека примерно до 370 раз (NPL 9 и PTL 6). Shinkawa с соавт. удалось увеличить связывание с FcγRIIIa примерно в 100 раз за счет удаления фукозы в цепи сахара, присоединенной к Asn в положении 297 по нумерации EU (NPL 23). Эти методы вносят одинаковые изменения или одни и те же модификации цепи сахара в обе Fc-области H-цепи антитела. Между тем, сообщалось, что, хотя антитело Fc является гомодимером, оно связывается с FcγR в соотношении 1:1, распознавая FcγR асимметрично через нижний шарнир и домен CH2 (NPL 11). Учитывая тот факт, что Fc-область асимметрично взаимодействует с FcγR, возможно, можно более точно оптимизировать взаимодействие IgG-FcγR путем введения различных модификаций в каждую H-цепь. На основании этой идеи также сообщалось о методах оптимизации взаимодействия антитело-FcγR путем различной модификации Fc-области каждой H-цепи, так что Fc модифицируется асимметрично (PTL 7, PTL 8, PTL 9 и PTL 10). Фактически, асимметричная модификация Fc-области дала варианты с более высокой активностью ADCC, чем афукозилированные антитела, которые представляют собой существующие антитела, усиленные ADCC (PTL 9 и PTL 10).

Помимо активности ADCC, активность ADCP также является важной эффекторной функцией антитела и, как сообщают, способствует противоопухолевым эффектам (NPL 24). Активность ADCP можно повысить за счет ингибирования сигнала «Не ешь меня», представляемого CD47 (NPL 24), а также усилить за счет усиления способности связывания FcγRIIIa (NPL 25). Однако FcγRIIIa, активирующий FcγR, и ингибирующий FcγRIIb имеют очень высокую гомологию в аминокислотной последовательности внеклеточной области, и поэтому селективное усиление способности связывания FcγRIIIa

затруднено (NPL 26). Соответственно, когда способность связывания FcγRIIIa усиливается, активность связывания с FcγRIIb, ингибирующим рецептором, также, вероятно, будет усиливаться, тем самым ослабляя эффекторные функции. Фактически, варианты со значительно улучшенной способностью связывания FcγRIIIa также имели более сильную способность связывания FcγRIIb, чем нативный IgG1 (PTL 9 и PTL 10). Таким образом, чтобы продемонстрировать высокую активность ADCC/ADCP, предпочтительно усиливать связывание с FcγRIIIa и/или FcγRIIa, насколько это возможно, без усиления связывания с FcγRIIb; однако о таком варианте не сообщалось.

10 Цитируемая литература

Патентная литература:

[PTL 1] WO 2000/037504

[PTL 2] WO 2001/014424

[PTL 3] WO 2012/120125

15 [PTL 4] WO 2016/196237

[PTL 5] WO 2000/042072

[PTL 6] WO 2006/019447

[PTL 7] WO 2012/058768

[PTL 8] WO 2012/125850

20 [PTL 9] WO 2013/002362

[PTL 10] WO 2014/104165

[PTL 11] WO 2013/180200

Цитируемые научные публикации:

[NPL 1] Pardoll, Nat Rev Cancer (2012) 12: 252-264

25 [NPL 2] Brunet с соавт., Nature (1987) 328: 267-270

[NPL 3] Leach с соавт., Science (1996) 271: 1734-1736

[NPL 4] Sakaguchi с соавт., J Immunol (1995) 155: 1151-1164

[NPL 5] Takahashi с соавт., J Exp Med (2000) 192: 303-310

[NPL 6] Nishikawa, Sakaguchi, Int J Cancer (2010) 127: 759-767

30 [NPL 7] Clynes с соавт., Proc Natl Acad Sci U S A (1998) 95: 652-656

[NPL 8] Clynes с соавт., Nat Med (2000) 6: 443-446

[NPL 9] Lazar с соавт., Proc Natl Acad Sci U S A (2006) 103: 4005-4010

[NPL 10] Chu с соавт., Mol Immunol (2008) 45: 3926-3933

[NPL 11] Radaev с соавт., J Biol Chem (2001) 276: 16469-16477

- [NPL 12] Reichert с соавт., Nat Biotechnol (2005) 23: 1073-1078
- [NPL 13] Pavlou, Belsey, Eur J Pharm Biopharm (2005) 59: 389-396
- [NPL 14] Clark, Chem Immunol (1997) 65: 88-110
- [NPL 15] Horton с соавт., Cancer Res (2008) 68: 8049-8057
- 5 [NPL 16] Zalevsky с соавт., Blood (2009) 113: 3735-3743
- [NPL 17] Jefferis, Lund, Immunol Lett (2002) 82: 57-65
- [NPL 18] Carton с соавт., Blood (2002) 99: 754-758
- [NPL 19] Tamura с соавт., Ann Oncol (2011) 22: 1302-1307
- [NPL 20] Nimmerjahn, Ravetch, Science (2005) 310: 1510-1512
- 10 [NPL 21] Greenwood с соавт., Eur J Immunol (1993) 23: 1098-1104
- [NPL 22] Morgan с соавт., Immunology (1995) 86: 319-324
- [NPL 23] Shinkawa с соавт., J Biol Chem (2003) 278: 3466-3473
- [NPL 24] Tsao с соавт., JCI Insight (2019) 4: e131882
- [NPL 25] Richards с соавт., Mol Cancer Ther (2008) 7: 2517-2527
- 15 [NPL 26] Mimoto с соавт., Protein Eng Des Sel (2013) 26: 589-598

#### Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение предусматривает анти-CTLA-4 антитела и способы применения этих антител. Настоящее изобретение также предусматривает

20 полипептиды, включающие вариант Fc-области, и способы получения полипептидов.

#### Решение проблемы

Точнее, настоящее изобретение предусматривает приведенные ниже пункты [1]-[34]:

25

[1] Анти-CTLA-4 антитело, применяемое в лечении рака, причем анти-CTLA-4 антитело содержит:

(А) вариабельную область, обладающую активностью связывания CTLA-4, которая зависит от концентрации аденозинсодержащего соединения; и

(Б) вариант Fc-области, содержащий несколько изменений аминокислотной

30 последовательности в исходной Fc-области,

причем исходная Fc-область состоит из двух полипептидных цепей, а вариант Fc-области содержит изменения аминокислотной последовательности в следующих положениях:



(i) положениях 234, 235, 236, 239, 268, 270, 298 и 330 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области; и

(ii) положениях 270, 298, 326, 330 и 334 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

5 [2] Анти-CTLA-4 антитело для применения по пункту [1], в котором опухоль представляет собой солидную опухоль, в которую инфильтрованы регуляторные T (Treg) клетки.

[3] Анти-CTLA-4 антитело для применения for use in damaging cells, причем анти-CTLA-4 антитело содержит:

10 (A) вариабельную область, обладающую CTLA-связывающей активностью, которая зависит от концентрации аденозин-содержащего соединения; и

(B) вариабельную FC-область, содержащую несколько изменений аминокислотной последовательности в исходной FC-области, причем исходная FC-область состоит из двух полипептидных цепей, и вариант FC-области  
15 содержит изменения аминокислотной последовательности в следующих положениях:

(i) положениях 234, 235, 236, 239, 268, 270, 298 и 330 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области; и

20 (ii) положениях 270, 298, 326, 330 и 334 в соответствии с нумерацией EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

[4] Анти-CTLA-4 антитело для применения по пункту [3], в котором клетки, которые должны быть повреждены, являются клетками Treg.

[5] Анти-CTLA-4 антитело для применения по пункту [3], в котором клетки повреждены за счет активности ADCC, активности CDC или активности ADCP.

25 [6] Анти-CTLA-4 антитело для применения по пункту [3] или [4], в котором иммунитет активируется путем повреждения клеток Treg.

[7] Анти-CTLA-4 антитело для применения по пункту [1] или [2], в которых опухоль является, по меньшей мере одной, выбранной из группы, состоящей из карциномы, лимфомы, бластомы, саркомы и лейкоза.

30 [8] Анти-CTLA-4 антитело применения по пункту [7], в котором опухоль является, по меньшей мере одной, выбранной из группы, состоящей из рака легких, мелкоклеточного рака легких, немелкоклеточного рака легких, аденокарциномы легких, плоскоклеточной карциномы легких, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака

печени, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака почек, рака предстательной железы, рака яичника, рака щитовидной железы, холангиокарциномы, перитонеального рака, мезотелиомы, плоскоклеточного рака, рака шейки матки, рака эндометрия, рака мочевого пузыря, рака пищевода, рака головы и шеи, рака носоглотки, рака слюнной железы, тимомы, рака кожи, базальноклеточного рака, меланомы, злокачественной меланомы, рака анального канала, рака полового члена, рак яичка, опухоли Вильмса, острого миелоидного лейкоза, (включая острый миелолейкоз, острый миелобластный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, острый миеломоноцитарный лейкоз и острый моноцитарный лейкоз), хронического миелогенного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфолейкоза, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы (включая лимфому Беркитта, хронический лимфоцитарный лейкоз, грибовидный микоз, лимфому мантийных клеток, фолликулярную лимфому, диффузную крупноклеточную лимфому, лимфому маргинальной зоны, пилочитарный лейкоз, плазмацитому, периферическую Т-клеточную лимфому и Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых), гистиоцитоза из клеток Лангерганса, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, опухоли мозга (включая глиому, астроглиому, глиобластому, менингиому и эпендиому), нейробластомы, ретинобластомы, остеосаркомы, саркомы Капоши, саркомы Юинга, ангиосаркомы и гемангиоперицитомы.

[9] Анти-CTLA-4 антитело для применения по [8], где опухоль представляет собой по меньшей мере одну опухоль, выбранную из группы, включающей рак легких, рак ободочной кишки, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак печени, рак поджелудочной железы, рак почки, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи и меланому.

[10] Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из пунктов от [1] до [9], где анти-CTLA-4 антитело представляет собой иммуноконъюгат.

[11] Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из пунктов от [1] до [10], где анти-CTLA-4 антитело смешивают и используют с одним или несколькими любыми фармацевтически приемлемыми носителями.

[12] Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из пунктов от [1] до [11], где анти-CTLA-4 антитело используют в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом.

[13] Анти-CTLA-4 антитело для применения по [12], где дополнительный терапевтический агент представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из ингибитора иммунных контрольных точек, ингибитора EGFR, ингибитора HER2 и химиотерапевтического агента.

5 [14] Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из пунктов от [1] до [13], где переменная область имеет по меньшей мере один признак, выбранный из пунктов (а)-(и), представленных ниже:

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

(б) значение  $K_D$  в присутствии 100 мкМ аденозин-содержащего соединения составляет  $5 \times 10^{-7}$  М или меньше;

(в) значение  $K_D$  в отсутствие аденозин-содержащего соединения составляет  $1 \times 10^{-6}$  М или более;

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

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

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

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

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

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

[15] Применение анти-CTLA-4 антитела по пункту от [1] до [14], где анти-CTLA-4 антитело является моноклональным антителом.

30 [16] Анти-CTLA-4 антитело по любому из пунктов от [1] до [15], где анти-CTLA-4 антитело является антителом человека, гуманизированным антителом или химерным антителом.

[17] Анти-CTLA-4 антитело по любому из пунктов от [1] до [16], где анти-CTLA-4 антитело включает: (а) HVR-H1 (SEQ ID NO: 223), содержащую аминокислотную последовательность  $SX_1TMN$ , где  $X_1$  означает H, A, R или K;

(б) HVR-H2 (SEQ ID NO: 224), содержащую аминокислотную последовательность SISX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>SX<sub>3</sub>YIYYAX<sub>4</sub>SVX<sub>5</sub>G, где X<sub>1</sub> означает S или T, X<sub>2</sub> означает R или Q, X<sub>3</sub> означает G или H, X<sub>4</sub> означает D, E или R и X<sub>5</sub> означает K или R; и (в) HVR-H3 (SEQ ID NO: 225), содержащую аминокислотную последовательность YGX<sub>1</sub>REDMLWVFDY, где X<sub>1</sub> означает K или A.

[18] Анти-CTLA-4 антитело для применения по пункту [17], причем анти-CTLA-4 антитело дополнительно включает: (а) HVR-L1 (SEQ ID NO: 226), содержащую аминокислотную последовательность X<sub>1</sub>GX<sub>2</sub>STX<sub>3</sub>VGDYX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>VX<sub>6</sub>, где X<sub>1</sub> означает T, D, Q или E, X<sub>2</sub> означает T или P, X<sub>3</sub> означает D или G, X<sub>4</sub> означает N или T, X<sub>5</sub> означает Y или W, и X<sub>6</sub> означает S или H; (б) HVR-L2 (SEQ ID NO: 227), содержащую аминокислотную последовательность X<sub>1</sub>TX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>KPX<sub>4</sub>, где X<sub>1</sub> означает E, F или Y, X<sub>2</sub> означает S или I, X<sub>3</sub> означает K или S, и X<sub>4</sub> означает S, E или K; и (в) HVR-L3 (SEQ ID NO: 228), содержащую аминокислотную последовательность X<sub>1</sub>TYAAPLGPX<sub>2</sub>, где X<sub>1</sub> означает S или Q и X<sub>2</sub> означает M или T.

[19] Анти-CTLA-4 антитело для применения по пункту [17], причем анти-CTLA-4 антитело дополнительно включает: переменный домен тяжелой цепи FR1, содержащий любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 229-232; FR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 233; FR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 234; и FR4, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 235.

[20] Анти-CTLA-4 антитело для применения по пункту [18], причем анти-CTLA-4 антитело включает: переменный домен легкой цепи FR1, содержащий любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 236-238; FR2, содержащий любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 240 и 241; FR3, содержащий любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 242-244; и FR4, содержащий любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 245 и 246.

[21] Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из пунктов [1]-[16], причем анти-CTLA-4 антитело включает: (а) последовательность VH, которая по меньшей мере на 95% идентична любой аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 83-86, 98 и 135-141; (б) последовательность VL, которая по меньшей мере на 95% идентична любой аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 88-95, 97, 99, 134 и 144-149; или (в) последовательность VH,

имеющую любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 83-86, 98 и 135-141, и последовательность VL, имеющую любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 88-95, 97, 99, 134 и 144-149.

5 [22] Анти-CTLA-4 антитело для применения по пункту [21], причем анти-CTLA-4 антитело включает:

(1) последовательность VH SEQ ID NO: 98 и последовательность VL SEQ ID NO: 99;

(2) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 88;

10 (3) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 89;

(4) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 90;

15 (5) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 91;

(6) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 92;

(7) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 93;

20 (8) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 94;

(9) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;

25 (10) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 95;

(11) последовательность VH SEQ ID NO: 84 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;

(12) последовательность VH SEQ ID NO: 85 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;

30 (13) последовательность VH SEQ ID NO: 86 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;

(14) последовательность VH SEQ ID NO: 86 и последовательность VL SEQ ID NO: 134;

(15) последовательность VH SEQ ID NO: 136 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;

(16) последовательность VH SEQ ID NO: 135 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;

5 (17) последовательность VH SEQ ID NO: 136 и последовательность VL SEQ ID NO: 95;

(18) последовательность VH SEQ ID NO: 137 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;

10 (19) последовательность VH SEQ ID NO: 138 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;

(20) последовательность VH SEQ ID NO: 138 и последовательность VL SEQ ID NO: 144;

(21) последовательность VH SEQ ID NO: 138 и последовательность VL SEQ ID NO: 145;

15 (22) последовательность VH SEQ ID NO: 138 и последовательность VL SEQ ID NO: 146;

(23) последовательность VH SEQ ID NO: 139 и последовательность VL SEQ ID NO: 146;

20 (24) последовательность VH SEQ ID NO: 140 и последовательность VL SEQ ID NO: 146;

(25) последовательность VH SEQ ID NO: 141 и последовательность VL SEQ ID NO: 146;

(26) последовательность VH SEQ ID NO: 140 и последовательность VL SEQ ID NO: 147;

25 (27) последовательность VH SEQ ID NO: 141 и последовательность VL SEQ ID NO: 147;

(28) последовательность VH SEQ ID NO: 140 и последовательность VL SEQ ID NO: 148;

30 (29) последовательность VH SEQ ID NO: 141 и последовательность VL SEQ ID NO: 148;

(30) последовательность VH SEQ ID NO: 136 и последовательность VL SEQ ID NO: 149;

(31) первую переменную область, включающую последовательность VH SEQ ID NO: 140 и последовательность VL SEQ ID NO: 146, и вторую

вариабельную область, включающую последовательность VH SEQ ID NO: 141 и последовательность VL SEQ ID NO: 146; или

(32) первую вариабельную область, включающую последовательность VH SEQ ID NO: 140 и последовательность VL SEQ ID NO: 147, и вторую

5 вариабельную область, включающую последовательность VH SEQ ID NO: 141 и последовательность VL SEQ ID NO: 147.

[23] Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из пунктов [1]-[22], причем анти-CTLA-4 антитело является IgG1 антителом полной длины.

10 [24] Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из пунктов [1]-[23], причем вариант Fc-области дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положении 332 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области.

[25] Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из пунктов [1]-[24], причем вариант Fc-области дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положении 332 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

20 [26] Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из пунктов [1]-[25], причем вариант Fc-области дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положении 236 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

[27] Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из пунктов [1]-[26], причем вариант Fc-области дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положениях 250 и 307 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области.

25 [28] Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из пунктов [1]-[27], причем вариант Fc-области дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положениях 250 и 307 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

30 [29] Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из пунктов [1]-[28], причем вариант Fc-области дополнительно содержит по меньшей мере одно изменение аминокислотной последовательности, выбранное из следующих изменений:

(i) Phe в положении 234, Gln в положении 235, Trp в положении 236, Met в положении 239, Val в положении 250, Asp в положении 268, Glu в положении

270, Ala в положении 298, Pro в положении 307, Met в положении 330, и Glu в положении 332, согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области, и

5 (ii) Ala в положении 236, Val в положении 250, Glu в положении 270, Ala в положении 298, Pro в положении 307, Asp в положении 326, Met в положении 330, Glu в положении 332, и Glu в положении 334, согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

10 [30] Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из пунктов [1]-[29], где вариант Fc-области дополнительно содержит любое из изменений аминокислотной последовательности от (a) до (e) ниже:

(a) Lys в положении 356 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области и Glu в положении 439 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области,

15 (б) Glu в положении 439 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области и Lys в положении 356 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области,

20 (в) Trp в положении 366 согласно EU-нумерации в первом полипептиде исходной Fc-области и Ser в положении 366, Ala в положении 368, и Val в положении 407 согласно EU-нумерации во втором полипептиде исходной Fc-области,

(г) Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области и Trp в положении 366 согласно нумерации EU - во втором полипептиде исходной Fc-области,

25 (д) Cys в положении 349 и Trp в положении 366 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области и Cys в положении 356, Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области, и

30 (е) Cys в положении 356, Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407 по нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области и Cys в положении 349 и Trp в положении 366 по нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

[31] Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из пунктов [1]-[30], где вариант Fc-области дополнительно содержит любое из изменений



аминокислотной последовательности от (а) до (г), приведенных ниже, в первом полипептиде и/или втором полипептиде исходной Fc-области:

(а) Ala в позиции 434 согласно нумерации EU,

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

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

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

10 [32] Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из пунктов [1]-[31], которое содержит константную область тяжелой цепи, содержащую вариант Fc-области.

[33] Анти-CTLA-4 антитело для применения по пункту [32], причем константная область тяжелой цепи содержит

15 (1) первый полипептид SEQ ID NO: 350 и второй полипептид SEQ ID NO: 351, или

(2) первый полипептид SEQ ID NO: 343 и второй полипептид SEQ ID NO: 344.

20 [34] Анти-CTLA-4 антитело, применяемое в лечении рака, причем анти-CTLA-4 антитело включает:

(1) первый полипептид H-цепи SEQ ID NO: 352, второй полипептид H-цепи SEQ ID NO: 353 и полипептид L-цепи SEQ ID NO: 161, или

(2) первый полипептид H-цепи SEQ ID NO: 335, второй полипептид H-цепи SEQ ID NO: 336 и полипептиды L-цепи SEQ ID NO: 161.

25 В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают следующее:

[101] Полипептид, который содержит вариант Fc-области, содержащий изменения аминокислотной последовательности в исходной Fc-области, при этом исходная Fc-область состоит из двух полипептидных цепей, причем

30 вариант Fc-области содержит изменения аминокислотной последовательности в следующих положениях:

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

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

5 [102] Полипептид по пункту [101], причем вариант Fc-области дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положении 326 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области.

10 [103] Полипептид по пункту [101] или [102], где вариант Fc-области дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положении 236 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

[104] Полипептид, который содержит вариант Fc-области, содержащий изменения аминокислотной последовательности в исходной Fc-области, при этом исходная Fc-область состоит из двух полипептидных цепей, причем вариант Fc-области содержит изменения аминокислотной последовательности в  
15 следующих положениях:

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

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

20 [105] Полипептид по одному из пунктов [101]-[104], где вариант Fc-области дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положении 332 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области.

25 [106] Полипептид по одному из пунктов [101]-[105], где вариант Fc-области дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положении 330 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области.

30 [107] Полипептид по одному из пунктов [101]-[106], где вариант Fc-области дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положении 332 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

[108] Полипептид по одному из пунктов [101]-[107], где вариант Fc-области дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в

положении 330 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

[109] Полипептид, который содержит вариант Fc-области, содержащий изменения аминокислотной последовательности в исходной Fc-области, при этом исходная Fc-область состоит из двух полипептидных цепей, причем вариант Fc-области содержит изменения аминокислотной последовательности в следующих положениях:

(i) положениях 234, 235, 236, 239, 268, 270, 298, 330 и 332 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области; и

(ii) положениях 236, 270, 298, 326, 330, 332 и 334 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

[110] Полипептид по одному из пунктов [101]-[109], где вариант Fc-области дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положениях 250 и 307 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области.

[111] Полипептид по одному из пунктов [101]-[110], где вариант Fc-области дополнительно содержит изменения аминокислотной последовательности в положениях 250 и 307 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

[112] Полипептид, который содержит вариант Fc-области, содержащий изменения аминокислотной последовательности в исходной Fc-области, при этом исходная Fc-область состоит из двух полипептидных цепей, причем вариант Fc-области содержит изменения аминокислотной последовательности в следующих положениях:

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

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

[113] Полипептид, который содержит вариант Fc-области, содержащий изменения аминокислотной последовательности в исходной Fc-области, при этом исходная Fc-область состоит из двух полипептидных цепей, причем вариант Fc-области содержит изменения аминокислотной последовательности в следующих положениях:

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

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

5 [114] Полипептид, который содержит вариант Fc-области, содержащий изменения аминокислотной последовательности в исходной Fc-области, при этом исходная Fc-область состоит из двух полипептидных цепей, причем вариант Fc-области содержит изменения аминокислотной последовательности в следующих положениях:

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

(ii) положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 330 и 332 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

[115] Полипептид по одному из пунктов [101]-[114], который содержит по меньшей мере одно изменение аминокислотной последовательности, выбранное из следующих вариантов:

15 (i) Tyr или Phe в положении 234, Gln или Tyr в положении 235, Trp в положении 236, Met в положении 239, Val в положении 250, Asp в положении 268, Glu в положении 270, Ala в положении 298, Pro в положении 307, Asp в положении 326, Met в положении 330 и Glu в положении 332 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области; и

20 (ii) Ala в положении 236, Val в положении 250, Glu в положении 270, Ala в положении 298, Pro в положении 307, Asp в положении 326, Met или Lys в положении 330, Asp или Glu в положении 332 и Glu в положении позиция 334 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

[116] Полипептид по одному из пунктов [101]-[115], который содержит по меньшей мере одно изменение аминокислотной последовательности, выбранное из следующих аминокислотных изменений:

30 Полипептид по любому из пунктов от [101] до [115], где вариант Fc-области дополнительно содержит любое из изменений аминокислотной последовательности от (a) до (e) ниже:

(a) Lys в положении 356 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области и Glu в положении 439 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области;

(б) Glu в положении 439 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области и Lys в положении 356 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области;

5 (в) Trp в положении 366 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области и Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407 в соответствии с нумерацией EU во втором полипептиде исходной области Fc;

10 (г) Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области и Trp в положении 366 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области;

15 (д) Cys в положении 349 и Trp в положении 366 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области и Cys в положении 356, Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407 согласно EU нумерация во втором полипептиде исходной Fc-области;

(е) Cys в положении 356, Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области и Cys в положении 349 и Trp в положении 366 согласно EU нумерация во втором полипептиде исходной Fc-области.

20 [117] Полипептид по любому из пунктов от [101] до [116], где вариант Fc-области дополнительно содержит любое из аминокислотных изменений от (а) до (е), приведенных ниже, в первом полипептиде и/или во втором полипептиде исходной Fc-области:

(а) Ala в положении 434 согласно нумерации EU;

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

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

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

[118] Полипептид по любому из пунктов от [101] до [117], где активность связывания по меньшей мере с одним рецептором Fc $\gamma$ , выбранным из группы, состоящей из Fc $\gamma$ RIa, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb и Fc $\gamma$ RIIIa, усиливается в варианте Fc-области по сравнению с исходной Fc-областью.

[119] Полипептид по пункту [118], где активность связывания с FcγRIIa и FcγRIIIa усиливается в варианте Fc-области по сравнению с исходной Fc-областью.

5 [120] Полипептид по любому из пунктов от [101] до [119], где селективность между активирующим рецептором Fcγ и ингибирующим рецептором Fcγ улучшена в варианте Fc-области по сравнению с исходной Fc-областью.

10 [120-2] Полипептид по любому из пунктов от [101] до [119], где активность связывания с активирующим рецептором Fcγ селективность повышена по сравнению с активностью связывания с ингибирующим рецептором Fcγ в варианте Fc-области по сравнению с исходной Fc-областью.

15 [120-3] Полипептид по любому из пунктов от [101] до [119], где соотношение активности связывания с активирующим рецептором Fcγ к активности связывания с ингибирующим рецептором Fcγ (соотношение A/I) выше в варианте Fc-области по сравнению с исходной Fc-областью.

20 [120-4] Полипептид по пункту [120-3], где соотношение (соотношение A/I) в полипептиде, содержащем вариант Fc-области, выше в 1,1 раза или более, 1,2 раза или более, 1,3 раза или более, 1,4 раза или более, 1,5 раза или более, 1,6 раза или более, 1,7 раза или более, 1,8 раза или более, 1,9 раз и более, 2 раза и более, 3 раза и более, 4 раза и более, 5 раз и более, 6 раз и более, 7 раз и более, 8 раз и более, 9 раз и более, 10 раз и более, 20 раз и более, 30 раз и более, 40 раз и более, 50 раз и более, 60 раз и более, 70 раз и более, 80 раз и более, 90 раз и более, 100 раз и более, 200 раз и более, 300 раз или более, 400 раз или более, 500 раз или более, 600 раз или более, 700 раз или более, 800 раз или более, 900 раз или более, 1000 раз или более, 2000 раз или более, 3000 раз или более, 4000 раз или более, в 5000 раз или более, в 6000 раз или более, в 7000 раз или более, в 8000 раз или более, в 9000 раз или более или в 10000 раз или более чем в полипептиде, содержащем исходную Fc-областью.

30 [120-5] Полипептид по пункту [120-3], где соотношение (соотношение A/I) в полипептиде, содержащем вариант Fc-области, имеет значение 10 или выше, 20 или выше, 30 или выше, 40 или выше, 50 или выше, 60 или выше, 70 или выше, 80 или выше, 90 или выше, 100 или выше, 200 или выше, 300 или выше, 400 или выше, 500 или выше, 600 или выше, 700 или выше, 800 или выше, 900 или выше, 1000 или выше, 2000 или выше, 3000 или выше, 4000 или выше, 5000

или выше, 6000 или выше, 7000 или выше, 8000 или выше, 9000 или выше, 10000 или выше, 11000 или выше, 12 000 или выше, 13 000 или выше, 14 000 или выше или 15 000 или выше.

5 [121] Полипептид по любому из пунктов от [120] до [120-5], где активирующий рецептор Fc $\gamma$  представляет собой по меньшей мере один рецептор Fc $\gamma$ , выбранный из группы, состоящей из Fc $\gamma$ RIa, Fc $\gamma$ RIIa и Fc $\gamma$ RIIIa, а ингибирующий рецептор Fc $\gamma$  представляет собой Fc $\gamma$ RIIb.

[122] Полипептид по любому из пунктов от [101] до [121], где полипептид, содержащий вариант Fc-области, представляет собой антитело.

10 [123] Способ получения полипептида, содержащего вариант Fc-области, который включает введение изменений аминокислотной последовательности в исходную Fc-область, при этом исходная Fc-область состоит из двух полипептидных цепей, и изменения аминокислотной последовательности вносят в следующие положения:

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

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

20 [124] Способ получения полипептида, содержащего вариант Fc-области, который включает введение изменений аминокислотной последовательности в исходную Fc-область, при этом исходная Fc-область состоит из двух полипептидных цепей, и изменения аминокислотной последовательности вносят в следующие положения:

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

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

30 [125] Способ получения полипептида, содержащего вариант Fc-области, который включает введение изменений аминокислотной последовательности в исходную Fc-область, при этом исходная Fc-область состоит из двух полипептидных цепей, и изменения аминокислотной последовательности вносят в следующие положения:

(i) положения 234, 235, 236, 239, 268, 270, 298, 330 и 332 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области; и

(ii) положения 236, 270, 298, 326, 330, 332 и 334 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

[126] Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид любого из пунктов [101]–[122].

5 [127] Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по пункту [126].

[128] Способ получения полипептида, который включает культивирование клетки-хозяина по пункту [127] таким образом, что получается полипептид.

[129] Полипептид по любому из пунктов от [101] до [122], предназначенный для применения в лечении опухоли.

10 [130] Полипептид по любому из пунктов от [101] до [122], предназначенный для применения при повреждении клетки.

[131] Полипептид по пункту [130], где повреждение клетки происходит за счет активности ADCC, активности CDC или активности ADCP.

15 [132] Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из пунктов от [101] до [122] и фармацевтически приемлемый носитель.

[133] Фармацевтическая композиция по [132], которая представляет собой фармацевтическую композицию для лечения опухоли.

[134] Фармацевтическая композиция по [132], которая представляет собой фармацевтическую композицию для повреждения клетки.

20 [135] Фармацевтическая композиция по [134], где повреждение клетки происходит за счет активности ADCC, активности CDC или активности ADCP.

[136] Способ лечения опухоли, который включает введение полипептида по любому из пунктов от пунктов [101] до [122] или фармацевтической композиции по пункту [132].

25 [137] Способ повреждения клетки, который включает введение полипептида по любому из пунктов от пунктов [101] до [122] или фармацевтической композиции по пункту [132].

[138] Способ по пункту [137], где повреждение клетки происходит за счет активности ADCC, активности CDC или активности ADCP.

30 [139] Применение полипептида по любому из пунктов от [101] до [122] при получении агента для лечения опухоли.

[140] Применение полипептида по любому из пунктов от [101] до [122] при получении агента, повреждающего клетку.



[141] Применение по пункту [140], где повреждение клетки происходит за счет активности ADCC, активности CDC или активности ADCP.

[142] Способ модификации функции полипептида, содержащего Fc-область, который включает введение изменений аминокислотной последовательности в исходную Fc-область, при этом исходная Fc-область состоит из двух полипептидных цепей, и изменения аминокислотной последовательности вносятся в следующие положения:

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

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

[143] Способ модификации функции полипептида, содержащего Fc-область, который включает введение изменений аминокислотной последовательности в исходную Fc-область, при этом исходная Fc-область состоит из двух полипептидных цепей, и изменения аминокислотной последовательности вносятся в следующие положения:

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

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

[144] Способ модификации функции полипептида, содержащего Fc-область, который включает введение изменений аминокислотной последовательности в исходную Fc-область, при этом исходная Fc-область состоит из двух полипептидных цепей, и изменения аминокислотной последовательности вносятся в следующие положения:

(i) положения 234, 235, 236, 239, 268, 270, 298, 330 и 332 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области; и

(ii) положения 236, 270, 298, 326, 330, 332 и 334 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

30 [145] Способ по любому из пунктов [142]-[144], отличающийся тем, что модификация функции представляет собой усиление активности связывания с FcγRIIa и FcγRIIIa.

[146] Способ по любому из пунктов [142]-[144], где модификация функции представляет собой улучшение селективности между активирующим рецептором Fcγ и ингибирующим рецептором Fcγ.

5 [147] Способ по любому из пунктов [142]-[144], где модификация функции представляет собой селективное усиление активности связывания с активирующим рецептором Fcγ по сравнению с активностью связывания с ингибирующим рецептором Fcγ.

10 [148] Способ по любому из [142]-[144], отличающийся тем, что модификация функции представляет собой увеличение отношения активности связывания активирующего рецептора Fcγ к активности связывания ингибирующего рецептора Fcγ (соотношение A/I).

[149] Способ по пункту [148], в котором соотношение (соотношение A/I) увеличивается в 1,1 раза или более, в 1,2 раза или более, в 1,3 раза или более, в 1,4 раза или более, в 1,5 раза или более, в 1,6 раза или более, в 1,7 раза или  
15 более, 1,8 раза или более, 1,9 раза или более, 2 раза или более, 3 раза или более, 4 раза или более, 5 раз или более, 6 раз или более, 7 раз или более, 8 раз или более, 9 раз или более, 10 раз или более, 20 раз или более, 30 раз или более, 40 раз или более, 50 раз или более, 60 раз или более, 70 раз или более, 80 раз или более, 90 раз или более, 100 раз или более, 200 раз или более, 300 раз или более,  
20 400 раз или более, 500 раз или более, 600 раз или более, 700 раз или более, 800 раз или более, 900 раз или более, 1000 раз или более, 2000 раз или более, 3000 раз или более, 4000 раз или более, 5000 раз или более, 6000 раз или более, 7000 раз или более, 8000 раз или более, 9000 раз или более или 10000 раз или более по сравнению с соотношением в полипептиде, содержащем исходную Fc-  
25 область.

[150] Способ по любому из пунктов [142]-[149], в котором активирующий рецептор Fcγ представляет собой по меньшей мере один рецептор Fcγ, выбранный из группы, состоящей из FcγRIa, FcγRIIa и FcγRIIIa, а ингибирующий рецептор Fcγ представляет собой FcγRIIb.

30 [151] Способ по любому из пунктов [142]-[144], отличающийся тем, что модификация функции представляет собой усиление активности ADCC, активности CDC или активности ADCP.

Краткое описание фигур

Фигура 1. Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4 антител mNS-mFa55 (контрольное антитело) и SW1208-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной линией клеток CT26 (рак толстой кишки), как описано в примере 2-1-5. Через хвостовую вену контрольное антитело вводят в дозе 1 мг/кг, 2 мг/кг, 4 мг/кг и 8 мг/кг, тогда как переключающее антитело вводят в дозе 30 мг/кг. Каждая точка представляет собой среднее значение объема опухоли в группе (n=4).

Фигура 2. Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4 антител mNS-mFa55 (контрольное антитело) и SW1208-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной линией клеток MBT2 (рак мочевого пузыря), как описано в примере 2-2-4. Через хвостовую вену контрольное антитело вводят в дозе 1 мг/кг, тогда как переключающее антитело вводят в дозе 30 мг/кг. Каждая точка представляет собой среднее значение объема опухоли в группе (n=5).

Фигура 3. Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4 антитела hNS-mFa55 (контрольное антитело) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией Colon38 (рак толстой кишки), как описано в примере 2-3-5. Через хвостовую вену контрольное антитело вводят в дозах 0,3 мг/кг, 1 мг/кг и 10 мг/кг. Каждая точка представляет собой среднее значение объема опухоли в группе (n=4).

Фигура 4. Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4 антитела SW1610-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией Colon38 (рак толстой кишки), как описано в примере 2-3-5. Через хвостовую вену переключающее антитело вводят в дозах 0,3 мг/кг, 1 мг/кг и 10 мг/кг. Каждая точка представляет собой среднее значение объема опухоли в группе (n=4).

Фигура 5. Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4 антитела SW1612-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией Colon38 (рак толстой кишки), как описано в примере 2-3-5. Через хвостовую вену переключающее антитело вводят в дозе 0,3 мг/кг, 1 мг/кг и 10 мг/кг. Каждая точка представляет собой среднее значение объема опухоли в группе (n=4).

Фигура 6. Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4 антител hNS-mFa55 (контрольное антитело) и SW1610-mFa55 и SW1389-mFa55 (переключающие антитела) в мышинной модели, трансплантированной линией клеток A755 (рак

молочной железы), как описано в примере 2- 4-5. Через хвостовую вену контрольное антитело вводят в дозе 10 мг/кг, тогда как переключающие антитела вводят в дозе 30 мг/кг каждого. Каждая точка представляет собой среднее значение объема опухоли в группе (n=4).

5           Фигура 7. Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4 антител hNS-mFa55 (контрольное антитело) и SW1610-mFa55 и SW1389-mFa55 (переключающие антитела) в мышинной модели, трансплантированной линией клеток B16F1/OVA (меланома), как описано в примере 2-5-5. Через хвостовую вену контрольное антитело вводят в дозе 10 мг/кг, тогда как переключающие антитела вводят в  
10          дозе 100 мг/кг каждое. Каждая точка представляет собой среднее значение объема опухоли в группе (n=4).

            Фигура 8. Активность ипилимумаба и SW1610-ART12 и SW1389-ART5+ACT1 (переключающие антитела) по истощению Treg на МКПК, полученных от пациентов с раком ободочной кишки, как описано в примере 3.  
15          Каждое из антител применяют в дозе 10 мкг/мл или 50 мкг/мл. Каждая точка представляет образец от отдельного пациента, а горизонтальная линия показывает среднее значение.

            Фигура 9. Активность ипилимумаба и SW1610-ART12 и SW1389-ART5+ACT1 (переключающие антитела) по истощению Treg на МКПК, полученных от пациентов с раком головы и шеи, как описано в примере 3.  
20          Каждое из антител применяют в дозе 10 мкг/мл или 50 мкг/мл. Каждая точка представляет образец от отдельного пациента, а горизонтальная линия показывает среднее значение.

            Фигура 10. Активность ипилимумаба и SW1610-ART12 и SW1389-ART5+ACT1 (переключающие антитела) по истощению Treg на МКПК, полученных от пациентов с раком поджелудочной железы, как описано в  
25          примере 3. Каждое из антител применяют в дозе 10 мкг/мл или 50 мкг/мл. Каждая точка представляет образец от отдельного пациента, а горизонтальная линия показывает среднее значение.

30          Фигура 11. Активность ипилимумаба и SW1610-ART12 и SW1389-ART5+ACT1 (переключающие антитела) по истощению Treg на МКПК, полученных от пациентов с раком почки, как описано в примере 3. Каждое из антител применяют в дозе 10 мкг/мл или 50 мкг/мл. Каждая точка представляет

образец от отдельного пациента, а горизонтальная линия показывает среднее значение.

5 Фигура 12. Активность ипилиумаба и SW1610-ART12 и SW1389-ART5+ACT1 (переключающие антитела) по истощению Treg на МКПК, полученных от пациентов с раком легких, как описано в примере 3. Каждое из антител используют в концентрации 10 мкг/мл или 50 мкг/мл.

10 Фигура 13. Противоопухолевый эффект комбинированного применения анти-CTLA-4 антитела CTLA-4 SW1610-mFa55 (переключающее антитело) и анти-PD-L1 антитело в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией Colon38 (рак толстой кишки) как описано в примере 5. Через хвостовую вену переключающее антитело вводят в дозе 0,3 мг/кг на 14 день после трансплантации, тогда как анти-PD-L1 антитело вводят в дозе 10 мг/кг на 14, 17 и 20 день после трансплантации. Каждая точка представляет собой среднее значение объема опухоли в группе (n=5).

15 Фигура 14. Противоопухолевый эффект комбинированного применения анти-CTLA-4 антитела CTLA-4 SW1389-mFa55 (переключающее антитело) и анти-PD-L1 антитела в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией Colon38 (рак толстой кишки) как описано в примере 5. Через хвостовую вену переключающее антитело вводят в дозе 1 мг/кг на 14 день после трансплантации, тогда как анти-PD-L1 антитело вводят в дозе 10 мг/кг на 14 и 17 день после трансплантации. Каждая точка представляет собой среднее значение объема опухоли в группе (n=5).

20 Фигура 15. Связывающая активность анти-CTLA-4 антитела АВАМ004 с CTLA-4, причем активность связывания зависит от концентрации АТФ, АДФ или АМФ, как описано в контрольном примере 1-9.

25 Фигура 16. Связывающая активность анти-CTLA-4 антитела АВАМ004 с клетками, экспрессирующими CTLA-4, причем связывающая активность зависит от концентрации АМФ, как описано в контрольном примере 1-10.

30 Фигура 17. Активность ADCC анти-CTLA-4-антитела АВАМ004 в отношении клеток, экспрессирующих CTLA-4, в присутствии и в отсутствие АМФ, как описано в контрольном примере 1-11.

Фигура 18. Способ связывания Fab-фрагмента АВАМ004 и АМР, как описано в контрольном примере 2-13. На этой фигуре тяжелая цепь антитела обозначена черным цветом, легкая цепь – серым, а АМФ – в шаростержневой

модели. Аминокислотные остатки, образующие взаимодействие с АМФ, указаны в стержневой модели. Пунктирные линии и их значения показывают расстояние (Å) между каждым аминокислотным остатком и АМФ.

5 Фигура 19. Характер связывания Fab-фрагмента АВАМ004, АМФ и СТЛА-4 человека (hCTLA-4), как описано в контрольном примере 2-14. На фигуре тяжелая цепь антитела обозначена черным цветом, легкая цепь - серым цветом, hCTLA-4 - белым цветом, а АМФ в шаростержневой модели. Аминокислотные остатки hCTLA-4, содержащие один или несколько атомов, не являющихся атомами водорода, расположенными на расстоянии 4,2 Å от любой части антитела или АМФ, взяты в качестве эпитопа и указаны в стержневой модели.

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

20 Фигура 21. Наложенный рисунок структур антитела и АМФ, извлеченных из кристаллических структур только Fab-фрагмента АВАМ004, комплекса Fab-фрагмента АВАМ004 и АМФ и тройного комплекса Fab-фрагмента АВАМ004, АМФ и СТЛА-4, как описано в контрольном примере 2-15. На рисунке тяжелая цепь антитела обозначена черным цветом, легкая цепь — серым, а АМФ — в виде шаростержневой модели. Структура Fab-фрагмента АВАМ004 показана тонкой линией, структура бинарного комплекса с АМФ — средней по толщине линией, а структура тройного комплекса - толстой линией.

25 Фигура 22. Связывающая активность анти-СТЛА-4 антитела АВАМ004 и его варианта 04Н0150/04L0072 с СТЛА-4, причем активность связывания зависит от концентрации АТФ, АДФ или АМФ, как описано в контрольном примере 3-2. В обозначениях на рисунке WT и H150L072 обозначают АВАМ004 и 04Н0150/04L0072, соответственно.

30 Фигура 23. Нейтрализующая активность анти-СТЛА-4-антитела SW1077 в отношении СТЛА-4, причем нейтрализующая активность зависит от концентрации АТФ, как описано в контрольном примере 3-6.

Фигура 24. Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4-антитела mNS-mFa55 (контрольное антитело) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией FM3A, как описано в контрольном примере 3-7-4. Антитело вводят в дозах 0,01 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,25 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг, 30 мг/кг и 100 мг/кг через хвостовую вену. Каждая точка представляет собой средний объем опухоли в группе,  $n = 4$ .

Фигура 25. Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4-антитела SW1208-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией FM3A, как описано в контрольном примере 3-7-4. Антитело вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг, 100 мг/кг и 500 мг/кг через хвостовую вену. Каждая точка представляет собой средний объем опухоли в группе,  $n = 4$ .

Фигура 26. Изменения в соотношении эффекторных клеток Treg в опухоли при введении анти-CTLA-4-антитела mNS-mFa55 (контрольное антитело) или SW1208-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией FM3A, как описано в контрольном примере 3-7-7. Антитело mNS-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг и 100 мг/кг через хвостовую вену, а антитело SW1208-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг /кг, 100 мг/кг и 500 мг/кг через хвостовую вену. Опухоль исследуют через шесть дней после введения и оценивают увеличение или уменьшение эффекторных Treg с помощью анализа FACS. Продольная ось представляет отношение эффекторных клеток Treg ( $CD4^+ FoxP3^+ KLRG1^+$ ) к клеткам  $CD45^+$ . Показано среднее значение  $n = 3$ .

Фигура 27. Изменения в соотношении активированных хелперных Т-клеток в селезенке при введении анти-CTLA-4-антитела mNS-mFa55 (контрольное антитело) или SW1208-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией FM3A, как описан в контрольном примере 3-7-8. Антитело mNS-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг и 100 мг/кг через хвостовую вену, а антитело SW1208-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг и 100 мг/кг и 500 мг/кг через хвостовую вену. Селезенку извлекают через шесть дней после введения и оценивают увеличение или уменьшение количества активированных хелперных Т-клеток с помощью анализа FACS. Продольная ось представляет собой отношение активированных хелперных Т-клеток ( $CD4^+ Foxp3^- ICOS^+$ ) к  $CD45^+$  клеткам. Показано среднее значение,  $n = 3$ .

Фигура 28. Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4-антитела SW1389-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией Hера1-6/hGPC3, как описано в контрольном примере 4-3-5. Антитело вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг и 100 мг/кг через хвостовую вену. Каждая точка представляет собой средний объем опухоли в группе, n = 4.

Фигура 29. Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4-антитела hNS-mFa55 (контрольное антитело) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией Hера1-6/hGPC3, как описано в контрольном примере 4-3-5. Антитело вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг через хвостовую вену. Каждая точка представляет собой средний объем опухоли в группе, n = 4.

Фигура 30. Изменение соотношения эффекторных клеток Treg в опухоли при введении анти-CTLA-4-антитела hNS-mFa55 (контрольное антитело) или SW1389-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной клетками линии Hера1-6/hGPC3, как описано в контрольном примере 4-3-8. Антитело hNS-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг, а SW1389-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг, 100 мг/кг и 500 мг/кг через хвостовую вену. Опухоль исследуют через шесть дней после введения и оценивают увеличение или уменьшение эффекторных клеток Treg с помощью анализа FACS. Продольная ось представляет собой отношение эффекторных Treg ( $CD4^+ FoxP3^+ CCR7^{low} KLRG1^+$ ) к клеткам  $CD45^+$ . Показано среднее значение, n = 3.

Фигура 31. Изменение соотношения активированных хелперных Т-клеток в селезенке при введении анти-CTLA-4-антитела hNS-mFa55 (контрольное антитело) или SW1389-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией Hера1-6/hGPC3, как описано в контрольном примере 4-3-9. Антитело hNS-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг, а антитело SW1389-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг, 100 мг/кг и 500 мг/кг через хвостовую вену. Селезенку извлекают через шесть дней после введения и оценивают увеличение или уменьшение количества активированных хелперных Т-клеток с помощью анализа FACS. Продольная ось представляет собой отношение активированных хелперных Т-клеток ( $CD4^+ Foxp3^- ICOS^+$ ) к  $CD45^+$  клеткам. Показано среднее значение, n = 3.

Фигура 32. Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4-антитела SW1610-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной



клеточной линией Нера1-6/hGPC3, как описано в контрольном примере 5-4-5. Антитело вводят в дозах 0,3 мг/кг, 1 мг/кг и 3 мг/кг через хвостовую вену. Каждая точка представляет собой средний объем опухоли в группе, n = 5.

5 Фигура 33. Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4-антитела SW1612-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией Нера1-6/hGPC3, как описано в контрольном примере 5-4-5. Антитело вводят в дозах 0,3 мг/кг, 1 мг/кг и 3 мг/кг через хвостовую вену. Каждая точка представляет собой средний объем опухоли в группе, n = 5.

10 Фигура 34. Противоопухолевый эффект анти-CTLA-4-антитела SW1615-mFa55 (переключающее антитело) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией Нера1-6/hGPC3, как описано в контрольном примере 5-4-5. Антитело вводят в дозах 0,3 мг/кг, 1 мг/кг и 3 мг/кг через хвостовую вену. Каждая точка представляет собой средний объем опухоли в группе, n = 5.

15 Фигура 35. Изменения соотношения эффекторных клеток Treg в опухоли при введении анти-CTLA-4-антитела SW1610-mFa55, SW1612-mFa55 или SW1615-mFa55 (все они являются переключающими антителами) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией Нера1-6/hGPC3, как описано в контрольном примере 5-4-8. Антитело SW1610-mFa55 вводят в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг, SW1612-mFa55 вводят в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг, SW1615-mFa55 вводят в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг и 400 мг/кг и отрицательное контрольное антитело KLN-mFa55 вводят в дозе 400 мг/кг через хвостовую вену. Опухоль исследуют через шесть дней после введения и оценивают увеличение или уменьшение эффекторных клеток Treg с помощью анализа FACS. Продольная ось представляет собой отношение эффекторных 20 клеток Treg (CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> CCR7<sup>low</sup> KLRG1<sup>+</sup>) к клеткам CD45<sup>+</sup>. Показано среднее значение, n = 3.

30 Фигура 36. Изменения в соотношении активированных хелперных Т-клеток в селезенке при введении анти-CTLA-4-антитела SW1610-mFa55, SW1612-mFa55 или SW1615-mFa55 (все они являются переключающими антителами) в мышинной модели, трансплантированной клеточной линией Нера1-6/hGPC3, как описано в контрольном примере 5-4-9. Антитело SW1610-mFa55 вводят в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг, SW1612-mFa55 вводят в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг, SW1615-mFa55 вводят в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг и 400 мг/кг, и отрицательное контрольное антитело KLN-mFa55 вводят в дозе 400 мг/кг

через хвостовую вену. Селезенку исследуют через шесть дней после введения и оценивают увеличение или уменьшение количества активированных хелперных Т-клеток с помощью анализа FACS. Продольная ось представляет собой отношение активированных хелперных Т-клеток ( $CD4^+ Foxp3^- ICOS^+$ ) к  $CD45^+$  клеткам. Показано среднее значение,  $n = 3$ .

5  
10  
15  
Фигура 37. Сравнение активности ADCC *in vitro* антител, имеющих различные измененные константные области с повышенным связыванием с  $Fc\gamma R$ , как описано в контрольном примере 6-2. Как показано на фигуре, IgG1 представляет собой MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT, GASDALIE представляет собой MDX10D1H-GASDALIE/MDX10D1L-k0MT, ART6 представляет собой MDX10D1H-Kn462/MDX10D1H-H1445/MDX10D1L-k0MT, ART8 представляет собой MDX10D1H-Kn461/MDX10D1H-H1443/MDX10D1L-k0MT. В данном случае IgG1 представляет собой антитело, имеющее контрольную константную область, GASDALIE представляет собой антитело, имеющее константную область, описанную ранее, ART6 и ART8 представляют собой антитела, имеющие измененную константную область, полученную в контрольном примере 6-1.

20  
25  
Фигура 38. Сравнение *in vitro* активности ADCP антител, имеющих различные измененные константные области с повышенным связыванием с  $Fc\gamma R$ , как описано в контрольном примере 6-3. На рисунке IgG1 представляет собой MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT, GASDIE представляет собой MDX10D1H-GASDIE/MDX10D1L-k0MT, ART6 представляет собой MDX10D1H-Kn462/MDX10D1H-H1445/MDX10D1L-k0MT и ART8 представляет собой MDX10D1H-Kn461/MDX10D1H-H1443/MDX10D1L-k0MT. В данном случае IgG1 представляет собой антитело, имеющее контрольную константную область, GASDIE представляет собой антитело, имеющее ранее описанную константную область, и ART6 и ART8 представляют собой антитела, имеющие измененную константную область, полученную в контрольном примере 6-1.

30  
Фигура 39. Активность *in vitro* ADCC переключающего анти-CTLA-4-антитела SW1389-ART6, имеющего измененную константную область с повышенным связыванием с  $Fc\gamma R$ , как описано в контрольном примере 6-4.

Фигура 40. Активность *in vitro* ADCC переключающего анти-CTLA-4-антитела SW1610-ART6, имеющего измененную константную область с повышенным связыванием с  $Fc\gamma R$ , как описано в контрольном примере 6-4.

Фигура 41. Активность *in vitro* ADCC переключающего анти-CTLA-4-антитела SW1612-ART6, имеющего измененную константную область с повышенным связыванием с FcγR, как описано в контрольном примере 6-4.

5 Фигура 42. Нейтрализующая активность переключающего анти-CTLA-4 антитела SW1389 против CTLA-4 (активность по отмене сигнала CTLA-4, который действует ингибирующим образом против активации эффекторных клеток), как описано в контрольном примере 6-5.

10 Фигура 43. Нейтрализующая активность переключающего анти-CTLA-4 антитела SW1610 против CTLA-4 (активность по отмене сигнала CTLA-4, который действует ингибирующим образом против активации эффекторных клеток), как описано в контрольном примере 6-5.

15 Фигура 44. Нейтрализующая активность переключающего анти-CTLA-4 антитела SW1612 против CTLA-4 (активность по отмене сигнала CTLA-4, который действует ингибирующим образом против активации эффекторных клеток), как описано в контрольном примере 6-5.

Фигура 45. Нейтрализующая активность переключающего анти-CTLA-4 антитела SW1615 против CTLA-4 (активность по отмене сигнала CTLA-4, который действует ингибирующим образом против активации эффекторных клеток), как описано в контрольном примере 6-5.

20 Фигура 46. Цитотоксическая активность *in vitro* переключающего анти-CTLA-4 антитела SW1389-ART5+ACT1 против CTLA-4-положительных регуляторных Т-клеток, как описано в контрольном примере 6-6.

25 Фигура 47. Цитотоксическая активность *in vitro* переключающего анти-CTLA-4 антитела SW1389-ART5+ACT1 против CTLA-4-положительных регуляторных Т-клеток, как описано в контрольном примере 6-6.

Фигура 48. Цитотоксическая активность *in vitro* переключающего анти-CTLA-4 антитела SW1610-ART5+ACT1 против CTLA-4-положительных регуляторных Т-клеток, как описано в контрольном примере 6-6.

30 Фигура 49. Цитотоксическая активность *in vitro* переключающего анти-CTLA-4 антитела SW1610-ART5+ACT1 против CTLA-4-положительных регуляторных Т-клеток, как описано в контрольном примере 6-6.

Фигура 50. Показаны результаты анализа репортерного гена ADCC, в котором клетки Нера1-6/hEREg используют в качестве клеток-мишеней, а клетки Jurkat, экспрессирующие hFcγRIIIaV, используют в качестве

эффекторных клеток, как описано в контрольном примере 9-2. Каждая точка указывает среднюю кратность величины индукции,  $n=2$ .

5 Фигура 51. Показан результат анализа репортерного гена ADCC, в котором клетки Нера1-6/hEREG используют в качестве клеток-мишеней, а клетки Jurkat, экспрессирующие hFcγRIIaH, используют в качестве эффекторных клеток, как описано в контрольном примере 10. Каждая точка указывает среднее значение кратной индукции,  $n=3$ .

10 Фигура 52. Противоопухолевый эффект EGL-G1d, EGL-афукозила и EGL-ART6 на модели трансгенной мыши с FcγR человека, в которую трансплантировали клеточную линию Нера1-6/hEREG, как описано в контрольном примере 11-5. Антитело вводят в дозе 10 мг/кг через хвостовую вену. Каждая точка указывает средний объем опухоли для одной группы,  $n=5$ .

15 Фигура 53. hC1q-связывающая активность каждого антитела, имеющего модифицированную Fc-область, как описано в контрольном примере 12. Каждая точка указывает среднее значение развития окраски методом ELISA,  $n=2$ .

Фигура 54. Также показана hC1q-связывающая активность каждого антитела, имеющего модифицированную Fc-область, как описано в контрольном примере 12. Каждая точка указывает среднее значение развития окраски методом ELISA,  $n=2$ .

20 Описание вариантов осуществления настоящего изобретения

Методы и процедуры, описанные или упомянутые в настоящем описании, как правило, понятны и обычно используются специалистами в данной области, например, широко используемые методологии, описанные в кн.: Sambrook с соавт., «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», 3е изд., 2001, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк; кн.: «Current Protocols in Molecular Biology», под ред. F.M. Ausubel с соавт., ред., 2003; серии «Methods in Enzymology», изд-во Academic Press, Inc: PCR 2: A Practical Approach, под ред. M.J. MacPherson, B.D. Hames, G.R. Taylor, 1995, под ред. Harlow и Lane, 1988, «Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture», под ред. R.I. Freshney, 1987; «Introduction to Cell and Tissue Culture», под ред. J. P. Mather, P.E. Roberts, 1998, изд-во Plenum Press; «Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures», под ред. A. Doyle, J.B. Griffiths, D.G. Newell, 1993-8, изд-во J. Wiley and Sons; «Handbook of Experimental Immunology», под ред. D.M. Weir и C.C. Blackwell; «Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells», под ред. J.M.

25

30

Miller и M.P. Calos, 1987; «PCR: The Polymerase Chain Reaction», под ред. Mullis с соавт., 1994; «Current Protocols in Immunology», под ред. J.E. Coligan с соавт., 1991; «Short Protocols in Molecular Biology», изд-во Wiley and Sons, 1999; «Immunobiology», под ред. С.А. Janeway и P. Travers, 1997; «Antibodies», под ред. P. Finch, 1997; «Antibodies: A Practical Approach», под ред. D. Catty., изд-во IRL Press, 1988-1989; «Monoclonal Antibodies: A Practical Approach», под ред. P. Shepherd и С. Dean, изд-во Oxford University Press, 2000; «Using Antibodies: A Laboratory Manual», под ред. E. Harlow и D. Lane, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); «The Antibodies», под ред. M. Zanetti и J. D. Capra, изд-во Harwood Academic Publishers, 1995; «Cancer: Principles and Practice of Oncology», под ред. V.T. DeVita с соавт., изд-во J.B. Lippincott Company, 1993.

### I. Определения

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

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

В настоящем описании слова «и/или» относятся к каждому из пунктов, написанных до и после употребления слов «и/или», или к любой комбинации

упомянутых пунктов. Например, фраза «А, Б и/или В» включает в себя отдельные элементы «А», «Б» и «В» и любую комбинацию, выбранную из «А и Б», «А и В», «Б» и «В» и «А, Б и В».

«Аминокислотная последовательность человеческого иммуноглобулина» для целей настоящего документа представляет собой рамку считывания, содержащий аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи (VL) или переменного домена тяжелой цепи (VH), полученного из исходной последовательности иммуноглобулина человека или измененной последовательности иммуноглобулина человека, как определено ниже.

Последовательность рекомбинантного человеческого иммуноглобулина, на основе рамки считывания исходной последовательности иммуноглобулина человека или измененной рамки считывания нуклеотидной последовательности, может содержать ту же аминокислотную последовательность, что и она, или она может содержать изменения в аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество аминокислотных замен составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее или 2 или менее. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рамка считывания аминокислотной последовательности VL человека идентична по последовательности рамке считывания исходной последовательности иммуноглобулина VL человека или измененной рамке считывания аминокислотной последовательности иммуноглобулина человека.

«Антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или «ADCC – Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity» относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый иммуноглобулин, связанный с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (например, клетках НК, нейтрофилах и макрофагах), активирует эти цитотоксические эффекторские клетки специфически связываться с клеткой-мишенью, несущей антиген, и впоследствии убивают клетку-мишень цитотоксинами. Первичные клетки для опосредования ADCC, клетки НК, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на кровяных клетках представлена в табл. 3 на стр. 464 в публикации Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 1991, 9:457-492. Для оценки активности ADCC исследуемой молекулы можно провести анализ ADCC

*in vitro*, например, согласно описанию в US 5500362, US 5821337 или в US 6737056 (Presta). Полезные эффекторныe клетки для таких анализов включают клетки МКПК и НК. Альтернативно или дополнительно активность ADCC исследуемой молекулы может быть оценена *in vivo*, например, на животной модели, такой как модель, описанная в статье Clynes с соавт., *PNAS (USA)*, 1998, 95:652-656.

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

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

Термин «антитело-зависимый клеточный фагоцитоз» или «ADCP – antibody-dependent cellular phagocytosis» означает процесс, при котором либо вся клетка, либо ее часть, покрытая антителом, поглощается фагоцитирующими

иммунными клетками (например, макрофагами, нейтрофилами и дендритными клетками), которые связываются с Fc-областью иммуноглобулина.

Термины «связывающая активность» и «связывающая способность» в настоящем описании используют здесь взаимозаменяемо, и они относятся к силе  
5 суммы нековалентных взаимодействий между одним или несколькими сайтами связывания (например, вариабельной области или Fc-области) молекулы (например, антитела или другого полипептида) и его партнера по связыванию (например, антигена или рецептора Fcγ). В настоящем описании «активность связывания» не ограничивается строго взаимодействием 1:1 между членами  
10 связывающей пары (например, антителом и антигеном или областью Fc и рецептором Fcγ). Например, когда члены связывающейся пары отражают моновалентное взаимодействие 1:1, активность связывания относится к внутренней аффинности связывания («аффинности»). Когда член связывающейся пары способен как к моновалентному, так и к поливалентному  
15 связыванию, активность связывания представляет собой сумму сил каждого связывания. Связывающая активность молекулы X с ее партнером Y обычно может быть представлена константой диссоциации ( $K_D$ ) или «количеством связывания исследуемого соединения на единицу количества лиганда». Связывающая активность может быть измерена обычными способами,  
20 известными в данной области, включая описанные в настоящем изобретении. Конкретные примеры в виде иллюстрации вариантов осуществления измерения связывающей активности описаны ниже.

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

Термины «анти-CTLA-4-антитело» и «антитело, которое связывается с CTLA-4» относятся к антителу, которое способно связывать CTLA-4 с  
30 достаточной аффинностью, так что это антитело можно использовать в качестве диагностического и/или терапевтического средства для нацеливания на CTLA-4. В одном варианте осуществления настоящего изобретения степень связывания анти-CTLA-4 антитела с неродственным белком, не относящимся к CTLA-4, составляет менее примерно 10% от связывания антитела с CTLA-4, что



измерено, например, с помощью радиоиммуноанализа (РИА). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело, которое связывается с CTLA-4, имеет константу диссоциации ( $K_D$ ) 1 мкМ или менее, 100 нМ или менее, 10 нМ или менее, 1 нМ или менее, 0,1 нМ или менее, 0,01 нМ или менее, или 0,001 нМ или менее (например,  $10^{-8}$  М или менее, например, от  $10^{-8}$  М до  $10^{-13}$  М, например, от  $10^{-9}$  М до  $10^{-13}$  М). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитело связывается с эпитопом CTLA-4, который является консервативным среди CTLA-4 разных видов.

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

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

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

Понятие «аутоиммунное заболевание» относится к незлокачественному  
30 заболеванию или расстройству, возникающему из собственных тканей человека и направленному против них. Аутоиммунные заболевания в настоящем изобретении специально исключают злокачественные или раковые заболевания или состояния, особенно В-клеточную лимфому, острый лимфобластный лейкоз (ALL – acute lymphoblastic leukemia), хронический лимфолейкоз (CLL – chronic

lymphocytic leukemia), волосатоклеточный лейкоз и хронический миелобластный лейкоз. Примеры аутоиммунных заболеваний или нарушений включают, но ими перечень не ограничивается, воспалительные реакции, такие как воспалительные заболевания кожи, включая псориаз и дерматит (например, атопический дерматит); системную склеродермию и склероз; ответы, связанные с воспалительным заболеванием кишечника (такие как болезнь Крона и язвенный колит); респираторный дистресс-синдром (включая респираторный дистресс-синдром взрослых; ОПДС (ARDS) – adult respiratory distress syndrome); дерматит; менингит; энцефалит; увеит; колит; гломерулонефрит; аллергические состояния, такие как экзема и астма, и другие состояния, включающие инфильтрацию Т-клеток и хронические воспалительные реакции; атеросклероз; дефицит адгезии лейкоцитов; ревматоидный артрит; системную красную волчанку (SLE – systemic lupus erythematosus) (включая, но не ограничиваясь ими, волчаночный нефрит, кожную волчанку); сахарный диабет (например, сахарный диабет I типа или инсулинозависимый сахарный диабет); рассеянный склероз; синдром Рейно; аутоиммунный тиреоидит; тиреоидит Хашимото; аллергический энцефаломиелит; Синдром Шегрена; юношеский диабет; и иммунные реакции, связанные с острой и замедленной гиперчувствительностью, опосредованной цитокинами и Т-лимфоцитами, обычно обнаруживаемой при туберкулезе, саркоидозе, полимиозите, гранулематозе и васкулите; пернициозную анемию (болезнь Аддисона); заболевания, сопровождающиеся лейкоцитарным диapedезом; воспалительное заболевание центральной нервной системы (ЦНС); синдром полиорганного поражения; гемолитическая анемия (включая, но ими не ограничиваясь, криоглобулинемию или анемию с положительной реакцией Кумбса); тяжелую миастению; заболевания, опосредованные комплексом антиген-антитело; заболевание базальной мембраны клубочков; антифосфолипидный синдром; аллергический неврит; Болезнь Грейвса; миастенический синдром Ламберта-Итона; буллезный пемфигоид; пузырчатку; аутоиммунные полиэндокринопатии; болезнь Рейтера; синдром мышечной скованности; болезнь Бехчета; гигантоклеточный артериит; иммунокомплексный нефрит; IgA-нефропатия; полинейропатии IgM; иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ITP – immune thrombocytopenic purpura) или аутоиммунную тромбоцитопению.

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

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

Термин «химиотерапевтическое средство» относится к химическому соединению, которое может применяться для лечения рака. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосамид (CYTOXAN (зарегистрированный товарный знак));  
20 алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоккон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метилолмеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилолмеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); дельта-9-  
25 тетрагидроканнабинол (дронабинол, МАРИНОЛ (зарегистрированный товарный знак)); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновая кислота; камптотецин (включая синтетический аналог топотекана (HUSAMTIN (зарегистрированный товарный знак)), СРТ-11 (иринотекан, CAMPTOSAR (зарегистрированный товарный знак)), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин);  
30 бриостатин; каллистатин; СС-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 СВ1-ТМ1); элеутеробин; панкратистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые

иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид мехлорэтамина оксида, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как эндиинового антибиотики (например, калихеамицин, особенно калихеамицин гамма I и калихеамицин омега I (см., например, публикацию Nicolaou с соавт., *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 1994, 33: 183-186)); CDP323, пероральный ингибитор интегрин альфа-4; динемидин, включая динемидин А; эсперамицин; а также неокарзиностаиновый хромофор и родственные хромопротеиновые эндиинового антибиотические хромофоры), аклациномицины, актиномицин, антрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карубицин, карминомицин, карцинофиллин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-оксо-L, доксорубицин (в том числе ADRIAMYCIN (зарегистрированный товарный знак)), морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин, липосомальная инъекция доксорубицина HCl (DOXIL (зарегистрированный товарный знак)), липосомальный доксорубицин TLC D-99 (MYOCET (зарегистрированный товарный знак)), пегилированный липосомальный доксорубицин (CAELYX (зарегистрированный товарный знак) и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пурамицин, келамицин, родорубицин, стрепторубицин, стрептозорубицин, туберцидин, убенимекс, зиностаин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат, гемцитабин (GEMZAR (зарегистрированный товарный знак)), тегафур (UFTORAL (зарегистрированный товарный знак)), капецитабин (XELODA (зарегистрированный товарный знак)), эпотилон и 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон; средства лечения надпочечников, такие как аминоклотеимид, митотан, трилостан; восполнитель

фолиевой кислоты, такой как фолиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидный гликозид; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бесстрабуцил; бисантрен; эдатрексат; дефамин; демеколцин; диазиквон; эльфорнитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; 5 лонидамин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лосоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK (зарегистрированная торговая марка) (фирма JHS Natural Products, Юджин, штат Орегон); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; 10 триазиквон; 2,2',2'-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангидин); уретан; виндезин (ELDISINE (зарегистрированная торговая марка), FILDESIN (зарегистрированная торговая марка)); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ара-С»); тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел 15 (TAXOL (зарегистрированная торговая марка)), состав наночастиц паклитаксела, созданный с помощью альбумина (ABRAXANE™), и доцетаксел (TAXOTERE (зарегистрированная торговая марка)); хлорамбуцил; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; агенты платины, такие как цисплатин, оксалиплатин (например, ELOXATIN (зарегистрированный товарный знак)) и 20 карбоплатин; алкалоиды барвинка, которые препятствуют полимеризации тубулина с образованием микротрубочек, включая винбластин (VELBAN (зарегистрированный товарный знак)), винкрестин (ONCOVIN (зарегистрированный товарный знак)), виндезин (ELDISINE (зарегистрированный товарный знак), FILDESIN (зарегистрированный товарный знак)) и винорелбин (NAVELBINE (зарегистрированный товарный знак)); 25 этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; лейковорин; новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота, включая бексаротен (TARGRETIN (зарегистрированный товарный знак)); бисфосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS (зарегистрированный товарный знак) или OSTAC (зарегистрированный 30 товарный знак)), этидронат (DIDROCAL (зарегистрированный товарный знак)), NE-58095, золедроновая кислота/золедронат (ZOMETA (зарегистрированный товарный знак)), алендронат (FOSAMAX (зарегистрированный товарный знак)).

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

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

Понятие «класс» антитела относится к типу константного домена или константной области, которой обладает его тяжелая цепь. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые  
5 соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ , соответственно.

В настоящем изобретении термин «цитотоксический агент» относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает клеточную функцию и/или  
10 вызывает гибель или разрушение клеток. Цитотоксические агенты включают, но ими перечень не ограничивается, 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 лекарства (например, метотрексат, адриамицин, алкалоиды барвинка (винкрестин, винбластин, этопозид),  
15 доксорубицин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, даунорубицин или другие интеркалирующие агенты); ингибирующие рост агенты; ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты; антибиотики; токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения,  
20 включая их фрагменты и/или варианты; и различные химиотерапевтические агенты, описанные выше.

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

Понятие «эффекторные функции» относится к биологической активности, которая приписывается Fc-области антитела и зависит от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антител включают: связывание C1q и

комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC); связывание рецептора Fc; антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); антитело-зависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP); понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток); и активация В-клеток.

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

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



которые будут идентифицированы в будущем, относятся к термину «FcR» по настоящему изобретению.

5 Термин «Fc-рецептор» или «FcR» также включает неонатальный рецептор FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG к плоду (Guyer с соавт., *J. Immunol.* 1976, 117: 587; Kim с соавт., *J. Immunol.* 1994, 24: 249) и регуляцию гомеостаза иммуноглобулинов. Известны методы измерения связывания с FcRn (см., например, Ghetie и Ward., *Immunol. Today* 1997, 18(12): 592-598; Ghetie с соавт., *Nature Biotechnology*, 1997, 15(7): 637-640; Hinton с соавт., *J. Biol. Chem.* 2004, 279(8):6213-6216; WO 2004/92219 (Hinton с соавт.)).

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

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

30 Термин «антитело, содержащее Fc-область» относится к антителу, содержащему Fc-область. C-концевой лизин (остаток 447 в соответствии с системой нумерации EU) или C-концевой глицин-лизин (остатки 446-447) Fc-области можно удалить, например, во время очистки антитела или путем рекомбинантной инженерии нуклеиновой кислоты, кодирующее антитело.

Соответственно, композиция, содержащая антитело, имеющее Fc-области по настоящему изобретению, может содержать антитело с G446-K447, с G446 и без K447, с удаленными всеми G446-K447, или смесь трех типов антител, описанных выше.

5 Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL, соответственно) нативного антитела обычно имеют сходную структуру, при этом каждый домен включает четыре консервативных участка рамки считывания  
10 последовательности (FR) и три гипервариабельных участка (HVR) (см., например, Kindt с соавт., *Kuby Immunology*, 6е изд., 2007, изд-во WH Freeman and Co., стр. 91). Одного домена VH или VL может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, могут быть выделены с использованием домена VH или VL  
15 из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов VL или VH, соответственно. См., например, Portolano с соавт., *J. Immunol.* 1993, 150: 880-887; Clarkson с соавт., *Nature* 1991, 352: 624-628.

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

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

«Функциональная Fc-область» обладает «эффektorной функцией» Fc-области с нативной последовательностью. Примеры «эффektorных функций» включают связывание C1q; CDC; связывание рецептора Fc; ADCC; фагоцитоз; понижающаяся регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, B-

клеточного рецептора; BCR) и т.д. Такие эффекторные функции обычно требуют объединения Fc-области со связывающим доменом (например, переменным доменом антитела) и могут быть оценены с использованием различных анализов, как описано, например, в определениях, приведенных в настоящем описании.

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

«Изменённая аминокислотная последовательность человеческого иммуноглобулина» представляет собой последовательность, в которой наиболее  
15 часто встречающиеся аминокислотные остатки в рамке считывания VL или VH иммуноглобулина человека. Как правило, выбор последовательностей VL или VH иммуноглобулина человека осуществляют из подгруппы последовательностей переменных доменов. Как правило, подгруппа последовательностей является такой подгруппой, как описанная в кн.: Kabat с соавт., «*Sequences of Proteins of Immunological Interest*», т. 1-3, 5е изд., изд-во  
20 NIH Publication 91-3242, 1991, Бетесда, Мэриленд. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения для VL подгруппа представляет собой подгруппу kI, как в публикации Kabat с соавт., см. выше. В одном варианте осуществления для VH подгруппа представляет собой подгруппу III, как в  
25 публикации Kabat с соавт., см. выше.

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

происходящую от антитела человека. «Гуманизированная форма» антитела, например, антитело, происходящее не от человека, относится к антителу, подвергнутому гуманизации.

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

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

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

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

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

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

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

«Выделенное» антитело представляет собой антитело, которое было отделено от компонентов его естественной среды. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело очищают до чистоты более 95% или 99%, что определяется, например, методом электрофореза (например,

SDS-PAGE, изоэлектрическим фокусированием (IEF), капиллярным электрофорезом) или хроматографией (например, ионообменным или обращенно-фазовым ВЭЖХ). Обзор методов оценки чистоты антител см., например, Flatman с соавт., *J. Chromatogr. B*, 2007, 848: 79-87.

5 «Выделенная» нуклеиновая кислота относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была отделена от компонентов ее естественного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно содержат молекулы нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты присутствует внехромосомно или в 10 хромосомном расположении, которое отличается от его естественного хромосомного местоположения.

«Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело» относится к одной или более молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим тяжелую и легкую цепи антитела (или их фрагменты), включая такую молекулу (молекулы) 15 нуклеиновой кислоты в одном векторе или отдельных векторах, и такая молекула нуклеиновой кислоты (кислот) присутствует в одном или более местах в клетке-хозяине.

В настоящем описании «первый полипептид» и «второй полипептид» означают полипептиды, составляющие Fc-область антитела. Термины «первый 20 полипептид» и «второй полипептид» означают, что их последовательности отличаются друг от друга, и предпочтительно, чтобы по меньшей мере последовательности домена CH2 были разными. Кроме того, последовательности домена CH3 также могут быть разными. Полипептиды могут быть, например, полипептидами, которые составляют Fc-область 25 встречающегося в природе (нативного) IgG, или полипептидами, полученными путем изменения полипептидов, составляющих Fc-область встречающегося в природе (нативного) IgG.

«Нативные IgG» относятся к полипептидам, которые принадлежат к классу антител, практически кодируемых генами иммуноглобулина гамма, и содержат 30 аминокислотную последовательность, идентичную последовательности IgG, обнаруженной в природе. Например, нативный человеческий IgG относится к нативному человеческому IgG1, нативному человеческому IgG2, нативному человеческому IgG3, нативному человеческому IgG4 и т.п. К нативным IgG относятся также полученные из них спонтанные мутанты.

В настоящем изобретении понятие «полипептиды» обычно относится к пептидам или белкам длиной примерно десять аминокислот или более. Кроме того, они, как правило, представляют собой полипептиды, полученные из организмов, но конкретно не ограничены, и, например, они могут представлять собой полипептиды, содержащие искусственно созданную последовательность. Кроме того, они могут представлять собой любые природные полипептиды, синтетические полипептиды, рекомбинантные полипептиды и т.п. Молекулы белка по настоящему изобретению относятся к молекулам, содержащим полипептид.

Предпочтительные примеры полипептидов настоящего изобретения включают антитела. Более предпочтительные примеры включают нативные IgG и антитела, полученные в результате модификации, введенной в нативные IgG. Примеры нативных IgG включают, в частности, нативные человеческие IgG. «Нативные IgG» относятся к полипептидам, принадлежащим к классу антител, практически кодируемых генами иммуноглобулина гамма, и содержащим аминокислотную последовательность, идентичную последовательностям IgG, обнаруженных в природе. Например, нативный человеческий IgG означает нативный человеческий IgG1, нативный человеческий IgG2, нативный человеческий IgG3, нативный человеческий IgG4 и т.п. К нативным IgG относятся также мутанты, спонтанно полученные из них.

Термин «полипептид, содержащий область Fc» конкретно не ограничен, при условии, что это полипептид, который содержит Fc-область. Например, это антитело, которое содержит Fc-область. С-концевой лизин (остаток 447 по системе EU-нумерации) или С-концевой глицин-лизин (остатки 446-447) Fc-области можно удалить, например, во время очистки полипептида (например, антитела) или путем конструирования с помощью рекомбинации нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Соответственно, композиция, содержащая полипептид, включающий Fc-область по настоящему изобретению, может содержать полипептид, включающий Fc-область с G446-K447, полипептид, содержащий Fc-область с G446 и без K447, полипептид, содержащий Fc-область с удаленными G446-K447, или смесь трех типов полипептидов, описанных выше.

«Выделенный» полипептид представляет собой полипептид, отделенный от компонентов его естественного окружения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полипептид очищают до чистоты более

95% или 99%, что определяют, например, электрофорезом (например, SDS-PAGE, изоэлектрофокусированием (IEF), капиллярным электрофорезом) или хроматографически (например, ионообменным или обратнофазовой ВЭЖХ). Обзор методов оценки чистоты полипептидов см., например, Flatman с соавт., *J. Chromatogr.* 2007, 848: 79-87.

5  
10  
15  
20  
25  
30

Понятие «выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид», относится к одной или нескольким молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим полипептид (например, Fc-область антитела, или тяжелые и легкие цепи антитела, или их фрагменты), включая такую молекулу (молекулы) нуклеиновой кислоты в одном векторе или отдельных векторах, и такая молекула (молекулы) нуклеиновой кислоты присутствует в одном или нескольких местах в клетке-хозяине.

15  
20  
25  
30

Термин «вектор», используемый в настоящем изобретении, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к увеличению копий другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Термин включает вектор как самовоспроизводящуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Некоторые векторы способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются здесь «векторами экспрессии». Векторы можно вводить в клетки-хозяева методами с использованием вируса или методами электропорации. Введение векторов не ограничивается введением *ex vivo*, также можно вводить векторы непосредственно *in vivo*.

25  
30

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

Термин «моноклональное антитело», используемый в настоящем изобретении, относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны и/или связывают один и тот же эпитоп, за исключением возможных 5 вариантных антител, например, содержащих природные мутации или возникающие во время получения препарата моноклонального антитела, причем такие варианты обычно присутствуют в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое 10 моноклональное антитело в препарате моноклональных антител направлено против одной детерминанты антигена. Таким образом, модификатор «моноклональный» указывает на то, что антитело получено из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует толковать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, 15 моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены различными методами, включая, помимо прочего, гибридомный метод, методы рекомбинантной ДНК, методы фагового дисплея и методы с использованием трансгенных животных, содержащих полностью или частично локусы иммуноглобулинов человека, такие способы и 20 другие иллюстративные способы получения моноклональных антител описаны в настоящем изобретении.

Понятие «голое антитело» относится к антителу, которое не конъюгировано с гетерологичным фрагментом (например, цитотоксическим фрагментом) или радиоактивной меткой. Голое антитело может присутствовать в 25 фармацевтическом составе.

Понятие «нативные антитела» относится к встречающимся в природе молекулам иммуноглобулина с различной структурой. Например, нативные антитела IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины массой около 150 000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких цепей и двух 30 идентичных тяжелых цепей, связанных дисульфидной связью. От N- до C-конца каждая тяжелая цепь имеет переменную область (VH), также называемую переменным доменом тяжелой цепи или переменным доменом тяжелой цепи, за которой следуют три константных домена (CH1, CH2 и CH3). Аналогично, от N-конца к C-концу каждая легкая цепь имеет переменную область (VL), также



называемую переменным доменом легкой цепи, за которой следует константный домен легкой цепи (CL). Легкая цепь антитела может быть отнесена к одному из двух типов, называемых каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ), на основании аминокислотной последовательности их константного домена.

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

          «Вариант Fc-области» содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности Fc-области от нативной последовательности в силу по меньшей мере одной модификации (изменения) аминокислотной последовательности, предпочтительно одной или более аминокислотных замен. Предпочтительно, вариант Fc-области имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с Fc-областью с нативной последовательностью или исходной Fc-областью, например, от примерно 1 до примерно 30 аминокислотных замен, предпочтительно от примерно 1 до примерно 20 аминокислотных замен, более предпочтительно от примерно 1 до примерно 10 аминокислотных замен и наиболее предпочтительно от примерно 1 до примерно 5 аминокислотных замен в Fc-области нативной последовательности или в исходной Fc-области. Вариант Fc-области согласно настоящему изобретению предпочтительно обладает по меньшей мере приблизительно 80% гомологией с Fc-областью нативной последовательности и/или с Fc-областью исходного полипептида, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% гомологией с ними и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95% гомологией.

30           Понятие «процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» по отношению к эталонной последовательности полипептида определяют как процентная доля аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения

пробелов, если это необходимо, для достижения максимальной процентной идентичности последовательности и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание с целью определения процентной идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, известными специалистам в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN, Megalign (DNASTAR) или GENETYX (зарегистрированная торговая марка) (фирма Genetyx Co., Ltd.). Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

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

В ситуациях, когда ALIGN-2 используют для сравнения аминокислотных последовательностей, процента идентичности аминокислотной последовательности данной аминокислотной последовательности А относительно данной аминокислотной последовательности В (которая может быть альтернативно выражена как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или содержит определенный процент идентичности аминокислотной последовательности с данной аминокислотной последовательностью В, или против нее), рассчитывают следующим образом:

$$100\text{-кратная фракция } X/Y$$

где X означает количество аминокислотных остатков, признанных идентичными с помощью программы выравнивания последовательностей ALIGN-2 при

выравнивании A и B этой программой, и где Y – общее количество аминокислотных остатков в B. Следует учитывать, что если длина аминокислотной последовательности A не равна длине аминокислотной последовательности B, то процент идентичности аминокислотных последовательностей A и B не будет равен проценту идентичности аминокислотных последовательностей B и A. Если специально не указано иное, все проценты значений идентичности аминокислотной последовательности, используемые в настоящем изобретении, получают, как описано в предыдущем абзаце, с использованием компьютерной программы ALIGN-2.

10 Термины «фармацевтический состав» и «фармацевтическая композиция» используют взаимозаменяемо, и они относятся к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает эффективную биологическую активность содержащегося в нем активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, являющихся неприемлемо токсичными для субъекта, которому он может быть назначен.

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

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

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

Термин «вкладыш в упаковку» используют для обозначения инструкций, обычно включаемых в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении,

комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях относительно использования таких терапевтических продуктов.

Термин «CTLA-4», используемый в настоящем изобретении, относится к любому нативному CTLA-4 от любого позвоночного животного, включая 5 млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. Термин охватывает «полноразмерный» непротессированный CTLA-4, а также любую форму CTLA-4, полученную в результате процессинга в клетке. Термин также охватывает встречающиеся в 10 природе варианты CTLA-4, например, сплайс-варианты или аллельные варианты. Аминокислотная последовательность типичного CTLA-4 человека представлена в SEQ ID NO: 214, аминокислотная последовательность CTLA-4 мыши представлена в SEQ ID NO: 247, аминокислотная последовательность CTLA-4 обезьяны представлена в SEQ ID NO: 248, и аминокислотная 15 последовательность внеклеточного домена CTLA-4 человека представлена в SEQ ID NO: 28. В настоящем изобретении CTLA-4 также может быть обозначен как CTLA-4.

Термин «регуляторные Т-клетки (Treg)» относится к субпопуляции Т-клеток, которые регулируют иммунную систему, поддерживают толерантность к аутоантигенам и подавляют аутоиммунные заболевания. Эти клетки обычно 20 подавляют пролиферацию эффекторных Т-клеток. Наиболее изученными клетками Treg являются клетки, экспрессирующие CD4, CD25 и Foxp3 (клетки CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> клетки Treg). Эти клетки Treg отличаются от хелперных Т-клеток. Для идентификации и мониторинга клеток Treg используют несколько различных методов. При определении по экспрессии CD4 и CD25 (клетки CD4<sup>+</sup> 25 CD25<sup>+</sup>) клетки Treg составляют примерно от 5% до примерно 10% субпопуляции зрелых CD4<sup>+</sup> Т-клеток у мышей и людей, в то время как примерно от 1% до примерно 2% Treg можно измерить в цельной крови. Идентификацию и мониторинг можно проводить путем дальнейшего измерения экспрессии Foxp3 (клетки CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>). Кроме того, в качестве другого маркера можно 30 использовать отсутствие или низкий уровень экспрессии CD127 в сочетании с наличием CD4 и CD25. Клетки Treg также экспрессируют высокие уровни CTLA-4 и GITR. Treg также можно идентифицировать способами, описанными в примерах ниже.

Используемый в настоящем изобретении термин «практически сходный», «практически равный» или «практически такой же» относится к достаточно высокой степени сходства между двумя числовыми значениями (например, одно связано с антителом по настоящему изобретению, а другое связанное с  
5 эталонным/сравнительным антителом), так что специалист в данной области может определить разницу между двумя значениями незначительной или не имеющей биологической и/или статистической значимости в контексте биологической характеристики, измеряемой указанными значениями (например, значения KD).

10 Используемый в настоящем изобретении термин «лечение» (и его грамматические вариации, такие как «обработка» и «лечить») относится к клиническому вмешательству в попытке изменить естественное течение заболевания у индивидуума, проходящего лечение, и может проводиться либо для профилактики, либо во время лечения клинической патологии. Желательные  
15 эффекты лечения включают, но не ограничиваются ими, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или облегчение болезненного состояния, ремиссию или  
20 улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению используют для задержки развития заболевания или для замедления прогрессирования заболевания. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полипептиды, содержащие вариант Fc-области настоящего изобретения, используются для задержки развития  
25 заболевания или замедления прогрессирования заболевания.

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

Термин «опухолевая ткань» означает ткань, содержащую по меньшей мере одну опухолевую клетку. Опухолевая ткань обычно состоит из популяции опухолевых клеток, которые образуют основную часть опухоли (паренхиму), и соединительных тканей и кровеносных сосудов, которые существуют между

этими клетками и поддерживают опухоль («строма»). Различие между ними в одних случаях очевидно, а в других они смешиваются. Опухолевые ткани могут быть инфильтрированы иммунными клетками и т.п. С другой стороны, «неопухолевая ткань» означает ткань, отличную от опухолевой (опухолевых) 5 ткани (тканей) в живом организме. Здоровые/нормальные ткани, не находящиеся в болезненном состоянии, являются типичными примерами неопухолевых тканей.

## II. Композиции и методы

Один из объектов настоящего изобретения частично основан на анти- 10 CTLA-4 антителах и их применении. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены антитела, которые связываются с CTLA-4. Антитела по настоящему изобретению применимы, например, для диагностики или лечения рака.

### A. Примеры анти-CTLA-4 антител

В одном из объектов по настоящему изобретению предусматривают 15 выделенные антитела, которые связываются с CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению обладает CTLA-4-связывающей активностью в зависимости от концентрации аденозин-содержащего соединения. В некоторых вариантах 20 осуществления настоящего изобретения связывающаяся с CTLA-4 активность выше в присутствии аденозин-содержащего соединения по сравнению с активностью в отсутствие аденозин-содержащего соединения. В другом варианте осуществления настоящего изобретения активность связывания с CTLA-4 выше в присутствии высокой концентрации аденозин-содержащего 25 соединения по сравнению с таковой в присутствии низкой концентрации аденозин-содержащего соединения. В других вариантах осуществления настоящего изобретения разница в связывающей активности с CTLA-4 отличается, например, в два раза или более, в 3 раза или более, в 5 раз или более, в 10 раз или более, в 20 раз или более, в 30 раз или более, в 50 раз или 30 более, в 100 раз или более, в 200 раз или более, в 300 раз или более, в 500 раз или более, в  $1 \times 10^3$  раз или более, в  $2 \times 10^3$  раз или более, в  $3 \times 10^3$  раз или более, в  $5 \times 10^3$  раз или более, в  $1 \times 10^4$  раза или более, в  $2 \times 10^4$  раза или более, в  $3 \times 10^4$  раза или более, в  $5 \times 10^4$  раза или более или в  $1 \times 10^5$  раз или более.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения связывающая активность анти-CTLA-4 антитела может быть выражена величиной  $K_D$  (константа диссоциации). В другом варианте осуществления настоящего изобретения величина  $K_D$  анти-CTLA-4 антитела в присутствии аденозин-содержащего соединения меньше, чем в отсутствие аденозин-содержащего соединения. В другом варианте осуществления настоящего изобретения значение  $K_D$  анти-CTLA-4 антитела в присутствии высокой концентрации аденозин-содержащего соединения меньше, чем в присутствии низкой концентрации аденозин-содержащего соединения. В другом варианте осуществления настоящего изобретения различие значений  $K_D$  анти-CTLA-4 антитела отличается, например, в два раза или более, 3 в раза или более, в 5 раз или более, в 10 раз или более, в 20 раз или более, в 30 раз или более, в 50 раз или более, в 100 раз или более, в 200 раз или более, в 300 раз или более, в 500 раз или более, в  $1 \times 10^3$  раз или более, в  $2 \times 10^3$  раз или более, в  $3 \times 10^3$  раз или более, в  $5 \times 10^3$  раз или более, в  $1 \times 10^4$  раз или более, в  $2 \times 10^4$  раз или более, в  $3 \times 10^4$  раз или более, в  $5 \times 10^4$  раз или более, или в  $1 \times 10^5$  раз или более. Значения  $K_D$  анти-CTLA-4 антител в присутствии аденозин-содержащего соединения или в присутствии высокой концентрации аденозин-содержащего соединения могут быть, например,  $9 \times 10^{-7}$  М или менее,  $8 \times 10^{-7}$  М или менее,  $7 \times 10^{-7}$  М или менее,  $6 \times 10^{-7}$  М или менее,  $5 \times 10^{-7}$  М или менее,  $4 \times 10^{-7}$  М или менее,  $3 \times 10^{-7}$  М или менее,  $2 \times 10^{-7}$  М или менее,  $1 \times 10^{-7}$  М или менее,  $9 \times 10^{-8}$  М или менее,  $8 \times 10^{-8}$  М или менее,  $7 \times 10^{-8}$  М или менее,  $6 \times 10^{-8}$  М или менее,  $5 \times 10^{-8}$  М или менее,  $4 \times 10^{-8}$  М или менее,  $3 \times 10^{-8}$  М или менее,  $2 \times 10^{-8}$  М или менее,  $1 \times 10^{-8}$  М или менее,  $9 \times 10^{-9}$  М или менее,  $8 \times 10^{-9}$  М или менее,  $7 \times 10^{-9}$  М или менее,  $6 \times 10^{-9}$  М или менее,  $5 \times 10^{-9}$  М или менее,  $4 \times 10^{-9}$  М или менее,  $3 \times 10^{-9}$  М или менее,  $2 \times 10^{-9}$  М или менее,  $1 \times 10^{-9}$  М или менее,  $9 \times 10^{-10}$  М или менее,  $8 \times 10^{-10}$  М или менее,  $7 \times 10^{-10}$  М или менее,  $6 \times 10^{-10}$  М или менее,  $5 \times 10^{-10}$  М или менее,  $4 \times 10^{-10}$  М или менее,  $3 \times 10^{-10}$  М или менее,  $2 \times 10^{-10}$  М или менее, или  $1 \times 10^{-10}$  М или менее. Значения  $K_D$  анти-CTLA-4 антител в отсутствие аденозин-содержащего соединения или в присутствии низкой концентрации аденозин-содержащего соединения могут быть, например,  $1 \times 10^{-8}$  М или более,  $2 \times 10^{-8}$  М или более,  $3 \times 10^{-8}$  М или более,  $4 \times 10^{-8}$  М или более,  $5 \times 10^{-8}$  М или более,  $6 \times 10^{-8}$  М или более,  $7 \times 10^{-8}$  М или более,  $8 \times 10^{-8}$  М или более,  $9 \times 10^{-8}$  М или более,  $1 \times 10^{-7}$  М или более,  $2 \times 10^{-7}$  М или более,  $3 \times 10^{-7}$

М или более,  $4 \times 10^{-7}$  М или более,  $5 \times 10^{-7}$  М или более,  $6 \times 10^{-7}$  М или более,  $7 \times 10^{-7}$  М или более,  $8 \times 10^{-7}$  М или более,  $9 \times 10^{-7}$  М или более,  $1 \times 10^{-6}$  М или более,  $2 \times 10^{-6}$  М или более,  $3 \times 10^{-6}$  М или более,  $4 \times 10^{-6}$  М или более,  $5 \times 10^{-6}$  М или более,  $6 \times 10^{-6}$  М или более,  $7 \times 10^{-6}$  М или более,  $8 \times 10^{-6}$  М или более, или  $9 \times 10^{-6}$  М или более.

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

В другом варианте осуществления настоящего изобретения связывающая активность анти-CTLA-4 антитела может быть представлена количеством связывания CTLA-4 на единицу количества антитела. Например, в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса количество связывания антитела, иммобилизованного на сенсорном чипе, и количество связывания антигена, дополнительно связанного с ним, измеряются как резонансная единица (RU – resonance unit). Значение, полученное путем деления количества связывания антигена на количество связывания антитела, может быть определено как количество связывания антигена на единицу количества антитела. Конкретные способы измерения и расчета таких количеств связывания описаны в примерах ниже. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество связывания CTLA-4 в присутствии аденозин-содержащего соединения выше, чем в отсутствие аденозин-содержащего соединения. Альтернативно, в другом варианте осуществления настоящего изобретения количество связывания CTLA-4 в присутствии высокой концентрации аденозин-содержащего соединения выше, чем в присутствии низкой концентрации аденозин-содержащего соединения. В другом варианте осуществления настоящего изобретения различие связывающего количества CTLA-4 отличается, например, в два раза или более, 3 в раза или более, в 5 раз или более, в 10 раз или более, в 20 раз или более, в 30 раз или более, в 50 раз или более, в 100 раз или более, в 200 раз или более, в 300 раз или более, в 500 раз или более, в  $1 \times 10^3$  раз или более, в  $2 \times 10^3$  раз или более, в  $3 \times 10^3$  раз или более, в  $5 \times 10^3$  раз или более, в  $1 \times 10^4$  раз или более, в  $2 \times 10^4$  раз или более, в  $3 \times 10^4$  раз или более, в  $5 \times 10^4$  раз или более, или в  $1 \times 10^5$  раз или более. Величина количества связываемого CTLA-4 в присутствии аденозин-содержащего соединения или в присутствии высокой концентрации аденозин-



содержащего соединения может составлять, например, 0,01 или более, 0,02 или более, 0,03 или более, 0,04 или более, 0,05 или более, 0,06 или более, 0,07 или более, 0,08 или более, 0,09 или более, 0,1 или более, 0,2 или более, 0,3 или более, 0,4 или более, 0,5 или более, 0,6 или более, 0,7 или более, 0,8 или более, 0,9 или более или 1 или более. Величина количества связываемого CTLA-4 в отсутствие аденозин-содержащего соединения или в присутствии низкой концентрации аденозин-содержащего соединения может составлять, например, 0,5 или менее, 0,4 или менее, 0,3 или менее, 0,2 или менее, 0,1 или менее, 0,09 или менее, 0,08 или менее, 0,07 или менее, 0,06 или менее, 0,05 или менее, 0,04 или менее, 0,03 или менее, 0,02 или менее, 0,01 или менее, 0,009 или менее, 0,008 или менее, 0,007 или менее, 0,006 или менее, 0,005 или менее, 0,004 или менее, 0,003 или менее, 0,002 или менее или 0,001 или менее.

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

Любая концентрация аденозин-содержащего соединения может быть выбрана при условии, что обнаруживается различие в активности связывания анти-CTLA-4 антитела. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения высокая концентрация может включать, например, 1 нМ или более 1 нМ, 3 нМ или более 3 нМ, 10 нМ или более 10 нМ, 30 нМ или более 30 нМ, 100 нМ или более 100 нМ. нМ, 300 нМ или более 300 нМ, 1 мкМ или более 1 мкМ, 3 мкМ или более 3 мкМ, 10 мкМ или более 10 мкМ, 30 мкМ или более 30 мкМ, 100 мкМ или более 100 мкМ, 300 мкМ или более 300 мкМ, 1 мМ или более 1 мМ, 3 мМ или более 3 мМ, 10 мМ или более 10 мМ, 30 мМ или более 30 мМ, 100 мМ или более 100 мМ, 300 мМ или выше 300 мМ и 1 М или выше 1 М. В другом варианте высокая концентрация в настоящем изобретении может быть достаточным количеством, при котором соответствующее анти-CTLA-4 антитело проявляет максимальную связывающую активность. В одном варианте осуществления настоящего изобретения в качестве высокой концентрации могут быть выбраны 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ или достаточное количество, при котором соответствующее анти-CTLA-4-антитело проявляет максимальную связывающую активность. В некоторых вариантах осуществления настоящего

изобретения низкая концентрация может включать, например, 1 мМ или менее 1 мМ, 300 мкМ или менее 300 мкМ, 100 мкМ или менее 100 мкМ, 30 мкМ или менее 30 мкМ, 10 мкМ или менее 10 мкМ. мкМ, 3 мкМ или менее 3 мкМ, 1 мкМ или менее 1 мкМ, 300 нМ или менее 300 нМ, 100 нМ или менее 100 нМ, 30 нМ или менее 30 нМ, 10 нМ или менее 10 нМ, 3 нМ или ниже 3 нМ, 1 нМ или ниже 1 нМ, 300 пМ или ниже 300 пМ, 100 пМ или ниже 100 пМ, 30 пМ или ниже 30 пМ, 10 пМ или ниже 10 пМ, 3 пМ или ниже 3 пМ и 1 пМ или ниже 1 пМ. В другом варианте низкая концентрация может представлять собой концентрацию, при которой соответствующее анти-CTLA-4 антитело проявляет минимальную связывающую активность. Случай, когда существенная концентрация равна нулю (в отсутствие аденозин-содержащего соединения), также может быть выбран как вариант осуществления низкой концентрации. В одном варианте осуществления в качестве более низкой концентрации здесь может быть выбрана концентрация 1 мМ, 100 мкМ, 10 мкМ, 1 мкМ, при которой соответствующее анти-CTLA-4 антитело проявляет минимальную связывающую активность, или отсутствие соединения аденозина. В другом варианте осуществления настоящего изобретения в качестве отношения высокой концентрации к низкой концентрации могут быть выбраны следующие значения: например, в 3 раза или более, в 10 раз или более, в 30 раз или более, в 100 раз или более, в 300 раз или более,  $1 \times 10^3$  раз или более,  $3 \times 10^3$  раз или более,  $1 \times 10^4$  раз или более,  $3 \times 10^4$  раз или более,  $1 \times 10^5$  раз или более,  $3 \times 10^5$  раз или более,  $1 \times 10^6$  раз или более,  $3 \times 10^6$  раз или более,  $1 \times 10^7$  раз или более,  $3 \times 10^7$  раз или более,  $1 \times 10^8$  раз или более,  $3 \times 10^8$  раз или более,  $1 \times 10^9$  раз или более,  $3 \times 10^9$  раз или более,  $1 \times 10^{10}$  раз или более,  $3 \times 10^{10}$  раз или более,  $1 \times 10^{11}$  раз или более,  $3 \times 10^{11}$  раз или более или  $1 \times 10^{12}$  раз или более.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению обладают активностью связывания также с аденозинсодержащими соединениями. Количество связывания аденозинсодержащего соединения на единицу количества изобретения анти-CTLA-4 антитела можно рассчитать с использованием вышеупомянутого метода и использовать в качестве активности связывания антитела с аденозинсодержащим соединением. Конкретные методы измерения и расчета таких количеств связывания описаны в примерах ниже. Значение связывающего количества аденозин-содержащего соединения на единицу количества анти-

CTLA-4 антитела по настоящему изобретению может составлять, например, 0,0001 или более, 0,0002 или более, 0,0003 или более, 0,0004 или более, 0,0005 или более, 0,0006 или более, 0,0007 или более, 0,0008 или более, 0,0009 или более, 0,001 или более, 0,002 или более, 0,003 или более, 0,004 или более, 0,005 или более, 0,006 или более, 0,007 или более, 0,008 или более, 0,009 или более, или 0,01 или более.

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

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

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

30 В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению проявляют цитотоксическую активность в отношении клеток, экспрессирующих CTLA-4. Когда CTLA-4 экспрессируется на поверхности клетки-мишени и с ней связывается анти-CTLA-4 антитело, клетка может быть повреждена. Повреждение клетки может быть вызвано

эффекторными клетками, связанными с антителом, например активностью антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и активностью антитело-зависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), или оно может быть вызвано комплементами, связанными с антителом, такими как комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC). В другом варианте повреждение может быть вызвано цитотоксическим агентом (например, радиоизотопным или химиотерапевтическим агентом), конъюгированным с антителом, таким как иммуноконъюгат. Цитотоксичность в настоящем изобретении может включать эффекты индукции гибели клеток, подавления клеточной пролиферации и нарушения клеточных функций. Когда анти-CTLA-4 антитело присутствует в достаточном количестве, оно может вызвать повреждение, например, 10 % или более, 15% или более, 20% или более, 25% или более, 30% или более, 35% или более, 40% или более, 45% более или, 50% или более, 55% или более, 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, или 95% или более клеток, экспрессирующих CTLA-4. Измерение такой цитотоксической активности можно проводить, сравнивая ее с измерением в отсутствие антитела или в присутствии антитела отрицательного контроля. В настоящем описании приводятся примеры анализов цитотоксичности.

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

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

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аденозинсодержащие соединения по настоящему изобретению могут включать, например, аденозин (АДО), аденозинтрифосфат (АТФ), аденозиндифосфат (АДФ), аденозинмонофосфат (АМФ), циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), дезоксиаденозин (дАДО), дезоксиаденозин трифосфат (dATP), дезоксиаденозиндифосфат (dADP), дезоксиаденозинмонофосфат (dAMP) и аденозин ( $\gamma$ -тио) трифосфат (ATP $\gamma$ S).

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

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

последовательности VL HVR, выбранные из (а) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 226; (б) HVR-L2 содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227; и (в) HVR-L3 содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит (а) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 226; (б) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227; и (в) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228.

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

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

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

настоящего изобретения антитело содержит (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101; и (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

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

15 В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее (а) домен VH, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере все три последовательности VH HVR, выбранные из (i) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, (ii) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101,  
20 и (iii) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и (б) домен VL, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере все три VL HVR, выбранные из (i) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113, (ii) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114, и (iii) HVR-L3,  
25 содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115.

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



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

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

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

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

SEQ ID NO: 100; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104; (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; (г) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116; (д) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (е) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 115.

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

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

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

домен VL, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (i) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122, (ii) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, и (iii) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее последовательности: (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112; (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; (г) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128; (д) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (е) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 133.

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

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111; и (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело включает (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111; и (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152.

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

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

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее последовательности (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111; (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152; (г) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128; (д) HVR-L2, содержащую аминокислотную

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

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

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

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее (а) домен VH, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (i) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107, (ii) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112, и (iii) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и (б) домен VL, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (i) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129, (ii) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.



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

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

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

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

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

5 содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело, включающее (а) домен HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111; (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную

10 последовательность SEQ ID NO: 152; (г) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129; (д) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (е) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают антитело,

15 включающее (а) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109; (в) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело содержит (а) HVR-H1, содержащий

20 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (б) HVR-H2 содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109; и (в) HVR-H3 содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

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

25 последовательности VL HVR, выбранные из (а) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130; (б) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело содержит (а) HVR-

30 L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130; (б) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117; и (в) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

В другом объекте настоящего изобретения антитело содержит (а) домен VH, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три

последовательности VH HVR, выбранные из (i) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107, (ii) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109, и (iii) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и (б) домен VL, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (i) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, (ii) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117 и (iii) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

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

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

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

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

- в HVR-H1 (SEQ ID NO: 100): H2A, R или K
- в HVR-H2 (SEQ ID NO: 101): S4T; R5Q; G7H; D13E или R; K16R
- в HVR-H3 (SEQ ID NO: 102): K3A

- в HVR-L1 (SEQ ID NO: 113): T1D, Q или E; T3P; D6G; N11T; Y12W; S14H
- в HVR-L2 (SEQ ID NO: 114): E1F или Y; S3I; K4S; S7E или K
- в HVR-L3 (SEQ ID NO: 115): S1Q; M10T

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

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

В другом объекте настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитело содержит  
переменный домен тяжелой цепи (VH), которая по меньшей мере на 90%, 91%,  
92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность VH по меньшей мере при идентичности 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% содержит замещения (например, консервативные замещения), инсерции или делеции относительно эталонной последовательности, но анти-CTLA-4 антитело, включающее такую последовательность, сохраняет способность связываться с CTLA-4. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения в совокупности от 1 до 10 аминокислот, до 11, до 12, до 13, до 14 или до 15 аминокислот заменены, инсертированы и/или делетированы в SEQ ID NO: 10. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения замещения, инсерции или делеции находятся вне HVR (т.е. в FR). Необязательно анти-CTLA-4 антитело содержит последовательность VH в SEQ ID NO: 10, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения VH содержит одну, две или три области HVR, выбранные из: (а) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, (б) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и (в) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102. Посттрансляционные модификации включают, но не ограничиваются ими, модификацию глутамина или глутамата на N-конце тяжелой или легкой цепи в пироглутаминовую кислоту путем пироглутаминирования.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают анти-CTLA-4 антитело, которое содержит переменный домен легкой цепи (VL), последовательность которого по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность VL, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична, содержит замены (например, консервативные замещения), инсерции или делеции относительно эталонной последовательности, но анти-CTLA-4 антитело, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с CTLA-4. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения в совокупности от 1 до 10 аминокислот, до 11, до 12, до 13, до 14 или до 15 аминокислот заменены, инсертированы и/или делетированы в SEQ ID NO: 11. В

определенных вариантах осуществления настоящего изобретения замещения, инсерции или делеции находятся вне HVR (т.е. в FR). Необязательно анти-CTLA-4 антитело содержит последовательность VL в SEQ ID NO: 11, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения VL содержит одну, две или три области HVR, выбранные из (а) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113; (б) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114; и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115. Посттрансляционные модификации включают, но не ограничиваются ими, модификацию глутамина или глутамата на N-конце тяжелой или легкой цепи в пироглутаминовую кислоту путем пироглутаминирования.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают анти-CTLA-4 антитело, которое содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), последовательность которого по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 149. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения VL, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична, содержит замены (например, консервативные замещения), инсерции или делеции относительно эталонной последовательности, но анти-CTLA-4 антитело, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с CTLA-4. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения в совокупности от 1 до 10 аминокислот, до 11, до 12, до 13, до 14 или до 15 аминокислот заменены, инсертированы и/или делетированы в SEQ ID NO: 149. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения замещения, инсерции или делеции находятся вне HVR (т.е. в FR). Необязательно анти-CTLA-4 антитело содержит последовательности VL в SEQ ID NO: 149, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения VL содержит одну, две или три области HVR, выбранные из: (а) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, (б) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, и (в) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133. Посттрансляционные

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

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают анти-CTLA-4 антитело, которое содержит VH, как в любом из вариантов осуществления настоящего изобретения, представленных выше, и VL, как в любом из вариантов осуществления настоящего изобретения, представленных выше. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 83 и SEQ ID NO: 88, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 83 и SEQ ID NO: 89, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 83 и SEQ ID NO: 90, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 83 и SEQ ID NO: 91, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 83 и SEQ ID NO: 92, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 83 и SEQ ID NO: 93, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 83 и SEQ ID NO: 94, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном







содержит по меньшей мере две разные переменные области, выбранные из переменных областей, содержащих последовательности VH и VL, представленные выше. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 140 и SEQ ID NO: 146, соответственно, и последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 141 и SEQ ID NO: 146, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 140 и SEQ ID NO: 147, соответственно, и последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 141 и SEQ ID NO: 147, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. Посттрансляционные модификации включают, но не ограничиваются ими, модификацию глутамина или глутамата на N-конце тяжелой или легкой цепи в пироглутаминовую кислоту путем пироглутаминирования.

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

20 В качестве другого объекта по настоящему изобретению предусматривают антитело, включающее такой же эпитоп, что и у анти-CTLA-4 антитела, предусмотренного в настоящем изобретении. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и любое из антител, перечисленных в табл. 25 17, табл. 22, табл. 27 и табл. 32. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают антитело, которое связывается с эпитопом в пределах фрагмента CTLA-4, содержащего по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аминокислот в положении 3 30 (Met), положении 33 (Glu), положении 35 (Arg), положении 53 (Thr), положении 97 (Glu), положении 99 (Met), положении 100 (Tyr), положении 101 (Pro), положении 102 (Pro), положении 103 (Pro), положении 104 (Tyr), положении 105 (Tyr) и положение 106 (Leu) SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают антитело, которое

связывается с эпитопом в пределах фрагмента CTLA-4, состоящего из аминокислот от положений от 97 (Glu) до положения 106 (Leu) в последовательности SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают антитело, которое связывается с эпитопом в пределах фрагмента CTLA-4, состоящего из аминокислот от положений от 99 (Met) до положения 106 (Leu) в последовательности SEQ ID NO: 28.

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

В другом объекте настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению содержат константные области. Константные области могут представлять собой константные области тяжелой цепи (включая Fc-области), константные области легкой цепи или и то, и другое. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Fc-область является нативной. Примеры константных областей тяжелой цепи, полученных из нативных антител, могут включать, например, константные области тяжелой цепи, такие как IgG1 человека (SEQ ID NO: 249), IgG2 человека (SEQ ID NO: 250), IgG3 человека (SEQ ID NO: 251) и IgG4 человека (SEQ ID NO: 252). Кроме того, в других примерах константные области тяжелой цепи могут включать константные области тяжелой цепи SEQ ID NO: 82, 158 и 334. Примеры константных областей легкой цепи, полученных из нативных антител, могут включать, например, константные области легкой цепи, такие как κ-цепь человека (SEQ ID NOs : 33, 63 и 159) и λ-цепь человека (SEQ ID NO: 53 и 87).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области представляет собой вариант Fc-области, полученной путем добавления изменений аминокислотной последовательности к Fc-области нативной

последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области имеет повышенную связывающую активность по меньшей мере с одним рецептором Fcγ, выбранным из группы, состоящей из FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa, по сравнению с Fc-областью нативной последовательности. В других вариантах осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области имеет повышенную связывающую активность с FcγRIIa и FcγRIIIa по сравнению с Fc-областью нативной последовательности. Примеры константных областей тяжелой цепи, содержащих такой вариант Fc-области, включают, например, константные области тяжелой цепи, перечисленные в табл. 39-43, и константные области тяжелой цепи SEQ ID NO: 31, 32, 41-46, 65, 66, 81, 207, 239, 253-271, 276, 277, 278, 308, 309, 311-333 и 343-348, 350 и 351.

Fc-область нативной последовательности обычно состоит из гомодимера, состоящего из двух идентичных полипептидных цепей. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области может быть гомодимером, состоящим из полипептидных цепей с той же последовательностью, или гетеродимером, состоящим из полипептидных цепей, отличающимися друг от друга. Аналогичным образом константные области тяжелой цепи, содержащие Fc-область, могут быть гомодимерными и состоять из полипептидных цепей с одинаковыми последовательностями, или гетеродимерами, состоящими из полипептидных цепей с отличающимися друг от друга последовательностями. Примеры константных областей гетеромерной тяжелой цепи включают, например, константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 31 и 32; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 43 и 44; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 45 и 46; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 254 и 256; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 257 и 258; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 259 и 260; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 261 и 263; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 262 и 264; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 265 и 267; константные области тяжелой цепи, содержащие

полипептидные цепи SEQ ID NO: 266 и 268; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 269 и 270; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 271 и 81; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 65 и 66; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 239 и 207; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 259 и 276; и константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 65 и 278; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 308 и 309; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 311 и 312; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 313 и 314; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 315 и 316; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 317 и 318; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 319 и 320; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 321 и 322; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 323 и 324; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 325 и 326; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 327 и 328; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 330 и 331; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 332 и 333; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 343 и 344; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 345 и 347 константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 346 и 348; константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 350 и 351.

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

#### 1. Связывающая активность антитела

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения связывающая активность, предусмотренная в настоящем изобретении,

представлена константой диссоциации ( $K_D$ ), равной 10 мкМ или менее, 1 мкМ или менее, 100 нМ или менее, 10 нМ или менее, 1 нМ или менее, 0,1 нМ или менее, 0,01 нМ или менее или 0,001 нМ или менее (например,  $10^{-8}$  М или менее, например, от  $10^{-8}$  М до  $10^{-13}$  М, например, от  $10^{-9}$  М до  $10^{-13}$  М).

5 В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающую активность определяют путем анализа с применением радиоактивно-меченого антигена (RIA - radiolabeled antigen binding assay). В еще одном из вариантов осуществления настоящего изобретения RIA проводят с версией Fab исследуемого антитела и его антигена. Например, аффинность

10 связывания Fab в растворе с антигеном измеряют путем уравнивания Fab с минимальной концентрацией ( $^{125}\text{I}$ )-меченого антигена в присутствии серии титрования немеченого антигена, а затем захвата связанного антигена с помощью планшета, покрытого анти-Fab антителом (см., например, Chen с соавт., *J. Mol. Biol.* 1999, 293: 865-881). Чтобы определить условия для анализа,

15 мультилуночные планшеты MICROTITER (зарегистрированная торговая марка) (фирма Thermo Scientific) покрывают в течение ночи 5 мкг/мл захватывающего анти-Fab антитела (фирма Carpel Labs) в 50 мМ карбонате натрия (pH 9,6) и затем блокируют 2% (масса/объем) бычьего сывороточного альбумина (БСА) в фосфатно-солевом буфере (TBS) в течение двух-пяти часов при комнатной

20 температуре (приблизительно 23°C). В планшете без адсорбции (фирма Nunc, номер в каталоге 269620) 100 пМ или 26 пМ [ $^{125}\text{I}$ ]-антигена смешивают с серийными разведениями исследуемого Fab (например, в соответствии с оценкой анти-VEGF-антитела, Fab-12, в публикации Presta с соавт., *Cancer Res.* 1997, 57: 4593-4599). Затем исследуемый Fab инкубируют в течение ночи; однако

25 инкубация может продолжаться в течение более длительного периода (например, около 65 ч), чтобы обеспечить достижение равновесия. После этого смеси переносят на планшет для захвата для инкубации при комнатной температуре (например, в течение одного часа). Затем раствор удаляют, и планшет восемь раз промывают 0,1% полисорбатом 20 (TWEEN-20 (зарегистрированная торговая

30 марка)) в TBS. Когда планшеты высохнут, добавляют 150 мкл/лунку сцинтиллятора (MICROSCINT-20TM; фирма Packard) и планшеты подсчитывают на гамма-счетчике TOPCOUNTTM (фирма Packard) в течение десяти минут. Концентрации каждого Fab, дающие меньше или равную 20% от максимального связывания, выбирают для использования в анализах конкурентного связывания.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающую активность антитела измеряют с помощью анализа захвата лиганда с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса в качестве принципа измерения, например, с помощью BIACORE (зарегистрированная торговая марка) T200 или BIACORE (зарегистрированная торговая марка) 4000 (фирма GE Healthcare, Уппсала, Швеция). Программное обеспечение BIACORE (зарегистрированная торговая марка) Control Software используется для работы устройства. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения применяют комплект для соединения аминов (фирма GE Healthcare, Уппсала, Швеция) в соответствии с инструкцией поставщика, а сенсорный чип, покрытый карбоксиметилдекстраном (фирма GE Healthcare, Уппсала, Швеция), иммобилизуют с молекулой для захвата лиганда, например, антителом против метки (анти-tag антителом, антителом против IgG и белком А). Молекулу для захвата лиганда разбавляют 10 мМ раствором ацетата натрия при соответствующем рН и вводят с соответствующими скоростью потока и временем введения. Анализ активности связывания проводят с использованием буфера, содержащего 0,05% полисорбата 20 (другое название – TWEEN (зарегистрированный товарный знак)-20) в качестве буфера для анализа, при скорости потока от 10 до 30 мкл/мин и при температуре анализа предпочтительно 25°C или 37°C. Когда проводят анализ, позволяя молекуле для захвата лиганда захватить антитело в качестве лиганда, серийное разведение антигена или рецептора Fc, приготовленного с буфером для анализа (аналита), вводят после захвата целевого количества антитела путем инъекции антитела. Когда анализ проводят, позволяя молекуле для захвата лиганда захватить антиген или рецептор Fc в качестве лиганда, серийное разведение антитела, приготовленного с буфером для анализа (аналита), вводят после захвата целевого количества антигена или рецептора Fc путем инъекции.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения результаты анализируют с использованием программного обеспечения для оценки BIACORE (зарегистрированная торговая марка). Параметры кинетики рассчитываются путем одновременной подгонки сенсограмм связывания и диссоциации с использованием модели связывания 1:1, что позволяет рассчитать скорость связывания ( $k_{on}$  или  $k_a$ ), скорость диссоциации ( $k_{off}$  или  $k_d$ ) и равновесную константу диссоциации ( $K_D$ ). Когда связывающая активность слабая, особенно

когда диссоциация быстрая и трудно рассчитать кинетические параметры, равновесную константу диссоциации ( $K_D$ ) можно рассчитать с использованием модели стационарного состояния. В качестве другого параметра связывающей активности можно рассчитать «количество связывания аналита на единицу количества лиганда» путем деления количества связывания аналита при определенной концентрации (RU) на количество захваченного лиганда (RU).

## 2. Фрагменты антитела

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

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

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

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



### 3. Химерные и гуманизированные антитела

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

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

Гуманизированные антитела и способы их получения рассматриваются, например, в работах Almagro и Fransson, *Front. Biosci.* 2008, 13:1619-1633; Riechmann с соавт., *Nature* 1988, 332: 323-329; Queen с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86:10029-10033; US 5821337, US 7527791, US 6982321 и US 7087409; Kashmiri с соавт., *Methods* 2005? 36:25-34 (описание внедрения области, определяющей специфичность (SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 1991, 28:489-498 (описание «обновления»); Dall'Acqua с соавт., *Methods*, 2005, 36:43-

60 (описание «перетасовки FR»); Osbourn с соавт., *Methods*, 2005, 36:61-68; Klimka с соавт., *Br. J. Cancer*, 2000, 83:252-260 (описание подхода «направленной селекции» для перетасовки FR).

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

#### 4. Антитела человека

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

25 Антитела человека могут быть получены путем введения иммуногена трансгенному животному, которое было модифицировано для получения интактных антител человека или интактных антител с переменными областями человека в ответ на антигенную стимуляцию. Такие животные обычно содержат  
30 все или часть локусов иммуноглобулинов человека, которые заменяют эндогенные локусы иммуноглобулинов, или которые присутствуют внехромосомно или случайным образом интегрированы в хромосомы животного. У таких трансгенных мышей локусы эндогенного иммуноглобулина обычно инактивированы. Для обзора методов получения антител человека от

трансгенных животных см. Lonberg, *Nat. Biotech.* 2005, 23: 1117-1125. См. также, например, патенты US 6075181 и US 6150584, в которых описана технология XENOMOUSE™; US 5770429, описывающую технологию HuMab (зарегистрированная торговая марка); US 7041870 описывает технологию K-M MOUSE (зарегистрированная торговая марка) и US 2007/0061900 описывает технологию VelociMouse (зарегистрированная торговая марка). Вариабельные области человека из интактных антител, генерируемых такими животными, могут быть дополнительно модифицированы, например, путем объединения с другой константной областью человека.

10 Антитела человека также могут быть получены методами на основе гибридом. Описаны клеточные линии миеломы человека и мышино-человеческой гетеромиеломы для выработки моноклональных антител человека (см., например, Kozbor *J. Immunol.*, 1984, 133:3001; Brodeur с соавт., «*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*», 1987, стр. 51-63, изд-во Marcel Dekker, Inc., Нью-Йорк); Voerner с соавт., *J. Immunol.*, 1991, 147: 86). Также описаны антитела человека, полученные с помощью гибридомной технологии В-клеток человека в публикации Li с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103:3557-3562. К дополнительным относятся методы, описанные, например, в US 7189826 (выработка моноклональных антител IgM человека из клеточных 20 линий гибридом) и Ni, *Xiandai Mianyixue*, 2006, 26(4):265-268 (описание гибридом между разными клетками человека). Технология гибридомы человека (технология Trioma) также описана в публикациях Vollmers и Brandlein, *Histology and Histopathology*, 2005, 20(3):927-937; и Vollmers и Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 2005, 27(3):185- 25 191.

Антитела человека также могут быть получены путем выделения последовательностей вариабельных доменов клона Fv, выбранных из библиотек фагового дисплея человеческого происхождения. Затем такие последовательности вариабельных доменов можно комбинировать с желаемым 30 константным доменом человека. Методы отбора антител человека из библиотек антител описаны ниже.

#### 5. Антитела, разработанные на основе библиотек

Антитела по настоящему изобретению могут быть выделены путем скрининга комбинаторных библиотек на антитела с требуемой активностью или

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

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

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

#### 6. Мультиспецифические антитела

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

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

15 локализации цитотоксических агентов в клетках, которые экспрессируют CTLA-4. Биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител.

Методы получения мультиспецифических антител включают, но не ограничиваются ими, рекомбинантную совместную экспрессию двух пар

20 тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, обладающих различной специфичностью (см. Milstein и Cuello, *Nature* 1983, 305: 537), WO 93/08829, Траунескер *с соавт.*, *EMBO J.* 1991, 10: 3655), и конструирование «выступ-вопадину» (см., например, US 5731168). Мультиспецифические антитела также могут быть получены путем разработки эффектов электростатического

25 управления для создания Fc-гетеродимерных молекул антител (WO 2009/089004A1); перекрестное сшивание двух или более антител или их фрагментов (см., например, US 4676980, и Brennan *с соавт.*, *Science*, 1985, 229:81); использование лейциновых молний для получения биспецифических антител (см., например, Kostelny *с соавт.*, *J. Immunol.*, 1992, 148(5):1547-1553);

30 использование технологии «диатело» для получения биспецифических фрагментов антител (см., например, Hollinger *с соавт.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90: 6444-6448); и с использованием одноцепочечных димеров Fv (scFv) (см., например, Gruber *с соавт.*, *J. Immunol.*, 1994, 152: 5368); и получение

триспецифических антител, как описано, например, в Tutt с соавт., *J. Immunol.* 1991, 147:60.

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

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

## 10 7. Варианты антител

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

### а) Варианты замещений, инсерций и делеций

25 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлены варианты антител, имеющие одну или более аминокислотных замен. Сайты, представляющие интерес для заместительного мутагенеза, включают HVR и FR. Консервативные замены показаны в табл. 1 под заголовком «предпочтительные замещения». Более существенные изменения представлены в 30 табл. 1 под заголовком «примеры замещений» и как дополнительно описано ниже в отношении классов боковых цепей аминокислот. Аминокислотные замены могут быть введены в интересующее антитело, а продукты подвергнуты скринингу на желаемую активность, например, на сохранение/улучшение

связывания антигена, снижение иммуногенности или улучшение ADCC или CDC.

Таблица 1.

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

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

(1) гидрофобные: норлейцин, метионин (Met), аланин (Ala), валин (Val), лейцин (Leu) и изолейцин (Ile);

10 (2) нейтральные и гидрофильные: цистеин (Cys), серин (Ser), треонин (Thr), аспарагин (Asn) и глутамин (Gln);

(3) кислые: аспартат (Asp) и глутамат (Glu);

(4) основные: гистидин (His), лизин (Lys) и аргинин (Arg);

(5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: глицин (Gly) и пролин (Pro); а также

15 (6) ароматические: триптофан (Trp), тирозин (Tyr) и фенилаланин (Phe).

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

Один тип варианта замены включает замену одного или более остатков гипервариабельной области исходного антитела (например, гуманизованного антитела или антитела человека). Как правило, полученные варианты, 5  
выбранные для дальнейшего исследования, имеют модификации (например, улучшения) определенных биологических свойств (например, повышенная аффинность, сниженная иммуногенность) по сравнению с исходным антителом и/или в значительной степени сохраняют определенные биологические свойства 10  
исходного антитела. Иллюстративный вариант замены представляет собой антитело с созревшей аффинностью, которое может быть легко получено, например, с использованием методов созревания аффинности на основе фагового дисплея, таких как описанные в настоящем изобретении. Вкратце, один или более остатков HVR мутируют, а вариант антитела экспонируют на фаге и 15  
подвергают скринингу на конкретную биологическую активность (например, аффинность связывания).

В HVR могут быть внесены изменения (например, замены), например, для улучшения аффинности антител. Такие изменения могут быть сделаны в «горячих точках» HVR, то есть в остатках, кодируемых кодонами, которые 20  
подвергаются мутациям с высокой частотой в процессе соматического созревания (см., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 2008, 207: 179-196) , и/или остатки, которые контактируют с антигеном, при этом полученный вариант VH или VL тестируют на аффинность связывания. Было описано созревание аффинности путем создания и повторного выбора из вторичных 25  
библиотек, описанных, например, Hoogenboom с соавт., *Methods in Molecular Biology*, 2001, 178:1-37, под ред. O'Brien с соавт., изд-во Human Press, Тотова, Нью-Джерси. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, касающихся созревания аффинности, разнообразие вводится в вариабельные гены, выбранные для созревания, любым из множества методов (например, 30  
подверженной ошибкам ПЦР, перестановкой цепей или мутагенезом, направленным на олигонуклеотиды). Затем создается вторичная библиотека. После этого библиотеку подвергают скринингу для выявления любых вариантов антител с желаемой аффинностью. Другой метод введения разнообразия включает подходы, направленные на HVR, в которых несколько остатков HVR



(например, 4-6 остатков за раз) рандомизируют. Остатки HVR, участвующие в связывании антигена, могут быть специфически идентифицированы, например, с использованием аланинового сканирующего мутагенеза или моделирования. CDR-H3 и CDR-L3, в частности, часто становятся мишенью.

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

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

30 Вставки аминокислотной последовательности включают слияния с амино- и/или карбокси-концом последовательностей разной длины, от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также инсерции внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых инсерций включают антитело с N-концевым метионильным остатком.

Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают слияние фермента (например, антитело-направленного фермента ADEPT) или полипептида, который увеличивает время полужизни антитела в плазме, с N- или C-концом антитела.

5            б) Варианты гликозилирования

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению изменено для увеличения или уменьшения степени гликозилирования антитела. Добавление или удаление сайтов гликозилирования в антителе может быть удобно осуществлено путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, что создается или удаляется один или более сайтов гликозилирования.

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

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают варианты антител, имеющие углеводную структуру, в которой отсутствует фукоза, присоединенная (прямо или косвенно) к Fc-области. Например, количество фукозы в таком антителе может составлять от 1% до 80%, от 1% до 65%, от 5% до 65% или от 20% до 40%. Количество фукозы определяют путем расчета среднего количества фукозы в цепи сахара в Asn297 по отношению к сумме всех гликоструктур, присоединенных к Asn 297 (например, сложных, гибридных структур и структур с высоким содержанием маннозы), по данным масс-спектрометрии MALDI-TOF, как описано, например в WO 2008/077546. Asn297 относится к остатку аспарагина, расположенному примерно в положении 297 в Fc-области (нумерация остатков Fc-области по EU); однако Asn297 также может быть расположен примерно на +/- 3 аминокислоты выше

или ниже по цепи положения 297, то есть между положениями 294 и 300, из-за незначительных вариаций последовательности в антителах. Такие варианты фукозилирования могут иметь улучшенную функцию ADCC. См., например, публикации патентов US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Nakko Kogyo Co., Ltd). Примеры публикаций, относящихся к «дефукозилированным» или «дефицитным по фукозе» вариантам антител, включают: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki с соавт., *J. Mol. Biol.* 2004, 336: 1239-1249; Yamane-Ohnuki с соавт., *Biotech. Bioeng.* 2004, 87: 614. Примеры клеточных линий, способных продуцировать дефукозилированные антитела, включают клетки Lec13 CHO, дефицитные по фукозилированию белков (Ripka с соавт., *Arch. Biochem. Biophys.* 1986, 249: 533-545; US Pat Appl 2003/0157108 A1, Presta L.; WO 2004/056312 A1, Adams с соавт., особенно пример 11), и линии клеток с нокаутом, например, гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы, *FUT8*, клетки CHO с нокаутом (см., например, Yamane-Ohnuki с соавт., *Biotech. Bioeng.* 2004, 87: 614; Kanda Y. с соавт., *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 94(4): 680-688; и WO 2003/085107).

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

#### в) Варианты Fc-области

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одна или более аминокислотных модификаций могут быть введены в Fc-область антитела, представленного в настоящем изобретении, получая таким образом варианта Fc-

области. Вариант Fc-области может содержать последовательность Fc-области человека (например, Fc-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащей аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или более аминокислотных положениях.

5 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают вариант антитела, который обладает некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает его желательным кандидатом для применений, в которых важен период полужизни антитела *in vivo*, но некоторые эффекторные функции (такие как комплемент и ADCC) не нужны или вредны.

10 Анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo* могут быть проведены для подтверждения снижения/исчерпания активности CDC и/или ADCC. Например, можно провести анализ связывания Fc-рецептора (FcR), чтобы убедиться, что антитело не связывается с FcγR (следовательно, вероятно, не имеет активности ADCC), но сохраняет способность связывать FcRn. Первичные клетки для

15 опосредования ADCC, клетки NK, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на кроветворных клетках суммирована в табл. 3 на странице 464 в публикации Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 1991, 9: 457-492. Примеры, не являющиеся

20 ограничительными, анализов *in vitro* для оценки активности ADCC исследуемой молекулы описаны в US 5500362 (см., например, Hellstrom I. с соавт., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 1986, 83:7059-7063) и Hellstrom I. с соавт., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 1985, 82:1499-1502; US 5821337 (см. Bruggemann M. с соавт., *J. Exp. Med.* 1987, 166: 1351-1361). В качестве альтернативы можно использовать методы

25 нерадиоактивных анализов (см., например, анализ нерадиоактивной цитотоксичности ACT1™ для проточной цитометрии (фирма CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, Калифорния; и CytoTox 96 (зарегистрированная торговая марка) анализ нерадиоактивной цитотоксичности (фирма Promega, Мэдисон, Висконсин). Полезные эффекторные клетки для таких анализов включают

30 мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и природные клетки-киллеры (NK). В другом варианте или дополнительно активность ADCC исследуемой молекулы может быть оценена *in vivo*, например, в животной модели, например, описанной Clynes с соавт., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 1998, 95:652-656. Анализы связывания C1q также можно проводить для

подтверждения того, что антитело не способно связывать C1q и, следовательно,

не имеет активности CDC. См., например, связывание ELISA C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента можно провести анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro с соавт., *J. Immunol. Methods* 1996, 202:163; Cragg M.S. с соавт., *Blood* 2003, 101:1045-1052; Cragg M.S., Glennie M.J., *Blood* 2004, 103: 2738-2743). Связывание FcRn и определение клиренса/периода полувыведения *in vivo* также можно проводить с использованием методов, известных в данной области (см., например, Petkova S.B. с соавт., *Int'l. Immunol.* 2006, 18(12):1759-1769).

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

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

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

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

Антитела с увеличенным периодом полужизни и повышенным связыванием с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который отвечает за перенос материнских IgG к плоду (Guyer с соавт., *J. Immunol.*, 1976, 117:587; Kim с соавт., *J. Immunol.*, 1994, 24:249), описаны в US 2005/0014934 A1 (Hinton с соавт.). Эти антитела содержат Fc-область с одной или более заменами, которые увеличивают связывание Fc-области с FcRn. Такие варианты Fc включают варианты с заменами в одном или более остатках Fc-области из числа: 238, 256,

265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например, замена остатка 434 Fc-области (US 7371826).

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

г) Варианты антител, переработанные с цистеином

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения может оказаться целесообразным переработка антител с цистеином, например, «тиоMAb», в которых один или более остатков антитела заменены остатками цистеина. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения замещенные остатки встречаются в доступных участках антитела. Путем замены этих остатков цистеином реакционноспособные тиоловые группы, таким образом, располагаются в доступных участках антитела и могут быть использованы для конъюгации антитела с другими фрагментами, такими как фрагменты лекарственного средства или фрагменты линкер-лекарственное средство, для создания иммуноконъюгата, как описано далее в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения какой-либо один или более из следующих остатков может быть заменен цистеином: V205 (нумерация по Kabat) легкой цепи; A118 (нумерация EU) тяжелой цепи; и S400 (нумерация EU) Fc-области тяжелой цепи. Антитела, переработанные с использованием цистеина, могут быть получены согласно описанию EU 7521541.

д) Производные антител

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

винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры полипропиленгликоля, сополимеры полипропиленоксид/этиленоксид, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси.

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

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

Согласно настоящему изобретению можно комбинировать анти-CTLA-4 антитело с различными существующими технологиями. Одним вариантом такой  
25 комбинации с технологиями, который не ограничивает другие варианты, является, например, получение клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), с использованием анти-CTLA-4 антитела. В настоящем изобретении к примерам клеток относятся Т-клетки,  $\gamma\delta$ -Т-клетки, НК-клетки, НКТ-клетки, клетки-киллеры, индуцированные цитокинами (CIK) и макрофаги  
30 (*Int J Mol Sci. 2019, 20(11), 2839, Nat Rev Drug Discov. 2020, 19(5), 308*). Одним из примеров, не ограничивающим рамок охвата настоящего изобретения, является способ получения Т-клетки, экспрессирующей CAR (CAR-T), который включает введение CAR, который содержит антигенсвязывающий домен анти-CTLA-4 антитела (например, scFv), трансмембранный домен TCR и сигнальный

домен костимулирующей молекулы, такой как CD28, для усиления активации Т-клеток в эффекторные клетки, такие как Т-клетки, с помощью методов генной модификации.

5 Примеры технологий, которые не ограничивают рамок охвата настоящего изобретения и которые можно комбинировать с антителом против CTLA-4, включают получение антитела, перенаправляющего Т-клетки, с использованием антитела против CTLA-4 (*Nature* 1985, 314, 628-631; *Int J Cancer* 1988, 41, 609-615, *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83, 1453-1457). Одним из вариантов антитела, перенаправляющего Т-клетки, который не ограничивает рамок охвата  
10 настоящего изобретения, является биспецифическое антитело, содержащее: связывающий домен против любой из субъединиц, составляющих комплекс рецептора Т-клеток (TCR – T cell receptor) на Т-клетках, в частности, связывающий домен против эpsilon-цепи CD3 среди CD3; и антигенсвязывающий домен анти-CTLA-4 антитела.

#### 15 Б. Методы рекомбинации и составы

Антитела могут быть получены методом рекомбинации и с применением композиций, например, описанных в US 4816567. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую анти-CTLA-4 антитело, описанное в  
20 настоящем изобретении. Такая нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, включающую VL, и/или аминокислотную последовательность, включающую VH антитела (например, легкие и/или тяжелые цепи антитела). В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают один или более векторов (например, векторов экспрессии), содержащих такую нуклеиновую кислоту. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают клетку-хозяина, содержащую указанную нуклеиновую кислоту. В одном из таких вариантов осуществления настоящего изобретения клетка-хозяин содержит (например, была трансформирована): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту,  
25 кодирующую аминокислотную последовательность, включающую VL антитела, и аминокислотную последовательность, включающую VH антитела, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, включающую VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную



последовательность, включающую VH антитела. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения клетка-хозяин является эукариотической, например, клетка яичника китайского хомяка (CHO) или лимфоидная клетка (например, клетки Y0, NS0, Sp2/0). В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения описывают способ получения анти-CTLA-4 антитела, который включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, как указано выше, в условиях, подходящих для экспрессии анти-CTLA-4 антитела, и необязательно выделение антитела из клетки-хозяина (или среды для культивирования клеток-хозяев).

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

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

Помимо прокариот, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, являются эукариотические микробы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были «гуманизированы», что приводит к выработке антитела с паттерном гликозилирования, который

частично или полностью соответствует таковому у человека. См. Gerngross, *Nat. Biotech.* 2004, 22:1409-1414; Li с соавт., *Nat. Biotech.* 2006, 24:210-215.

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

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

Клетки позвоночных также могут быть использованы в качестве хозяев. Например, могут быть полезны клеточные линии млекопитающих, адаптированные для роста в виде суспензии. Другими примерами подходящих  
15 линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почки обезьяны, трансформированная вирусом SV40 (COS-7); линия почки эмбриона человека (клетки 293 или клетки 293, описанные, например, в публикации Graham с соавт., *J. Gen Virol.* 1977, 36: 59); клетки почки детеныша хомячка (ВНК); мышинные клетки Сертоли (клетки ТМ4, как описано, например, в публикации  
20 Mather, *Biol. Reprod.* 1980, 23:243-251); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени серой крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); опухоль молочной железы мыши (ММТ 060562); клетки TRI, как описано,  
25 например, в публикации Mather с соавт., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1982, 383:44-68; клетки MRC 5; и клетки FS4. Другие пригодные линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), в том числе клетки DHFR-CHO (Urlaub с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980, 77:4216); и линии клеток миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор некоторых  
30 линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для выработки антител, см., например, Yazaki и Wu, *Methods in Molecular Biology*, 2003, том 248, стр. 255–268, под ред. Lo В.К.С., изд., Humana Press, Тотова, Нью-Джерси.

Поликлональные антитела предпочтительно вырабатывают у животных путем множественных подкожных (п/к) или внутривентральных (в/б) инъекций

соответствующего антигена и адьюванта. Может быть полезно конъюгировать соответствующий антиген с белком, который является иммуногенным для иммунизируемых видов, например, гемоцианином лимфы улитки, сывороточным альбумином, бычьим тиреоглобулином или ингибитором трипсина сои, используя бифункциональный или дериватирующий агент, например,

5

малеимидобензоил сульфосукцинимидный эфир (конъюгация через остатки цистеина), N-гидроксисукцинимид (через остатки лизина), глутаровый альдегид, янтарный ангидрид,  $\text{SOCl}_2$  или  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , где R и  $\text{R}^1$  являются разными алкильными группами.

10

Животных (обычно млекопитающих, за исключением людей)

иммунизируют против антигена, иммуногенных конъюгатов или производных путем объединения, например, 100 мкг или 5 мкг белка или конъюгата (для кроликов или мышей, соответственно) с 3 объемами полного адьюванта Фрейнда, и вводят раствор внутрикожно в несколько мест. Через месяц

15

животным повторно вводят от 1/5 до 1/10 исходного количества пептида или конъюгата в полном адьюванте Фрейнда путем подкожной инъекции в несколько мест. Через 7-14 дней у животных берут кровь и анализируют титр антител в сыворотке. Животным вводят бустерные инъекции до тех пор, пока титр не выйдет на плато. Предпочтительно животное ревакцинируют

20

конъюгатом того же антигена, но конъюгированного с другим белком и/или с помощью другого сшивающего реагента. Конъюгаты также могут быть получены в культуре рекомбинантных клеток в виде белковых слияний. Кроме того, для усиления иммунного ответа применимы агрегирующие агенты, такие как квасцы.

25

Моноклональные антитела получают из популяции по существу гомогенных антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных природных мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, в результате изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в незначительных количествах.

30

Таким образом, модификатор «моноклональный» указывает на то, что антитело не является смесью отдельных антител.

Например, моноклональные антитела могут быть получены с использованием гибридомного метода, впервые описанного Kohler с соавт., *Nature*, 1975, 256(5517):495-497. В методе гибридом мышью или другое

подходящее животное-хозяин, например, хомяка, иммунизируют, как описано выше, для выявления лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые специфически связываются с белком, используемым для иммунизации. Альтернативно лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*.

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

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

Предпочтительными иммортализованными клетками миеломы являются те клетки, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильно высокий уровень продукции антител выбранными клетками, продуцирующими антитела, и чувствительны к среде, такой как среда HAT. Среди них предпочтительными являются линии мышинной миеломы, такие как линии, полученные из опухолей мышей MOPC-21 и MPC-11, доступные в Центре распределения клеток Института Солка, Сан-Диего, Калифорния, США, и клетки SP-2 (и их производные, например, X63-Ag8-653), доступные из Американской коллекции

5 типовых культур, Манассас, Вирджиния, США. Клеточные линии миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека также были описаны для получения моноклональных антител человека (Kozbor с соавт., *J. Immunol.* 1984, 133(6):3001-3005; Brodeur с соавт., «Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications», 1987, стр. 51-63, изд-во Marcel Dekker, Inc., Нью-Йорк).

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

15 После идентификации гибридомных клеток, которые продуцируют антитела с требуемой специфичностью, аффинностью и/или активностью, клоны могут быть субклонированы с помощью процедур лимитирующих разведений и выращены стандартными способами (публикация Goding, см. выше). Подходящие для этой цели питательные среды включают, например, среду D-МЕМ или RPMI-1640. Кроме того, клетки гибридомы можно выращивать *in vivo* 20 в виде опухолей у млекопитающих.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, соответствующим образом выделяют из культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки с помощью обычных процедур очистки иммуноглобулина, таких как, например, протеин А-сефароза, хроматография на гидроксипатите, гель-электрофорез, 25 диализ или аффинная хроматография.

Антитела могут быть получены путем иммунизации соответствующего животного-хозяина против антигена. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антиген представляет собой полипептид, содержащий полноразмерный антиген CTLA-4. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антиген представляет собой полипептид, содержащий 30 растворимый CTLA-4. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антиген представляет собой полипептид, содержащий область, соответствующую аминокислотам в положении от 97 (Glu) до положения 106 (Leu) CTLA-4 человека (внеклеточный домен, SEQ ID NO: 28). В одном из

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

#### В. Исследования

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

##### 1. Анализ связывания и другие исследования

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

В другом объекте настоящего изобретения конкурентные исследования можно использовать для идентификации антитела, которое конкурирует с анти-CTLA-4 антителами, описанными в настоящем изобретении (например, анти-CTLA-4 антителами, описанными в табл. 17, табл. 22, табл. 27 и табл. 32) за связывание с CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, если такое конкурирующее антитело присутствует в избытке, связывание эталонного антитела с CTLA-4 предотвращается (например, уменьшается) по крайней мере на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или выше. В некоторых примерах связывание предотвращено по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или выше. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения такое конкурирующее антитело связывается с тем же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), который связывается анти-CTLA-4 антителами, описанными в настоящем изобретении (например, анти-CTLA-4 антителами, описанными в табл. 17, табл. 22, табл. 27 и табл. 32). Подробные стандартные методы картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлены в

публикации Morris «Epitope Mapping Protocols» в кн.: «*Methods in Molecular Biology*» том 66, изд. Humana Press, Тотова, Нью-Джерси.

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

## 2. Исследование активности

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

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

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

жизнеспособности клеток CellTiter-Glo™, который коммерчески доступен от фирмы Promega (Мэдисон, Висконсин). Этот анализ определяет количество жизнеспособных клеток в культуре на основе количественного определения присутствующего АТФ, что является признаком метаболически активных клеток. См. Crouch с соавт. *J. Immunol. Meth.* 1993, 160:81-88, US 6602677. Исследование может быть выполнено в 96- или 384-луночном формате, что делает его пригодным для автоматизированного высокопроизводительного скрининга. См. Cree с соавт. *AntiCancer Drugs*, 1995, 6:398-404. Процедура анализа включает добавление единственного реагента (реагент CellTiter-Glo (зарегистрированная торговая марка)) непосредственно к культивируемым клеткам. Это приводит к лизису клеток и генерации люминесцентного сигнала, вызванного люциферазной реакцией. Люминесцентный сигнал пропорционален количеству присутствующей АТФ, которое прямо пропорционально количеству жизнеспособных клеток, присутствующих в культуре. Данные могут быть зарегистрированы с помощью люминометра или устройства формирования изображения камеры CCD. Выход люминесценции выражается в относительных световых единицах (RLU – relative light units).

Другим тестом на пролиферацию клеток является анализ «МТТ» – колориметрический анализ, который измеряет окисление бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия до формазана под действием митохондриальной редуктазы. См., например, Mosmann, *J. Immunol. Meth.*, 1983, 65:55-63; Zhang с соавт., *Cancer Res.* 2005, 65:3877-3882.

Клетки для применения в любом из вышеперечисленных анализов *in vitro* включают клетки или клеточные линии, которые естественным образом экспрессируют CTLA-4 или которые были сконструированы для экспрессии CTLA-4. Такие клетки также включают клеточные линии, которые экспрессируют CTLA-4, и клеточные линии, которые в норме не экспрессируют CTLA-4, но трансфицированы нуклеиновой кислотой, кодирующей CTLA-4.

В одном объекте настоящего изобретения описанное анти-CTLA-4 антитело тестируют на способность ингибировать рост или пролиферацию клеток *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитело тестируют на способность ингибировать рост опухоли *in vivo*. В таком тестировании могут быть применены модельные системы *in vivo*, например модели ксенотрансплантата. В иллюстративной системе ксенотрансплантата



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

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

Типичный анализ для измерения активности ADCC терапевтического антитела основан на анализе высвобождения  $^{51}\text{Cr}$  и включает следующие этапы: мечение клеток-мишеней [ $^{51}\text{Cr}$ ]Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>; опсонизацию клеток-мишеней, экспрессирующих антиген на клеточной поверхности, антителом; объединение опсонизированных меченных радиоактивным изотопом клеток-мишеней с эффекторными клетками в подходящем соотношении в микротитрационном планшете в присутствии или в отсутствие тестируемого антитела; инкубация смеси клеток предпочтительно в течение от 16 до 18 часов, предпочтительно при 37°C; сбор супернатанта; и анализ радиоактивности в образце супернатанта. Затем определяют цитотоксичность тестируемого антитела, например, по следующему уравнению: степень удельной цитотоксичности (%) = (радиоактивность в присутствии антитела – радиоактивность в отсутствие антитела) / (максимальная радиоактивность – радиоактивность в отсутствие антитела) × 100. График можно построить, изменив соотношение клеток-мишеней и эффекторных клеток или концентрацию антител.

Для оценки активации комплемента можно провести анализ комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), как описано, например, в Gazzano-Santoro с соавт., *J. Immunol. Methods*, 1996, 202:163. Вкратце, различные концентрации варианта полипептида и комплемента человека разводят буфером. Клетки,

экспрессирующие антиген, с которым связывается вариант полипептида, разводят до плотности приблизительно  $1 \times 10^6$  клеток/мл. Смесь варианта полипептида, разбавленного комплемента человека и антиген-экспрессирующих клеток добавляют в плоскодонный 96-луночный планшет для тканевых культур и инкубируют при  $37^\circ\text{C}$  и в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$  в течение 2 ч для стимулирования опосредованного комплементом клеточного лизиса. Затем в каждую лунку добавляют по 50 мкл красителя Alamar Blue (фирма Accumed International) и инкубируют при  $37^\circ\text{C}$  в течение ночи. Поглощение измеряют с использованием 96-луночного флуориметра с возбуждением при 530 нм и испусканием при 590 нм. Результаты представлены в относительных единицах флуоресценции (RFU – relative fluorescence units). Концентрации образца можно рассчитать по стандартной кривой, и процент активности по сравнению с невариантным полипептидом указывается для представляющего интерес варианта полипептида.

Один из способов анализа активности ADCP может включать следующее:

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

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

5           Активацию иммунитета можно обнаружить, используя в качестве индикаторов клеточный или гуморальный иммунный ответ. Активация иммунитета включает, в частности, повышение уровня экспрессии цитокинов (например, IL-6, G-CSF, IL-12, TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ ) или их рецепторов, стимулировать пролиферации иммунных клеток (например, В-клеток, Т-клеток, 10 клеток NK, макрофагов и моноцитов), повышенное состояние активации, повышенные функции и повышенная цитотоксическая активность. В частности, активацию Т-клеток можно обнаружить путем измерения повышенной экспрессии маркеров активации, таких как CD25, CD69 и ICOS. Например, известно, что у пациентов, которым вводят анти-CTLA-4 антитело, ипилимумаб, 15 после введения наблюдают повышение ICOS<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т-клеток в периферической крови, и это рассматривают в качестве эффекта активации системного иммунного статуса введением анти-CTLA-4 антитела (*Cancer Immunol. Res.*, 2013, 1(4): 229-234).

Для активации Т-клеток требуется не только стимуляция через антигенный 20 рецептор (TCR), но и вспомогательная стимуляция через CD28. Когда CD28 на поверхности Т-клетки связывается с В7-1 (CD80) или В7-2 (CD86) на поверхности антиген-презентирующей клетки, вспомогательный сигнал передается на Т-клетку, и затем Т-клетка активируется. С другой стороны, CTLA-4 экспрессируется на поверхности активированных Т-клеток. Поскольку 25 CTLA-4 связывается с CD80 и CD86 с большей аффинностью, чем с CD28, он взаимодействует с CD80 и CD86 в большей степени, чем с CD28, что приводит к подавлению активации Т-клеток.

Основываясь на таком механизме действия, ингибирующую активность в отношении CTLA-4 можно измерить как активность ингибирования связывания 30 CTLA-4 с CD80 или CD86.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения анализ измерения ингибирующей активности в отношении CTLA-4 включает следующие этапы: обеспечение возможности связывания очищенного белка CTLA-4 с подложкой, такой как планшет для микротитрования или магнитные

гранулы; добавление тестируемого антитела и меченого растворимого CD80 или CD86; вымывание не связавшихся компонентов; и количественное определение связанного меченого CD80 или CD86. Реагирует ли тестируемое антитело перекрестно с CD28 или нет, можно подтвердить, выполнив аналогичный анализ, в котором вместо CTLA-4 используется CD28. Более того, в другом варианте осуществления настоящего изобретения функциональный анализ, который выявляет активацию Т-клеток, как описано выше, также можно использовать для измерения ингибирующей активности в отношении CTLA-4. Например, когда тестируемое антитело, обладающее ингибирующей активностью в отношении CTLA-4, добавляется в систему, в которой активация Т-клеток измеряется путем стимуляции популяции Т-клеток клетками, экспрессирующими CD80 или CD86, активация Т-клеток дополнительно усиливается.

#### Г. Иммуноконъюгаты

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

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения иммуноконъюгат представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC – antibody-drug conjugate), в котором антитело конъюгировано с одним или несколькими лекарственными средствами, включая, помимо прочего, майтансиноид (см. патенты US 5208020, US5416064 и европейский патент EP 0425235 B1); ауристатин, такой как молекулы монометилауристатина DE и DF (MMAE и MMAF) (см. US 5635483, US 5780588 и US 7498298); доластатин; калихеамицин или его производное (см. патенты US 5712374, US 5714586, US 5739116, US 5767285, US 5770701, US 5770710, US 5773001 и US 5877296; Hinman с соавт., *Cancer Res.* 1993, 53: 3336-3342; Lode с соавт., *Cancer Res.* 1998, 58: 2925-2928); антрациклин, такой как дауномицин или доксорубицин (см. Kratz с соавт., *Current Med. Chem.* 2006, 13: 477-523; Jeffrey с соавт., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 2006, 16: 358-362; Torgov с соавт., *Bioconj. Chem.* 2005, 16:

717-721; Nagy с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97: 829-834; Dubowchik с соавт., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 2002, 12: 1529-1532; King с соавт., *J. Med. Chem.* 2002, 45:4336-4343; US 6630579); метотрексат; виндезин; таксан, такой как доцетаксел, паклитаксел, ларотаксел, тезетаксел и ортатаксел; трихотецен; и  
5 СС1065.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения иммуноконъюгат содержит антитело, как описано в настоящем изобретении, конъюгированное с ферментативно активным токсином или его фрагментом, включая, помимо прочего, цепь А дифтерийного токсина, не связывающиеся  
10 активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модеццина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolacca americana* (РАРI, РАРII и РАР-S), ингибитор *Momordica charantia*, куриц, каротин, ингибитор *Saponaria officinalis*, Галанин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин,  
15 эномицин и трихотецены.

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

Конъюгаты антитела и цитотоксического агента могут быть получены с использованием различных бифункциональных связывающих белков агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP),  
30 сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (ИТ), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил) гександиамин), производные

бис-дiazония (такие как бис-(п-дiazонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат) и биактивные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2, 4-динитробензол). Например, рициновый иммунотоксин можно получить, как описано в Vitetta с соавт., *Science* 1987, 238:1098. Меченая углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является типичным хелатирующим агентом для конъюгации радионуклида с антителом. См. WO 94/11026. Линкер может быть «расщепляемым линкером», облегчающим высвобождение цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, можно использовать кислотолabileный линкер, пептидазочувствительный линкер, фотолabileный линкер, диметиллинкер или дисульфид-содержащий линкер (Chari с соавт., *Cancer Res.* 1992, 52: 127-131; US 5208020).

Иммуноконъюгаты или ADC в настоящем изобретении предусматривают, но не ограничиваются ими, такие конъюгаты, полученные с использованием сшивающих реагентов, включая, наряду с другими, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB, а также SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), которые являются коммерчески доступными (например, от фирмы Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Иллинойс, США).

#### Д. Способы и композиции для диагностики и изыскания

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

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CTLA-4 антитело для использования в методе

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

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

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают меченые анти-CTLA-4 антитела. Метки включают, но не ограничиваются ими, метки или фрагменты, которые обнаруживаются непосредственно (например, флуоресцентные, хромофорные, электронно-плотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), а также фрагменты, такие как ферменты или лиганды, которые обнаруживаются косвенно, например, посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия. Примеры меток включают, но не ограничиваются ими, радиоизотопы  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  и  $^{131}\text{I}$ , флуорофоры, такие как хелаты редкоземельных элементов или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон, люциферазы, например, люцифераза светлячка и бактериальная люцифераза (US 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофталазиндионы, пероксидаза хрена (HRP), щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, глюкоамилаза, лизоцим, сахаридоксидазы, например, глюкозооксидаза, галактозооксидаза и глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа, гетероциклические оксидазы, такие как уриказа и ксантинооксидаза, соединенные с ферментом, который использует перекись водорода для окисления предшественника красителя, такого как HRP, лактопероксидаза или микропероксидаза, биотин/авидин, спиновые метки, бактериофаговые метки, стабильные свободные радикалы и другие.

### Е. Фармацевтические составы

Фармацевтические составы анти-CTLA-4 антитела, как описано в настоящем изобретении, готовят путем смешивания такого антитела, имеющего желаемую степень чистоты, с одним или более необязательными

5 фармацевтически приемлемыми носителями (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 1980, 16-е издание, под ред. Osol A.) в виде лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители обычно нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и

10 включают, но не ограничиваются ими: буферы, такие как фосфатный, цитратный и других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или

15 пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие

20 агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, Zn-белковые комплексы); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Примеры фармацевтически приемлемых носителей в настоящем изобретении

25 дополнительно включают интерстициальные агенты для диспергирования лекарственных средств, такие как растворимые нейтрально-активные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP). Некоторые показательные sHASEGP и способы применения описаны в патентных публикациях US 2005/0260186 и US 2006/0104968. В одном из объектов настоящего изобретения sHASEGP сочетается

30 с одной или несколькими гликозаминогликаназами, такими как хондроитиназы.

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



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

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

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

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

#### Ж. Терапевтические способы и композиции

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

В одном из объектов настоящего изобретения предусматривают анти-CTLA-4 антител для применения в качестве лекарственного средства. В других объектах предусматривают анти-CTLA-4 антитело для применения в лечении опухолей. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CTLA-4 антитело для применения в способе лечения опухолей. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CTLA-4 антитело для применения в способе лечения индивида с опухолью, включающем введение индивиду эффективного количества анти-CTLA-4 антитела. В одном из таких вариантов осуществления

настоящего изобретения способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, например, согласно описанному ниже. В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к анти-CTLA-4 антителу, применяемому для повреждения клеток. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CTLA-4 антитело для применения в способе повреждения клеток у индивидуума, включающем введение индивиду эффективного количества анти-CTLA-4 антитела для повреждения клеток. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение относится к анти-CTLA-4 антителу для применения в иммунной активации. В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение предлагает анти-CTLA-4 антитело для использования в способе активации иммунитета у индивидуума, включающем введение индивидууму эффективного количества анти-CTLA-4 антитела для активации иммунитета. «Индивидом» в любом из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения преимущественно является человек.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения опухоль представляет собой солидную опухоль. В солидной опухоли опухолевые клетки обычно размножаются, образуя популяцию, и опухолевая ткань формируется преимущественно этими клетками. Более того, опухолевые ткани в живых организмах часто инфильтрированы иммунными клетками, такими как лимфоциты, которые также составляют часть опухолевых тканей. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения опухолевые ткани инфильтрированы иммунными клетками, особенно регуляторными Т-клетками (Treg). В одном варианте осуществления настоящего изобретения повреждение клеток вызывается активностью ADCC, активностью CDC или активностью ADCP. В другом варианте осуществления настоящего изобретения повреждаются клетки, экспрессирующие CTLA-4 на своей поверхности. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения повреждаемые клетки представляют собой Treg-клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Treg-клетки, проникшие в опухолевые ткани, повреждаются. В одном варианте осуществления настоящего изобретения иммунитет активируется путем повреждения клеток Treg (иммуносупрессия Treg-клетками отменяется). В дополнительных вариантах осуществления

настоящего изобретения иммунитет (в частности, противоопухолевый иммунитет) в опухолевых тканях активируется. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения активация иммунитета представляет собой активацию Т-клеток.

5 В других объектах осуществления настоящего изобретения степень воздействия лекарственного средства, производимого анти-CTLA-4 антителом по настоящему изобретению, варьирует в зависимости от ткани человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения степень лекарственного воздействия изменяется в зависимости от концентрации

10 аденозин-содержащего соединения в ткани. В других вариантах осуществления настоящего изобретения эффект усиливается в ткани с высокой концентрацией аденозин-содержащего соединения по сравнению с тканью с низкой концентрацией аденозин-содержащего соединения. К тканям с высокой концентрацией аденозин-содержащего соединения относятся, например,

15 опухолевые ткани. Ткани с низкой концентрацией аденозин-содержащего соединения включают, например, неопухолевые ткани, такие как здоровые ткани. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения иммунитет сильнее активируется в опухолевой ткани, чем в неопухолевой. Такие различия в ответе необязательно должны наблюдаться для всех доз анти-

20 CTLA-4 антител, а должны наблюдаться только для определенного диапазона доз. В другом варианте осуществления настоящего изобретения иммунитет активируется при более низкой дозе в опухолевой ткани, чем в неопухолевой ткани. Более того, в другом варианте осуществления настоящего изобретения терапевтический эффект наблюдается при более низкой дозе, чем та, при которой наблюдается побочный эффект. В определенных вариантах

25 осуществления настоящего изобретения терапевтический эффект заключается в проявлении противоопухолевого эффекта (например, регрессия опухоли и индукция клеточной гибели или торможение роста опухолевых клеток), а побочный эффект заключается в развитии аутоиммунного заболевания (включая

30 повреждение здоровых тканей вследствие избыточных иммунных ответов).

В еще одном объекте по настоящему изобретению степень эффекта лекарственного средства, вызываемого анти-CTLA-4 антителом по настоящему изобретению, варьирует в зависимости от того, обладает ли оно активностью связывания с CTLA-4, которая зависит от аденозинсодержащего соединения (т.е.

изменяется в зависимости от концентрации аденозинсодержащего соединения). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению представляют собой антитела, связывающая активность которых с CTLA-4 увеличивается по мере повышения концентрации аденозинсодержащего соединения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения контрольное анти-CTLA-4 антитело представляет собой антитело, которое не обладает активностью связывания CTLA-4, зависящей от концентрации аденозинсодержащего соединения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело, которое не обладает активностью связывания CTLA-4, зависящей от концентрации аденозинсодержащего соединения, означает антитело, в котором разница в активности связывания CTLA-4 в условиях наличия или отсутствия соединения, например, менее чем в два раза, менее чем в 1,8 раза, менее чем в 1,5 раза, менее чем в 1,3 раза, менее чем в 1,2 раза или менее чем в 1,1 раза. Желательно, чтобы анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению и контрольное анти-CTLA-4 антитело имели CTLA-4-связывающую активность, по существу эквивалентную друг другу в присутствии достаточного количества аденозинсодержащего соединения.

В некоторых объектах по настоящему изобретению анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению и контрольное анти-CTLA-4 антитело различаются по действию лекарственного средства, проявляемому каждым антителом. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения они отличаются действием в качестве лекарственного средства на ткань с низкой концентрацией аденозинсодержащего соединения. Ткани с низкой концентрацией аденозинсодержащего соединения включают, например, неопухолевые ткани, такие как нормальные ткани. Анти-CTLA-4 антитела также могут быть предоставлены в виде фармацевтического состава, содержащего антитело. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в ткани с низкой концентрацией аденозинсодержащего соединения анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению проявляет низкий уровень активации иммунитета по сравнению с контрольным анти-CTLA-4 антителом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в ткани с низкой концентрацией аденозинсодержащего соединения дозы анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению, необходимые для активации иммунитета, являются

высокими по сравнению с контрольным анти-CTLA-4 антителом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в ткани с низкой концентрацией аденозинсодержащего соединения анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению имеет низкий уровень побочных эффектов по сравнению с контрольным анти-CTLA-4 антителом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в ткани с низкой концентрацией аденозинсодержащего соединения дозы анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению, при которых наблюдается побочный эффект, являются высокими по сравнению с контрольным анти-CTLA-4 антителом. Такие различия в реакции не обязательно должны наблюдаться во всех тканях (например, во всех тканях с низкой концентрацией аденозинсодержащего соединения), а должны наблюдаться только в определенных тканях. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения побочным эффектом является аутоиммунное заболевание (включая повреждение нормальных тканей вследствие чрезмерного иммунного ответа).

В некоторых объектах по настоящему изобретению анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению и контрольное анти-CTLA-4 антитело проявляют по существу равное действие в качестве лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения они проявляют по существу равное действие в качестве лекарственного средства в ткани с высокой концентрацией аденозинсодержащего соединения. К тканям с высокой концентрацией аденозинсодержащего соединения относятся, например, опухолевые ткани. Анти-CTLA-4 антитела также могут быть предоставлены в виде фармацевтических составов, содержащих антитело. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в ткани с высокой концентрацией аденозинсодержащего соединения анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению и контрольное анти-CTLA-4 антитело проявляют по существу равное воздействие по активации иммунитета. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в ткани с высокой концентрацией аденозинсодержащего соединения анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению и контрольное анти-CTLA-4 антитело по существу эквивалентны в дозе, необходимой для активации иммунитета. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в ткани с высокой концентрацией аденозинсодержащего соединения анти-CTLA-4 антитело по настоящему

изобретению и контрольное анти-CTLA-4 антитело обладают по существу равным уровнем терапевтического эффекта. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в ткани с высокой концентрацией аденозинсодержащего соединения анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению и контрольное анти-CTLA-4 антитело по существу эквивалентны в дозе, при которой наблюдается терапевтический эффект. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения терапевтический эффект представляет собой проявление противоопухолевого эффекта (например, регрессии опухоли и индукции гибели клеток или ингибирования роста опухолевых клеток).

10 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения опухоль может быть произвольно выбрана из группы, состоящей из карциномы, лимфомы, бластомы, саркомы и лейкоза. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения опухоль может быть произвольно выбрана из группы, включающей рак легких, мелкоклеточный рак легких, 15 немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легких, плоскоклеточный рак легких, рак ободочной кишки, рак прямой кишки, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак печени, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак почки, рак простаты, рак яичников, рак щитовидной железы, холангиокарциному, рак брюшины, мезотелиому, плоскоклеточную карциному, 20 рак шейки матки, рак эндометрия, рак мочевого пузыря, рак пищевода, рак головы и шеи, рак носоглотки, опухоль слюнной железы, тимому, рак кожи, базальноклеточную опухоль, меланому, злокачественную меланому, анальный рак, рак полового члена, рак яичка, опухоль Вильмса, острый миелолейкоз (включая острый миелолейкоз, острый миелобластный лейкоз, острый 25 промиелоцитарный лейкоз, острый миеломоноцитарный лейкоз и острый моноцитарный лейкоз), хронический миелолейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфатический лейкоз, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому (включая лимфому Беркитта, хронический лимфоцитарный лейкоз, грибовидный микоз, лимфому мантийных клеток, 30 фолликулярную лимфому, диффузную крупноклеточную лимфому, лимфому маргинальной зоны, пилочитарный лейкоз, плазмоцитому, периферическую Т-клеточную лимфому и Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых), лангергансклеточный гистиоцитоз, множественную миелому, миелодиспластический синдром, опухоли головного мозга (включая глиому,

астроглиому, глиобластому, менингиому и эпендимома), нейробластому, ретинобластому, остеосаркому, саркому Капоши, саркому Юинга, ангиосаркому и гемангиоперицитому. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения опухоль может быть произвольно выбрана из группы, состоящей из  
5 рака легких, рака ободочной кишки, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака печени, рака поджелудочной железы, рака почки, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи и меланомы.

В еще одном объекте настоящего изобретения предусматривают применение анти-CTLA-4 антитела в получении или приготовлении  
10 лекарственного средства. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения лекарственное средство предназначено для лечения опухолей. В другом варианте осуществления настоящего изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения опухоли, включающем введение индивидууму, имеющему опухоль, эффективного  
15 количества лекарственного средства. В одном таком варианте осуществления настоящего изобретения способ дополнительно предусматривает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, например, как описано ниже. В другом варианте осуществления настоящего изобретения лекарственное  
20 средство предназначено для разрушения клеток. В другом варианте осуществления настоящего изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе разрушения клеток у индивида, включающий введение индивиду эффективного количества лекарственного средства для разрушения клеток. В еще одном варианте осуществления настоящего  
25 изобретения лекарственное средство предназначено для активации иммунитета. В другом варианте осуществления настоящего изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе активации иммунитета у индивидуума, включающем введение индивидууму эффективного количества лекарственного средства для активации иммунитета. «Индивидом» в любом из  
30 указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения может быть человек.

В еще одном объекте настоящего изобретения предусматривают способ лечения опухоли. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ включает введение индивиду с такой опухолью эффективного количества

анти-CTLA-4 антитела. В одном из таких вариантов осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, как описано ниже. «Индивидом» в соответствии с

5 любым из вышеприведенных вариантов осуществления может быть человек.

В еще одном объекте настоящее изобретение предусматривает способ повреждения клеток у индивида. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ включает введение индивидууму эффективного количества анти-CTLA-4 антитела для повреждения клеток. В другом объекте

10 настоящее изобретение предусматривает способ активации иммунитета у индивидуума. В одном варианте осуществления способ включает введение индивидууму эффективного количества анти-CTLA-4 антитела для активации иммунитета. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения понятие «индивид» означает человека.

В еще одном объекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтические составы (фармацевтические композиции), включающие любое

15 из предусмотренных в настоящем изобретении анти-CTLA-4 антител, например, для использования в любом из вышеперечисленных терапевтических способов. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения

20 фармацевтический состав (фармацевтическая композиция) включает любое из предусмотренных в настоящем изобретении анти-CTLA-4 антител и фармацевтически приемлемый носитель. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают фармацевтический состав для применения в лечении опухолей. В одном из вариантов осуществления

25 настоящего изобретения предусматривают фармацевтический состав для применения в разрушении клеток. В одном варианте осуществления настоящее изобретение предлагает фармацевтический состав (фармацевтическую композицию) для применения для активации иммунитета. В другом варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтический состав

30 (фармацевтическая композиция) содержит любое из анти-CTLA-4 антител, представленных в настоящем изобретении, и по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент, например, как описано ниже.

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



для использования в любом из вышеупомянутых терапевтических способов), включающие перемешивание любого из анти-CTLA-4 антител, предусмотренных в настоящем изобретении, с фармацевтически приемлемым носителем. В одном варианте осуществления настоящего изобретения способ приготовления лекарственного средства или фармацевтической композиции дополнительно включает добавление по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента к лекарственному средству или фармацевтической композиции.

Антитела по настоящему изобретению можно использовать в терапии либо отдельно, либо в сочетании с другими агентами. Например, антитело по настоящему изобретению можно вводить одновременно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор иммунных контрольных точек, ингибитор EGFR, ингибитор HER2 или химиотерапевтический агент. Ингибитор иммунной контрольной точки может включать, например, анти-CTLA-4 ингибитор, анти-PD-1 ингибитор, анти-PD-L1 ингибитор, анти-PD-L2 ингибитор, анти-TIM-3 ингибитор, анти-LAG-3 ингибитор, анти-TIGIT ингибитор, анти-BTLA ингибитор и анти-VISTA ингибитор. Ингибитор Анти-CTLA-4 может включать, например, ипилимумаб и тремелиумаб. анти-PD-1 ингибитор может включать, например, ниволумаб и пембролизумаб. Анти-PD-L1 ингибитор может включать, например, атезолизумаб, дурвалумаб и авелумаб. Анти-PD-L2 ингибитор может включать, например, анти-PD-L2 ингибирующее антитело. Анти-TIM-3 ингибитор может включать, например, анти-TIM-3 ингибирующее антитело. Анти-LAG-3 ингибитор может включать, например, анти-LAG-3 ингибирующее антитело. Анти-TIGIT ингибитор может включать, например, анти-TIGIT ингибирующее антитело. Анти-BTLA ингибитор может включать, например, анти-BTLA ингибирующее антитело. Анти-VISTA ингибитор может включать, например, анти-VISTA ингибирующее антитело. Ингибитор EGFR может включать, например, цетуксимаб, панитумумаб, нимотузумаб, нецитумумаб и залутумумаб. Ингибитор HER2 может включать, например, трастузумаб, трастузумаб эмтанзин и пертузумаб.

Такие комбинированные методы лечения, отмеченные выше, включают комбинированное введение (когда два или более терапевтических агента

включены в одну и ту же или отдельные композиции) и отдельное введение, и в этом случае введение антитела по настоящему изобретению может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента или агентов. В одном варианте осуществления настоящего изобретения введение каждого анти-CTLA-4 антитела и введение дополнительного терапевтического агента происходят в течение примерно одного месяца, или в течение примерно одной, двух или трех недель, или в течение примерно одной, двух, трех, четырех, пяти или шести дней. Антитела по настоящему изобретению также можно использовать в сочетании с лучевой терапией.

10 Антитело по настоящему изобретению (и любой дополнительный терапевтический агент) можно вводить любым подходящим способом, включая парентеральное, внутрилегочное и интраназальное введение, и, при необходимости для местного лечения, внутриочаговое введение.

Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, 15 внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Дозирование может осуществляться любым подходящим путем, например, инъекциями, такими как внутривенные или подкожные инъекции, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или постоянным. В настоящем изобретении рассматриваются различные схемы дозирования, включая, но не 20 ограничиваясь ими, однократное или многократное введение в различные моменты времени, болюсное введение и импульсные инфузии.

Антитела по настоящему изобретению должны быть составлены, дозированы и введены в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, которые следует учитывать в этом контексте, включают конкретное 25 подвергаемое лечению заболевание, конкретное подвергаемое лечению млекопитающее, клиническое состояние конкретного пациента, причину расстройства, место доставки агента, способ введения, график введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Антитело не обязательно, а дополнительно, включает в себя один или несколько агентов, используемых в 30 настоящее время для предотвращения или лечения рассматриваемого заболевания. Эффективное количество таких дополнительных агентов зависит от количества антител, присутствующих в препарате, типа нарушения или лечения и других факторов, обсуждавшихся выше. Их обычно используют в тех же дозах и способами введения, как описано в настоящем описании, или примерно от 1 до

99% доз, описанных в настоящем описании, или в любой дозировке и любым путем, который эмпирически/клинически определен как подходящий.

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

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

Анти-CTLA-4 антитело в настоящем изобретении можно вводить методом введения или интеграции нуклеиновой кислоты, кодирующей анти-CTLA-4 антитело, *in vivo*, с использованием вектора или тому подобного и экспрессии антитела против CLLA-4 непосредственно *in vivo*, или можно вводить без

использования вектора. Примеры вектора включают вирусный вектор и плазмидный вектор, а также аденовирусный вектор. Нуклеиновую кислоту, кодирующую анти-CTLA-4 антитело, можно вводить непосредственно *in vivo*, или можно вводить клетку, в которую введена нуклеиновая кислота, кодирующая анти-CTLA-4 антитело, *in vivo*. Например, анти-CTLA-4 антитело можно вводить методом введения мРНК, кодирующей анти-CTLA-4 антитело, которое химически модифицировано для повышения стабильности мРНК *in vivo*, непосредственно человеку для экспрессии анти-CTLA-4 антитела *in vivo* (см. EP2101823B и WO2013/120629). Можно вводить В-клетки, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую анти-CTLA-4 антитело (*Sci. Immunol.* 2019, 4, eaax0644). Могут быть введены бактерии, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую анти-CTLA-4 антитело (*Nature Reviews Cancer* (2018) 18, 727-743).

Примеры технологий, не ограничивающих рамки охвата настоящего изобретения, которые можно комбинировать с анти-CTLA-4 антителом, включают получение Т-клеток, секретирующих антитело, перенаправляющее Т-клетки с использованием анти-CTLA-4 антитела (*Trends Immunol* 2019, 40, 243-257). Одним из способов получения, не ограничивающим рамки охвата настоящего изобретения, является способ с помощью методов генной модификации введения нуклеиновой кислоты (кислот), которая кодирует биспецифическое антитело, содержащее связывающий домен против любой из субъединиц, составляющих комплекс рецептора Т-клеток (TCR) на Т-клетках, в частности, связывающий домен против цепи CD3 эpsilon среди CD3 и антигенсвязывающий домен анти-CTLA-4 антитела, в эффекторные клетки, такие как Т-клетки.

### 25 3. Продукция

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

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

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

В одном из объектов настоящего изобретения предусматривают выделенные полипептиды, содержащие вариант Fc-области. В некоторых полипептиды представляют собой антитела. В некоторых объектах полипептиды представляют собой слитые с Fc белки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения варианты Fc-области содержат по меньшей мере одно изменение аминокислотной последовательности (например, замену аминокислоты) по сравнению с соответствующей последовательностью в Fc-области нативной последовательности или последовательности контрольного варианта (в настоящем описании все вместе могут относиться к «исходной Fc-области»). Fc-область нативной последовательности обычно представляет собой гомодимер, состоящий из двух идентичных полипептидных цепей. Изменения

аминокислотной последовательности в вариантах Fc-областей по настоящему изобретению могут быть введены либо в одну из двух полипептидных цепей исходной Fc-области, либо в обе полипептидные цепи.

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

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

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения связывающая активность исходной Fc-области и вариантов Fc-областей может быть представлена значением  $K_D$  (константы диссоциации). В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения величина соотношения [значение  $K_D$  исходной Fc-области для FcγRIIa] / [значение  $K_D$  варианта Fc-области для FcγRIIa] составляет, например, 1,5 или более, 2 или более, 3 или

более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 15 или более, 20 или более, 25 или более, 30 или более, 40 или более, или 50 или более. В других вариантах осуществления настоящего изобретения FcγRIIIa может быть FcγRIIIa R или FcγRIIIa H, или обоими рецепторами. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения величина отношение [связывающая активность исходной Fc-области с FcγRIIIa] / [связывающая активность варианта Fc-области с FcγRIIIa] равно, например, 2 или более, 3 или более, 5 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 50 или более, 100 или более, 200 или более, 300 или более, 500 или более,  $1 \times 10^3$  или более,  $2 \times 10^3$  или более,  $3 \times 10^3$  или более, или  $5 \times 10^3$  или более. В других вариантах осуществления настоящего изобретения FcγRIIIa может быть FcγRIIIa F или FcγRIIIa V, или и тем, и другим. Следовательно, значение  $K_D$  Fc-области для FcγRIIIa может быть значением  $K_D$  Fc-области для FcγRIIIa F, значением  $K_D$  Fc-области для FcγRIIIa V или суммой или средним значением обоих.

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

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

В другом варианте осуществления настоящего изобретения связывающая активность исходной и вариантной Fc-областей может быть представлена количеством связывания с рецептором Fcγ на единицу количества Fc-области. Например, в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса связанное количество Fc-области, иммобилизованной на сенсорном чипе, и связанное количество рецептора Fcγ, дополнительно связанного с ним, измеряют как резонансную единицу (RU). Значение, полученное путем деления количества связывания рецептора Fcγ на количество связывания Fc-области, можно определить как количество связывания с рецептором Fcγ на единицу количества Fc-области. Конкретные способы измерения и расчета таких количеств связывания описаны в примерах ниже. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения значение отношения [количество связанного варианта Fc-области с FcγRIIa]/[количество связанной исходной Fc-области с FcγRIIa] составляет, например, 1,5 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 15 или более, 20 или более, 25 или более, 30 или более, или 40 или более, или 50 или более. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения значение отношения [количество связанного варианта Fc-области с FcγRIIIa]/[количество связанной исходной Fc-области с FcγRIIIa] составляет, например, 2 или более, 3 или более, 5 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 50 или более, 100 или более, 200 или более, 300 или более, 500 или более,  $1 \times 10^3$  или более,  $2 \times 10^3$  или более,  $3 \times 10^3$  или более,  $5 \times 10^3$  или более.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения значения  $K_D$ , значения  $k_d$ , значения количества связывания и другие, описанные в настоящем изобретении, измеряют или рассчитывают путем проведения анализа методом поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C (см., например, контрольный пример 8 в настоящем описании).

В некоторых объектах настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению обладает улучшенной селективностью в отношении активирующих и ингибирующих рецепторов Fcγ по сравнению с исходной Fc-областью. Другими словами, активность связывания варианта Fc-области по настоящему изобретению с активирующим рецептором Fcγ значительно выше, чем активность связывания с ингибирующим рецептором Fcγ, по сравнению с исходной Fc-областью. В определенных вариантах осуществления настоящего



изобретения активирующий рецептор Fcγ представляет собой по меньшей мере один рецептор Fcγ, выбранный из группы, состоящей из FcγRIa, FcγRIIa R, FcγRIIa H, FcγRIIa F и FcγRIIa V, а ингибирующим рецептором Fcγ является FcγRIIb. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения варианты Fc-области в настоящем изобретении имеют улучшенную селективность среди FcγRIIa и FcγRIIb. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области в настоящем изобретении имеет улучшенную селективность среди FcγRIIa и FcγRIIb. В других вариантах осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области в настоящем изобретении имеет улучшенную селективность среди FcγRIIa и FcγRIIb, а также среди FcγRIIa и FcγRIIb.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения варианты Fc-областей по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одно изменение аминокислотной последовательности по меньшей мере в одном положении, выбранном из группы, состоящей из положений 236, 239, 268, 270 и 326 в соответствии с нумерацией EU. В другом варианте изменения аминокислотной последовательности, описанные в WO 2013/002362 и WO 2014/104165, могут быть аналогичным образом использованы в настоящем изобретении.

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

В другом варианте осуществления настоящего изобретения связывающая активность исходной Fc-области и ее вариантов может быть представлена указанным выше количеством связывания с рецептором Fcγ на единицу

количества Fc-области. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения величина отношения [количество связанного варианта Fc-области с FcγRIIb]/[количество связанной исходной Fc-области с FcγRIIb] составляет, например, 10 или менее, 5 или менее, 3 или менее, 2 или менее, 1 или менее, 0,5 или менее, 0,3 или менее, 0,2 или менее или 0,1 или менее. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество связывания варианта Fc-области с FcγRIIb составляет, например, 0,5 или менее, 0,3 или менее, 0,2 или менее, 0,1 или менее, 0,05 или менее, 0,03 или менее, 0,02 или менее, 0,01 или менее, 0,005 или менее, 0,003 или менее, 0,002 или менее или 0,001 или менее.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения улучшение селективности между активирующим рецептором Fcγ и ингибирующим рецептором Fcγ представляет собой селективное усиление активности связывания с активирующим рецептором Fcγ по сравнению с активностью связывания с ингибирующим рецептором Fcγ, или, другими словами, увеличение отношение активности связывания активирующего рецептора Fcγ к активности связывания ингибирующего рецептора Fcγ (соотношение A/I). Это соотношение (отношение A/I) является показателем проявления превосходных эффекторных функций. Полипептиды с высоким соотношением A/I можно оценить как обладающие превосходными эффекторными функциями. Активность связывания исходной Fc-области и варианта Fc-области с рецептором Fcγ может быть представлена значением  $K_D$ ,  $k_d$  или количеством связывания Fc-области с рецептором Fcγ на единицу количества. Соотношение A/I может быть выражено с использованием значений  $K_D$ ,  $k_d$  или количества связывания следующим образом: [значение  $K_D$  для ингибирующего рецептора Fcγ]/[значение  $K_D$  для активирующего рецептора Fcγ], [значение  $k_d$  для ингибирующего рецептора Fcγ]/[значение  $k_d$  для активирующего рецептора Fcγ] или [количество связывания с активирующим рецептором Fcγ]/[количество связывания с ингибирующим рецептором Fcγ].

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения соотношение A/I варианта Fc-области настоящего изобретения увеличивается в 1,1 раза или более, в 1,2 раза или более, в 1,3 раза или более, в 1,4 раза или более, в 1,5 раза или более, в 1,6 раза или более, 1,7 раза и более, 1,8 раза и более, 1,9 раза и более, 2 раза и более, 3 раза и более, 4 раза и более, 5 раз и более, 6 раз и более,

7 раз и более, 8 раз и более, 9 раз и более, 10 раз и более, 20 раз и более, 30 раз и более, 40 раз и более, 50 раз и более, 60 раз и более, 70 раз и более, 80 раз и более, 90 раз и более, 100 раз и более, 200 раз и более, 300 раз и более, 400 раз и более, 500 раз и более, 600 раз и более, 700 раз и более, 800 раз и более, 900 раз и более, 1000 раз и более, 2000 раз или более, 3000 раз или более, 4000 раз или более, 5000 раз или более, 6000 раз или более, 7000 раз или более, 8000 раз или более, 9000 раз или более или 10000 раз или более по сравнению с исходной Fc-областью. В другом варианте осуществления настоящего изобретения соотношение A/I варианта Fc-области настоящего изобретения равно 10 или выше, 20 или выше, 30 или выше, 40 или выше, 50 или выше, 60 или выше, 70 или выше, 80 или выше, 90 или выше, 100 или выше, 200 или выше, 300 или выше, 400 или выше, 500 или выше, 600 или выше, 700 или выше, 800 или выше, 900 или выше, 1000 или выше, 2000 или выше, 3000 или выше, 4000 или выше, 5000 или выше, 6000 или выше, 7000 или выше, 8000 или выше, 9000 или выше, 10000 или выше, 11000 или выше, 12000 или выше, 13000 или выше, 14000 или выше, или 15000 или выше. В еще одном из вариантов осуществления настоящего изобретения соотношение A/I представляет собой отношение активности связывания FcγRIa к активности связывания FcγRIIb, отношение активности связывания FcγRIIa к активности связывания FcγRIIb, отношение активности связывания FcγRIIIa к активности связывания FcγRIIb или отношение [суммы или среднего значения двух или трех активностей связывания с FcγRIa, связывания с FcγRIIa и активности связывания с FcγRIIIa] к активности связывания с FcγRIIb. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения FcγRIIa представляет собой FcγRIIa R, FcγRIIa H или оба. Таким образом, активность связывания с FcγRIIa представляет собой активность связывания с FcγRIIa R, активность связывания с FcγRIIa H или сумму или среднее их обоих. В определенном варианте осуществления FcγRIIIa представляет собой FcγRIIIa F, FcγRIIIa V или оба. Таким образом, активность связывания с FcγRIIIa представляет собой активность связывания с FcγRIIIa F, активность связывания с FcγRIIIa V или сумму или среднее их обоих.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области настоящего изобретения содержит изменения аминокислотной последовательности в следующих положениях:

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

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

5 В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положении 326 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области

10 настоящего изобретения дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положении 236 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области настоящего изобретения

15 дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положении 332 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области настоящего изобретения дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положении 330 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области настоящего изобретения

20 дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положении 332 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положении 330 согласно нумерации EU

25 аминокислотной последовательности в положении 330 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области. Альтернативно, изменения аминокислотной последовательности, описанные в международных публикациях WO2013/002362 и WO2014/104165, также могут быть аналогичным образом использованы в настоящем изобретении.

30 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области настоящего изобретения содержит изменения аминокислотной последовательности в следующих положениях:

(i) положениях 234, 235, 236, 239, 268, 270 и 330 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области; и

(ii) положениях 270, 298, 326, 330 и 334 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положении 326 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области. В другом варианте осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положении 236 в соответствии с нумерацией EU во втором полипептиде исходной Fc-области. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положении 332 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области. В другом варианте осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению дополнительно содержит изменение аминокислотной последовательности в положении 332 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения изменения аминокислотной последовательности, описанные в WO 2013/002362 и WO 2014/104165, также используются в настоящем изобретении аналогичным образом.

В некоторых объектах варианты Fc-области по настоящему изобретению обладают улучшенной стабильностью по сравнению с исходной Fc-областью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стабильность представляет собой термодинамическую стабильность. О термодинамической стабильности полипептида можно судить, например, используя значение  $T_m$  в качестве индикатора. Значения  $T_m$  можно измерить с использованием методов, известных специалистам в данной области, таких как круговой дихроизм (CD – circular dichroism), дифференциальный сканирующий калориметр (DSC – differential scanning calorimeter) и дифференциальная сканирующая флуориметрия (DSF – differential scanning fluorimetry). В одном варианте осуществления настоящего изобретения в варианте Fc-области по настоящему изобретению значение  $T_m$  области CH<sub>2</sub> увеличивается на 0,1 градуса или более, 0,2 градуса или более, 0,3 градуса или более, 0,4 градуса или более, 0,5 градуса или более, 1 градус или более, 2 градуса или более, 3 градуса или более, 4

градуса или более, 5 градусов или более, или 10 градусов или более по сравнению со значением  $T_m$  в исходной Fc-области.

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

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

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

В некоторых объектах настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению обладает повышенной активностью связывания с FcRn

при кислотном pH. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения кислотный pH означает величину pH от 4,0 до 6,5. В других вариантах осуществления настоящего изобретения кислотный pH представляет собой по меньшей мере одну величину, выбранную из группы, состоящей из pH 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 и 6,5. В вариантах осуществления настоящего изобретения кислотный pH составляет величину pH 5,8.

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

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

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению содержит изменения аминокислотной последовательности в положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 326 и 334 согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению содержит изменения аминокислотной последовательности в положениях (i) 234, 235, 236, 239, 268, 270 и 298 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области и в положениях (ii) 270, 298, 326 и 334 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области. В другом варианте осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению содержит изменения аминокислотной последовательности в положениях (i) 234, 235, 236, 239, 268, 270, 298 и 326 согласно нумерации EU в первом полипептиде

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

В одном варианте осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области настоящего изобретения содержит изменения аминокислотной последовательности в положениях 234, 235, 236, 239, 268, 270, 298, 326, 330 и 334 согласно нумерации EU. В другом варианте осуществления настоящего изобретения вариант области Fc настоящего изобретения содержит изменения аминокислотной последовательности (i) в положениях 234, 235, 236, 239, 268, 270, 298 и 330 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области и (ii) в положениях 270, 298, 326, 330 и 334 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению содержат изменения аминокислотной последовательности в положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326 и 334 по нумерации EU. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области содержит изменения аминокислотной последовательности в (i) положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298 и 307 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области и в (ii) положения 250, 270, 298, 307, 326 и 334 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области. В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению содержит изменения аминокислотной последовательности в (i) положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307 и 326 согласно нумерации EU в первом полипептиде. исходной Fc-области и в (ii) положения 236, 250, 270, 298, 307, 326 и 334 согласно EU-нумерации во втором полипептиде исходной Fc-области.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области настоящего изобретения содержит изменения аминокислотной последовательности в положениях 234, 235, 236, 239, 268, 270, 298, 326, 330, 332 и 334 согласно нумерации EU. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области настоящего изобретения содержит изменения аминокислотной последовательности в (i) положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 330 и 332 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области и в (ii) положениях 236, 250, 270, 298, 307,



326, 330, 332 и 334 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области. В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области настоящего изобретения содержит изменения аминокислотной последовательности в (i) положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307 и 326 в соответствии с нумерацией ЕС в первом полипептиде исходной Fc-области и (ii) положениях 236, 250, 270, 298, 307, 326, 330, 332 и 334 согласно нумерации ЕС во втором полипептиде родительской Fc-области.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области настоящего изобретения содержит изменения аминокислотной последовательности в положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326, 332 и 334 согласно нумерации EU. В другом определенном варианте осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области настоящего изобретения содержит изменения аминокислотной последовательности в (i) положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326 и 332 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной области Fc и в (ii) положениях 236, 250, 270, 298, 307, 326, 332 и 334 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области настоящего изобретения содержит изменения аминокислотной последовательности в положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326, 332 и 334 согласно нумерации EU. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области настоящего изобретения содержит изменения аминокислотной последовательности в (i) положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307 и 332 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области и в (ii) положениях 250, 270, 298, 307, 326, 332 и 334 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области настоящего изобретения содержит изменения аминокислотной последовательности в положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307, 326, 330 и 334 согласно нумерации EU. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области настоящего изобретения содержит изменения аминокислотной последовательности в (i) положениях 234, 235, 236, 239, 250, 268, 270, 298, 307 и 330 в соответствии с

нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области и в (ii) положениях 250, 270, 298, 307, 326, 330 и 334 согласно EU-нумерации во втором полипептиде исходной Fc-области.

5 В других вариантах осуществления настоящего изобретения варианты Fc-областей по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одно изменение аминокислотной последовательности, выбранное из группы, состоящей из: (i) Tyr или Phe в положении 234, Gln или Tyr в положении 235, Trp в положении 236, Met в положении 239, Val в положении 250, Asp в положении 268, Glu в положении 270, в положении 298, Pro в положении 307, 10 Asp в положении 326, Met в положении 330, Glu Met в положении 332 в соответствии с нумерацией EU в первом полипептиде исходной Fc-области; и (ii) Ala в положении 236, Val в положении 250, в положении 270, в положении 298, Pro в положении 307, Asp в положении 326, Met или Lys в положении 330, Asp или Glu в положении 332, Glu в положении в соответствии с нумерацией EU 15 во втором полипептиде исходной Fc-области.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения вариант Fc-области по настоящему изобретению дополнительно содержит любое из изменений аминокислотной последовательности (a)-(e), приведенных ниже:

20 (a) Lys в положении 356 согласно EU-нумерации в первом полипептиде исходной Fc-области и Glu в положении 439 согласно EU-нумерации во втором полипептиде исходной Fc-области;

(б) Glu в положении 439 согласно EU-нумерации в первом полипептиде исходной области Fc и Lys в положении 356 согласно EU-нумерации во втором полипептиде исходной Fc-области;

25 (в) Trp в положении 366 в соответствии с EU-нумерацией в первом полипептиде исходной Fc-области и Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407 в соответствии с EU-нумерацией во втором полипептиде исходной Fc-области;

30 (г) Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407 согласно EU-нумерации в первом полипептиде исходной Fc-области и Trp в положении 366 согласно EU-нумерации во втором полипептиде исходной Fc-области;

(д) Cys в положении 349 и Trp в положении 366 согласно EU-нумерации в первом полипептиде исходной области Fc и Cys в положении 356, Ser в

положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407 согласно EU-нумерации во втором полипептиде исходной Fc-области;

5 (e) Cys в положении 356, Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407 согласно EU-нумерации в первом полипептиде исходной Fc-области и Cys в положении 349 и Trp в положении 366 согласно EU-нумерации во втором полипептиде исходной Fc-области.

10 В других объектах варианты Fc-области в настоящем изобретении дополнительно содержат любые изменения аминокислотной последовательности от (a) до (г), приведенные ниже, в первом полипептиде и/или втором полипептиде исходной Fc-области:

(a) Ala в положении 434 согласно нумерации EU;

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

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

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

20 В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения полипептид, содержащий вариант Fc-области по настоящему изобретению, представляет собой константную область тяжелой цепи антитела.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает полипептид, содержащий любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 280, 281, 283-305, 308, 309 и 311-333.

25 В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 308 и 309, константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 311 и 312, константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 313 и 314, константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 315 и 316, константные области  
30 тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 317 и 318, константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 319 и 320, константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 321 и 322, константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 323 и 324, константные области тяжелой цепи,

содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 325 и 326, константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 327 и 328, константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 330 и 331, константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 332 и 333, константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 343 и 344, константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 345 и 347, константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 348 и константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 364 и 366, и константные области тяжелой цепи, содержащие полипептидные цепи SEQ ID NO: 350.

Обозначение «рецепторы Fc $\gamma$ » (в настоящем описании называемые рецепторами Fc $\gamma$ , Fc $\gamma$ R или Fc $\gamma$ R) относится к рецепторам, которые могут связываться с Fc-областью моноклональных антител IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и практически означают любого представителя семейства белков, кодируемых генами рецептора Fc $\gamma$ . У человека это семейство включает Fc $\gamma$ RI (CD64), в том числе изоформы Fc $\gamma$ RIa, Fc $\gamma$ RIb и Fc $\gamma$ RIc; Fc $\gamma$ RII (CD32), включая изоформы Fc $\gamma$ RIIa (включая аллотипы H131 (тип H) и R131 (тип R)), Fc $\gamma$ RIIb (включая Fc $\gamma$ RIIb-1 и Fc $\gamma$ RIIb-2) и Fc $\gamma$ RIIc; и Fc $\gamma$ RIII (CD16), включая изоформы Fc $\gamma$ RIIIa (включая аллотипы V158 и F158) и Fc $\gamma$ RIIIb (включая аллотипы Fc $\gamma$ RIIIb-NA1 и Fc $\gamma$ RIIIb-NA2), и любые рецепторы Fc $\gamma$ R человека, изоформы или аллотипы Fc $\gamma$ R, которые еще предстоит обнаружить, но не ограничиваются ими.

Сообщалось, что Fc $\gamma$ RIIb1 и Fc $\gamma$ RIIb2 являются вариантами сплайсинга Fc $\gamma$ RIIb человека. Кроме того, сообщалось о варианте сплайсинга, названном Fc $\gamma$ RIIb3 (*J Exp Med*, 1989, 170:1369-1385). В дополнение к этим вариантам сплайсинга Fc $\gamma$ RIIb человека включает все варианты сплайсинга, зарегистрированные в NCBI, а именно NP\_001002273.1, NP\_001002274.1, NP\_001002275.1, NP\_001177757.1 и NP\_003992.3. Кроме того, Fc $\gamma$ RIIb человека включает в себя все описанные ранее генетические полиморфизмы, а также Fc $\gamma$ RIIb (*Arthritis Rheum.* 2003, 48:3242-3252; Копо с соавт., *Hum. Mol. Genet.* 2005, 14:2881-2892; и Куогою с соавт., *Arthritis Rheum.* 2002, 46:1242-1254), и каждый генетический полиморфизм, о котором будет известно в будущем.

У Fc $\gamma$ RIIa существует два аллотипа: в одном аминокислота в положении 131 Fc $\gamma$ RIIa представляет собой гистидин (тип H), а в другом аминокислота в

положении 131 заменена аргинином (тип R) (Warrmerdam, *J. Exp. Med.* 1990, 172: 19-25).

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

10 Аминокислотная последовательность Fc $\gamma$ RI человека представлена в SEQ ID NO: 131 (NP\_000557.1); аминокислотная последовательность Fc $\gamma$ RIIa человека представлена в SEQ ID NO: 132 (AAH20823.1), SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143 или SEQ ID NO: 150; аминокислотная последовательность Fc $\gamma$ RIIb человека представлена в SEQ ID NO: 151 (AAI46679.1), SEQ ID NO: 169 или SEQ ID NO: 172; аминокислотная последовательность Fc $\gamma$ RIIIa человека представлена в SEQ ID NO: 174 (AAH33678.1), SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176  
15 или SEQ ID NO: 177; и аминокислотная последовательность Fc $\gamma$ RIIIb человека представлена в SEQ ID NO: 178 (AAI28563.1).

В отличие от рецептора Fc $\gamma$ , принадлежащего к надсемейству иммуноглобулинов, FcRn человека структурно сходен с полипептидами главного  
20 комплекса гистосовместимости (MHC – major histocompatibility complex) класса I, демонстрируя 22-29% идентичности последовательности с молекулами MHC класса I (Ghetie с соавт., *Immunol. Today*, 1997, 18 (12):592-598). FcRn экспрессируется в виде гетеродимера, состоящего из растворимой  $\beta$ -цепи или легкой цепи ( $\beta$ 2-микроглобулина), образующей комплекс с трансмембранной  $\alpha$ -цепью или тяжелой цепью. Как и MHC,  $\alpha$ -цепь FcRn содержит три внеклеточных  
25 домена ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 и  $\alpha$ 3), и его короткий цитоплазматический домен закрепляет белок на поверхности клетки. Домены  $\alpha$ 1 и  $\alpha$ 2 взаимодействуют с FcRn-связывающим доменом Fc-области антитела (Raghavan с соавт., *Immunity*, 1994, 1: 303-315). Аминокислотная последовательность FcRn человека представлена в SEQ ID NO: 179 (NP\_004098.1), а аминокислотная последовательность  $\beta$ 2-  
30 микроглобулина представлена в SEQ ID NO: 180 (NP\_004039.1).

Обозначение «исходная Fc-область» в настоящем изобретении относится к Fc-области до внесения изменений в аминокислотную последовательность, описанных в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения исходная Fc-область означает Fc-область нативной

последовательности (или Fc-область нативного антитела). Антитело включает, например, IgA (IgA1, IgA2), IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) и IgM.

Антитело может быть получено от человека или обезьяны (например, яванского макака, макаки-резуса, мартышки, шимпанзе или бабуина). Нативное антитело

5 может включать встречающиеся в природе мутации. Множество аллотипических последовательностей IgG, обусловленных генетическим полиморфизмом, описано в «Sequences of proteins of immunological interest», публикация NIH № 91-3242, и любая из них может быть использована в настоящем изобретении.

В частности, для IgG1 человека аминокислотная последовательность в  
10 положениях с 356 по 358 (нумерация EU) может быть либо DEL, либо EEM. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения исходная Fc-область представляет собой Fc-область, полученную из константной области тяжелой цепи IgG1 человека (SEQ ID NO: 249), IgG2 человека (SEQ ID NO: 250), IgG3 человека (SEQ ID NO: 251) или IgG4 человека (SEQ ID NO: 252). В другом  
15 варианте осуществления настоящего изобретения исходная Fc-область представляет собой Fc-область, полученную из константной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 158 или SEQ ID NO: 334. В других вариантах осуществления настоящего изобретения исходная Fc-область может представлять собой Fc-область, полученную путем добавления изменения  
20 (изменений) аминокислотной последовательности, отличных от изменения (изменений), описанных в настоящем изобретении, к Fc-области нативной последовательности (Fc-области контрольного варианта последовательности). Fc-область нативной последовательности обычно представляет собой гомодимер, состоящий из двух идентичных полипептидных цепей.

25 Кроме того, изменения аминокислотной последовательности, выполненные для других целей, могут быть объединены с описанном в настоящем изобретении вариантом Fc-области. Например, могут быть добавлены замещения, которые улучшают активность по связыванию FcRn (Hinton *с соавт.*, *J. Immunol.* 2006, 176(1):346-356; Dall'Acqua *с соавт.*, *J. Biol. Chem.* 2006,  
30 281(33): 23514-23524; Petkova *с соавт.*, *Intl. Immunol.* 2006, 18(12): 1759-1769; Zalevsky *с соавт.*, *Nat. Biotechnol.* 2010, 28(2):157-159; WO 2006/019447; WO 2006/053301 и WO 2009/086320), и замещения аминокислот для улучшения гетерогенности или стабильности антител (WO 2009/041613). В другом варианте полипептиды, способные стимулировать клиренс антигена, которые описаны в

WO 2011/122011, WO 2012/132067, WO 2013/046704 или WO 2013/180201, полипептиды со свойством специфического связывания с тканью-мишенью, которые описаны в WO 2013/180200, полипептиды со свойством многократного связывания с множеством молекул антигена, которые описаны в WO 5 2009/125825, WO 2012/073992 или WO 2013/047752, можно комбинировать с вариантом Fc-области, описанным в настоящем изобретении. В другом варианте с целью придания связывающей способности другим антигенам изменения аминокислотной последовательности, описанные в EP 1752471 и EP 1772465, могут быть объединены в СНЗ варианта Fc-области, описанного в настоящем 10 изобретении. В другом варианте с целью увеличения удерживания в плазме, изменения аминокислотной последовательности, которые снижают рI константной области (WO 2012/016227), могут быть объединены с вариантом Fc-области, описанный в настоящем изобретении. В другом варианте с целью стимуляции поглощения клетками изменения аминокислотной 15 последовательности, повышающие рI константной области (WO 2014/145159), могут быть объединены с описанным в настоящем изобретении вариантом Fc-области. В другом варианте с целью стимуляции элиминации молекулы-мишени из плазмы изменения аминокислотной последовательности, повышающие рI константной области (WO 2016/125495), могут быть объединены в вариант Fc- 20 области, описанный в настоящем изобретении. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения такое изменение может включать, например, замену по меньшей мере по одному положению, выбранному из группы, состоящей из положений 311, 343, 384, 399, 400 и 413 согласно EU-нумерации. В другом варианте осуществления настоящего изобретения такая 25 замена может представлять собой замену аминокислоты на Lys или Arg в каждом положении.

Приведенные способы получения гетеродимерных антител не являются ограничительными, поскольку такие антитела можно получать по технологии «выступ-во-впадину» (см., например, *Nat. Biotechnol.*, 1998, 16, 677-681, и 30 US 5731168) или путем разработки электростатических управляющих эффектов (WO2006/106905, WO2009/089004A1, *J. Biol. Chem.*, 2010, 285, 19637-19646 и т.д.).

Для ассоциации гетерологичных полипептидов, содержащих варианты Fc-областей, можно применить метод подавления случайной ассоциации

гомологичных полипептидов, содержащих варианты Fc-областей, путем введения электростатического отталкивания на границу раздела доменов СН2 или СН3 Fc-области, как описано в WO 2006/106905.

5 Примеры аминокислотных остатков, контактирующих на границе раздела домена СН2 или СН3 Fc-области, включают остаток в положении 356 (нумерация EU), остаток в положении 439 (нумерация EU), остаток в положении 357 (нумерация EU), остаток в положении 370 (нумерация EU), остаток в положении 399 (нумерация EU) и остаток в положении 409 (нумерация EU) в домене СН3.

10 Более конкретно, например, может быть получена Fc область, в которой одна-три пары аминокислотных остатков, выбранных из пунктов (1)-(3), показанных ниже, имеют одинаковый заряд: (1) аминокислотные остатки в положениях 356 и 439 (нумерация EU) в домене СН3; (2) аминокислотные остатки в положениях 357 и 370 (нумерация EU) в домене СН3; и (3)  
15 аминокислотные остатки в положениях 399 и 409 (нумерация EU) в домене СН3.

Кроме того, можно получить гетерологичные полипептиды, содержащие варианты Fc-областей, в которых от одной до трех пар аминокислотных остатков, выбранных из пунктов (1)-(3), указанных выше, имеют одинаковый заряд в домене СН3 первой области Fc, и пары аминокислотных остатков,  
20 выбранных в вышеуказанной первой Fc-области, также имеют одинаковый заряд в домене СН3 второй Fc-области при условии, что заряды в первой и второй Fc-областях противоположны.

Например, в вышеуказанных Fc-областях отрицательно заряженные аминокислотные остатки предпочтительно выделяются из глутаминовой кислоты (E) и аспарагиновой кислоты (D), а положительно заряженные аминокислотные  
25 остатки предпочтительно выделяются из лизина (K), аргинина (R) и гистидина (H).

Другие известные методы могут быть дополнительно использованы для ассоциации гетерологичных полипептидов, содержащих варианты Fc-областей.  
30 В частности, такой метод осуществляют путем замены боковой цепи аминокислоты, присутствующей в одной из Fc-областей, на более крупную боковую цепь (выступ, то есть «выпуклость») и замены боковой цепи аминокислоты, присутствующей в Fc- области, на меньшую боковую цепь (впадину, то есть «отверстие»), чтобы поместить выступ во впадину. Это может



способствовать эффективной ассоциации между полипептидами, содержащими Fc-область, имеющими разные аминокислотные последовательности друг от друга (WO 1996/027011; Ridgway с соавт., *Prot. Eng.* 1996, 9, 617-621; Merchant с соавт., *Nat. Biotech.* 1998, 16, 677-681).

5 Кроме того, для гетерологичной ассоциации полипептидов, содержащих варианты Fc-областей, также можно использовать другие известные методы. Ассоциацию полипептидов, содержащих Fc-область, можно эффективно индуцировать с использованием гетеродимеров домена CH3 со сконструированным обменом цепей (Davis с соавт., *Prot. Eng. Des. & Sel.*, 2010, 10 23, 195-202). Этот метод также можно использовать для эффективной индукции ассоциации между полипептидами, содержащими Fc-область, имеющими разные аминокислотные последовательности.

Кроме того, также можно использовать методы получения гетеродимеризованных антител, в которых используется ассоциация антитела 15 CH1 и CL, а также ассоциация VH и VL, которые описаны в WO 2011/028952.

Как и в случае со способом, описанным в WO 2008/119353 и WO 2011/131746, также можно использовать методику получения гетеродимеризованных антител путем предварительного получения двух типов гомодимеризованных антител, инкубации антител в восстанавливающих 20 условиях для их диссоциации и обеспечения возможности повторной ассоциации.

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

25 При одновременной экспрессии двух полипептидов, содержащих вариант Fc-области, которые имеют разные аминокислотные последовательности, для получения полипептидов, содержащих гетерологичные варианты Fc-областей, полипептиды, содержащие гомологичные варианты Fc-областей, также обычно получают в виде примесей. В таких случаях полипептиды, содержащие 30 гетерологичные варианты Fc-областей, могут быть эффективно получены путем их отделения и очистки от полипептидов, содержащих гомологичные варианты Fc-областей, с использованием известных технологий. Сообщалось о методе эффективного отделения и очистки гетеродимеризованных антител от гомодимеризованных антител с использованием ионообменной хроматографии

путем внесения изменений аминокислотной последовательности в переменные области двух типов тяжелых цепей антител для создания различий в изоэлектрических точках между гомодимеризованными антителами и гетеродимеризованными антителами (WO 2007/114325). Сообщалось о другом методе очистки гетеродимеризованных антител с использованием хроматографии с белком А путем конструирования гетеродимеризованного антитела, содержащего два типа тяжелых цепей, полученных из IgG2a мыши, который связывается с белком А, и IgG2b крысы, который не связывается с белком А (WO 1998/050431 и WO 1995/033844).

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

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

20 Число изменений аминокислотной последовательности, интродуцированных в Fc-область, не ограничивают. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения их может быть 1, 2 или менее, 3 или менее, 4 или менее, 5 или менее, 6 или менее, 8 или менее, 10 или менее, 12 или менее, 14 или менее, 16 или менее, 18 или менее, 20 или менее, 22 или менее, 24 или менее, 26 или менее, 28 или менее, или 30 или менее.

25 В одном объекте настоящее изобретение относится к способам получения полипептида, содержащего вариант Fc-области. В других объектах настоящее изобретение относится к способам получения полипептида, содержащего вариант Fc-области, функция которого была изменена. В дополнительных объектах настоящее изобретение предусматривает способы модификации функции полипептида, содержащего Fc-область. В некоторых объектах полипептиды представляют собой антитела. В некоторых объектах полипептиды представляют собой слитые белки Fc. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения эти способы включают введение по меньшей мере одной замены аминокислоты в исходную Fc-область. В определенных вариантах

осуществления настоящего изобретения эти способы включают: (i) получение полипептида (полипептидов), включающих исходную Fc-область; и (ii) введение по меньшей мере одного изменения аминокислотной последовательности в исходную Fc-область. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения эти способы могут дополнительно включать (iii) измерение функции полипептида (полипептидов), содержащих вариант Fc-области. Нативная Fc-область обычно состоит из двух идентичных полипептидных цепей. изменения аминокислотной последовательности в исходной Fc-области могут быть введены либо в одну из двух полипептидных цепей исходной Fc-области, либо в обе полипептидные цепи.

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

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

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения изменения аминокислотной последовательности, используемые в способах получения по настоящему изобретению, выбирают из любых одиночных изменений, выбранных из изменений аминокислотной последовательности, которые могут содержаться в вышеупомянутых вариантах Fc-областей, комбинаций отдельных изменений или комбинированных изменений, перечисленные в табл. 39-44.

Fc-область может быть получена повторным элюированием фракции, адсорбированной на колонке с белком А, после частичного расщепления моноклональных антител IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или подобных им антител с

использованием протеазы, такой как пепсин. Протеаза определенным образом не ограничена, если она может расщеплять полноразмерное антитело таким образом, что Fab и F(ab')<sub>2</sub> продуцируются ограниченно путем соответствующего установления условий ферментативной реакции, таких как рН, примерами являются пепсин и папаин.

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

10 В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, содержащий вариант Fc-области настоящего изобретения. Такая нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую первый полипептид варианта Fc-области, и/или аминокислотную последовательность, содержащую второй полипептид варианта Fc-области. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен один или несколько векторов (например, векторов экспрессии), содержащих такую нуклеиновую кислоту. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В одном из таких вариантов осуществления настоящего изобретения клетка-хозяин содержит (например, трансформирована с помощью): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую первый полипептид варианта Fc-области, и аминокислотную последовательность, содержащую второй полипептид варианта Fc-области, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую первый полипептид варианта Fc-области, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую второй полипептид варианта Fc-области. В одном варианте осуществления настоящего изобретения клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой яичника китайского хомячка (СНО) или лимфоидной клеткой (например, клеткой Y0, NS0, Sp2/0). В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ получения полипептида,

содержащего вариант Fc-области настоящего изобретения, при этом способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, содержащий вариант Fc-области настоящего изобретения, в условиях, подходящих для экспрессии полипептида и, 5 необязательно, выделение полипептида из клетки-хозяина (или среды для культивирования клеток-хозяев).

Для рекомбинантного получения полипептида, содержащего вариант Fc-области настоящего изобретения, нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, выделяют и встраивают в один или несколько векторов для 10 дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такую нуклеиновую кислоту можно легко выделить и секвенировать с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими Fc-область антитела).

15 Соответствующие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих полипептид, содержащий вариант Fc-области настоящего изобретения, включают прокариотические или эукариотические клетки.

Помимо прокариотов, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих полипептид, содержащий вариант Fc-области 20 настоящего изобретения, являются эукариотические микробы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были «гуманизированы», что привело к получению Fc-области антитела с частичным или полностью человеческим паттерном гликозилирования. См. публикации Gerngross, *Nat. Biotech.* 2004, 22, 1409-1414; 25 и Li с соавт., *Nat. Biotech.* 2006, 24, 210-215.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированной Fc-области антитела также происходят от многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых, идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы, 30 которые можно использовать в сочетании с клетками насекомых, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Культуры клеток растений также могут быть использованы в качестве клеток-хозяев. См., например, US5959177, US6040498, US6420548, US7125978 и US6417429.

В качестве клеток-хозяев также можно использовать клетки позвоночных. Например, могут оказаться полезными линии клеток млекопитающих, адаптированные к росту в суспензии. Другими примерами полезных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 клеток почки обезьяны, трансформированная вирусом SV40 (COS-7); линия клеток эмбриональной почки человека (клетки 293 или 293, как описано, например, у *Graham* с соавт., *J. Gen Virol.* 1977, 36: 59); клетки почки детеныша хомячка (ВНК); клетки Сертоли мыши (клетки ТМ4, как описано, например, в *Mather, Biol. Reprod.* 1980, 23: 243-251); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени буйволиной крысы (BRL 3A); клетки легких человека (W138); клетки печени человека (Нер G2); опухоль молочной железы мыши (ММТ 060562); TRI-клетки, как описано, например, у *Mather* с соавт., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1982, 383: 44-68; клетки MRC 5; и клетки FS4. К другим применимым линиям клеток-хозяев млекопитающих относятся клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR-CHO (*Urlaub* с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980, 77: 4216); и линии клеток миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0.

Описанные в настоящем изобретении методы анализа или различные методы измерения, известные в данной области, можно использовать для идентификации или скрининга вариантов Fc-областей, представленных в настоящем описании, или для выяснения их физических или химических свойств или биологической активности.

Анализы для определения связывающей активности полипептида, содержащего вариант Fc-области, по отношению к одному или нескольким членам семейства FcR, описаны в настоящем изобретении или иным образом известны в данной области техники. Такие анализы связывания включают, но ими перечень не ограничивается, метод поверхностного плазмонного резонанса, метод скрининга путем гомогенного иммунолюминесцентного анализа (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay – ALPHA), иммуноферментный анализ (ELISA) и сортировку клеток с активированной флуоресценцией (fluorescence activated cell sorting – FACS) (*Lazar* с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (*Lazar* с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (*Lazar* с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103(11): 4005-4010).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения активность связывания полипептида, содержащего вариант Fc-области, с членами семейства FcR можно измерить с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса. Например, различные FcR подвергаются взаимодействию в качестве аналитов с полипептидом, содержащим вариант Fc-области, иммобилизованный или захваченный на сенсорном чипе, с использованием известных методов и реагентов (например, белка А, белка L, белка A/G, белка G, антитела анти-λ цепи, антитела анти-κ цепи, антигенные пептиды и антигенные белки). В другом варианте FcR можно иммобилизовать или захватить на сенсорном чипе, а в качестве аналита можно использовать полипептид, содержащий вариант Fc-области. В результате таких взаимодействий получают сенсорограммы связывания и, анализируя их, можно рассчитать значения констант диссоциации ( $K_D$ ) таких связываний. Более того, разница в значении резонансной единицы (resonance unit – RU) на сенсорограммах до и после взаимодействия с FcR (т.е. количество связывания FcR) может использоваться в качестве индикатора связывающей активности полипептида, содержащего вариант Fc-области к FcR. Кроме того, скорректированное значение, полученное путем деления вышеупомянутого количества связывания FcR на разницу значений RU на сенсорограммах до и после того, как полипептид, содержащий вариантный участок Fc, иммобилизован или захвачен на сенсорном чипе (т.е. связываемое количество полипептида, содержащего вариант Fc-области) (то есть поправочное значение представляет собой количество связывания FcR на единицу количества полипептида, содержащего вариант Fc-области) может быть использовано в качестве индикатора связывающей активности.

Любой из полипептидов, содержащих вариант Fc-области, представленный в настоящем изобретении, можно использовать в терапевтических способах.

В одном из объектов предложен полипептид, содержащий вариант Fc-области, для применения в качестве лекарственного средства. В дополнительных объектах предложен полипептид, содержащий вариант Fc-области, для применения в лечении опухоли. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен полипептид, содержащий вариант Fc-области, для применения в способе лечения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагают полипептид, содержащий вариант Fc-области, для применения в способе лечения индивидуума, имеющего

опухоль, включающем введение индивидууму эффективного количества полипептида, содержащего вариант Fc-области. В одном из таких вариантов осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента. В других вариантах осуществления настоящего изобретения предлагают полипептид, содержащий вариант Fc-области, для применения при повреждении клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагают полипептид, содержащий вариант Fc-области, для использования в способе повреждения клеток у индивидуума, включающем введение индивидууму эффективного количества полипептида, содержащего вариант Fc-области, для повреждения клеток.

«Индивидуумом» согласно любому из вышеописанных вариантов осуществления настоящего изобретения предпочтительно является человек.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения опухоль представляет собой солидную опухоль. В солидной опухоли опухолевые клетки обычно размножаются, образуя популяцию, и опухолевая ткань формируется преимущественно этими клетками. Более того, опухолевые ткани живых организмов часто инфильтрируются иммунными клетками, такими как лимфоциты, которые также составляют часть опухолевых тканей. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения повреждение клеток вызывается активностью ADCC, активностью CDC или активностью ADCP.

В еще одном объекте по настоящему изобретению предусматривают применение полипептида, содержащего вариант Fc-области, при получении или приготовлении лекарственного средства. В одном варианте осуществления настоящего изобретения лекарственное средство предназначено для лечения опухоли. В другом варианте осуществления настоящего изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения опухоли, включающем введение индивидууму, имеющему опухоль, эффективного количества лекарственного средства. В одном из таких вариантов осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента. В другом варианте лекарственное средство предназначено для повреждения клеток. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения лекарственное средство предназначено



для повреждения клеток. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе повреждения клеток у индивидуума, включающем введение индивидууму эффективного количества лекарственного средства для повреждения клеток.

5 «Индивидуум» согласно любому из вышеописанных вариантов осуществления настоящего изобретения может быть человеком.

В другом объекте настоящее изобретение предусматривает способ лечения опухоли. В одном варианте осуществления настоящего изобретения способ включает введение индивидууму, имеющему такую опухоль, эффективного количества полипептида, содержащего вариант Fc-области. В одном из таких вариантов осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента. «Индивидуумом» согласно любому из вышеописанных вариантов осуществления настоящего изобретения  
15 может быть человек.

В другом объекте настоящее изобретение предусматривает способ повреждения клеток у индивидуума. В одном варианте осуществления настоящего изобретения способ включает введение индивидууму эффективного количества полипептида, содержащего вариант Fc-области, для повреждения  
20 клеток. В одном варианте осуществления настоящего изобретения «индивидуум» представляет собой человека.

В другом объекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтические составы (фармацевтические композиции), содержащие любой из полипептидов, содержащих вариант Fc-области, представленный в настоящем  
25 описании. В одном варианте осуществления настоящего изобретения вышеупомянутый фармацевтический состав (фармацевтическая композиция) дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. В одном варианте осуществления настоящее изобретение предлагает фармацевтический состав (фармацевтическую композицию) для применения при лечении опухоли.  
30 В одном варианте осуществления настоящее изобретение предлагает фармацевтический состав (фармацевтическую композицию) для применения при повреждении клеток. В другом варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтический состав (фармацевтическая композиция) включает

полипептид, содержащий вариант Fc-области по настоящему изобретению и по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент.

Анти-CTLA-4 антитела, содержащие вариант Fc-области

В одном объекте настоящего изобретения предусматривают выделенные антитела, которые связываются с CTLA-4 и содержат вариант Fc-области. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению содержит вариабельную область, обладающую активностью связывания CTLA-4, зависящей от концентрации аденозинсодержащего соединения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-CTLA-4 антитело по настоящему изобретению содержит вариант Fc-области, содержащий множество изменений аминокислотной последовательности в исходной Fc-области, причем вариант Fc-области содержит аминокислотные изменения в положениях 234, 235, 236, 239, 268, 270, 298, 326, 330 и 334 согласно нумерации EU. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают анти-CTLA-4 антитело, содержащее:

(А) вариабельную область, обладающую активностью связывания CTLA-4, зависящую от концентрации аденозинсодержащего соединения; и

(Б) вариант Fc-области, содержащий множество изменений аминокислотной последовательности в исходной Fc-области,

причем исходная Fc-область состоит из двух полипептидных цепей, причем вариант Fc-области содержит изменения аминокислотной последовательности в следующих положениях:

(i) положениях 234, 235, 236, 239, 268, 270, 298 и 330 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области; и

(ii) положениях 270, 298, 326, 330 и 334 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает анти-CTLA-4 антитело, содержащее первый полипептид Н-цепи SEQ ID NO: 352, второй полипептид Н-цепи SEQ ID NO: 353 и полипептид L-цепи SEQ ID NO: 161. В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает анти-CTLA-4 антитело, содержащее первый полипептид Н-цепи SEQ ID NO: 335, второй полипептид Н-цепи SEQ ID NO: 336 и полипептид L-цепи SEQ ID NO: 161.

### Примеры

Ниже в качестве иллюстрации показаны примеры вариантов осуществления настоящего изобретения. Следует учитывать, что различные другие варианты осуществления настоящего изобретения могут быть реализованы с учетом  
5 указанных выше общих описаний.

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

Считалось, что ипилимумаб оказывает противоопухолевое действие путем  
10 ингибирования подавления активации эффекторных Т-клеток с помощью CTLA-4, экспрессируемого на поверхности эффекторных Т-клеток; однако недавно сообщалось о важности антителозависимой цитотоксической активности (активности ADCC) против Т-клеток, экспрессирующих CTLA-4, и обнаружено, что удаление регуляторных Т-клеток в опухолях и активность ADCC являются  
15 важными механизмами действия противоопухолевого эффекта анти-CTLA-4 антител.

Кроме того, известно, что активность ADCC, обусловленная антителами IgG1, является результатом индукции цитотоксической активности за счет  
20 связывания константной области антитела с FcγR клеток NK и макрофагов, а антитела с константной областью, модифицированной для усиления такого связывания, индуцируют усиленную цитотоксическую активность, оказывающую противоопухолевый эффект.

С другой стороны, сообщалось, что удаление регуляторных Т-клеток во всем организме вызывает системную реакцию, подобную аутоиммунному  
25 заболеванию, и считают, что регуляция баланса между цитотоксической активностью для проявления противоопухолевого эффекта и системным ответом является очень важной задачей.

Более конкретно, предполагалось, что антитело будет проявлять более мощную цитотоксическую активность и способность подавлять системные  
30 реакции, если антитело может прочно связаться с регуляторными Т-клетками или истощенными Т-клетками в микроокружении рака, оказывать мощный противоопухолевый эффект путем удаления регуляторных Т-клеток или истощенных Т-клеток цитотоксической активностью и ограничивают ответ только микроокружением рака. Об антителах с таким механизмом действия пока

не сообщалось. Таким образом, мы фактически создали и проверили антитела (антитела-переключатели CTLA-4), которые действуют против CTLA-4 только локально в опухоли и содержат константную область с усиленным связыванием с FcγR, экспрессируемыми на NK-клетках и макрофагах. Пример 1. Получение переключающих антител против CTLA-4 человека, имеющих  
5 модифицированную Fc-область, которые применяют в различных тестах *in vitro*.

Анти-CTLA-4 переключающие антитела с модифицированной областью Fc (04H1654-KT498/04L1610-lam1//04H1656-HT518/04L1610-lam1, сокращенное название: SW1610-ART12; и 04H1389-Kp473/04L1305-k0MT//04H1389-Hp451/  
10 04L1305-k0MT, сокращенное название: SW1389-ART5+ACT1) получают путем объединения Fc-области, описанной в примерах 6 и 7, в которую введена модификация, и вариательной области переключающего анти-CTLA-4 антитела, полученного в контрольном примере 4.

В одной тяжелой цепи антитела SW1610-ART12 ген тяжелой цепи антитела  
15 04H1654-KT498 (SEQ ID NO: 335), где Gly и Lys на C-конце IgG1 человека (IGHG1\*03) были удалены, CH2-область имеет ту же модификацию, что и Kp498, описанная в контрольном примере 7, CH3-область имеет модификацию, полученную путем гетеродимеризации E356K, описанную в WO 2006/106905, и 04H1654 (SEQ ID NO: 140) получен в качестве вариательной области тяжелой  
20 цепи. Аналогично, ген тяжелой цепи антитела 04H1656-HT518 (SEQ ID NO: 336), где Gly и Lys на C-конце IgG1 человека (IGHG1\*03) удалены, CH2-область имеет ту же модификацию, что и H1518, описанная в контрольном примере 7, CH3-область имеет модификацию K439E, способствующую гетеродимеризации, описанную в WO 2006/106905, и 04H1656 (SEQ ID NO: 141) включена в качестве  
25 полученной вариательной области тяжелой цепи. В качестве легких цепей используют 04L1610-lam1 (SEQ ID NO: 161), причем антитело экспрессируют и очищают способами, известными специалистам в данной области. Для одной тяжелой цепи антитела SW1389-ART5+ACT1 ген тяжелой цепи антитела  
30 04H1389-Kp462 (SEQ ID NO: 337), где Gly и Lys на C-конце IgG1 человека (IGHG1\*03) удалены, CH2-область имеет ту же модификацию, что и Kp462, описанная в контрольном примере 7, CH3-область имеет модификации S354C/T366W, которые способствуют гетеродимеризации, и 04H1389 (SEQ ID NO: 29) включена в качестве вариательной области тяжелой цепи. Кроме того, введена комбинация модификаций, улучшающих кинетику антител в крови,

описанная в *Mabs*, 2017, 9, 844-853. В частности, ген 04H1389-Кр473 (SEQ ID NO: 338), в который внедрена комбинация модификаций N434A/Y436T/Q438R/S440E для усиления связывания с FcRn человека и снижения связывания с ревматоидным фактором в кислых условиях, был введен в СН3-область 04H1389-Кр462. Аналогичным образом, те же самые модификации были введены в тяжелую цепь антитела 04H1389-Нр441 (SEQ ID NO: 339), где Gly и Lys на С-конце IgG1 человека (IGHG1\*03) удалены, СН2-область имеет ту же модификацию, что и H1441, описанную в контрольном примере 7, СН3-область имеет модификации Y349C/T366S/L368A/Y407V, которые способствуют гетеродимеризации, а 04H1389 (SEQ ID NO: 29) включена в качестве вариабельной области тяжелой цепи для получения гена 04H1389-Нр451 (SEQ ID NO: 340). В качестве легких цепей используют 04L1305-k0MT (SEQ ID NO: 275), а антитело экспрессируют и очищают способами, известными специалистам в данной области.

Кроме того, для контрольных антител получены MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT с сокращенным названием «ипилидумаб» и IC17HdK-G1m/IC17L-k0 с сокращенным названием KLH-G1m, имитирующие IgG1 *in vivo*. Используя MDX10D1H-G1m (SEQ ID NO: 210) в качестве тяжелой цепи и MDX10D1L-k0MT (SEQ ID NO: 211) в качестве легкой цепи, ипилидумаб экспрессируют и очищают способами, известными специалистам в данной области. Используя IC17HdK-G1m (SEQ ID NO: 341) в качестве тяжелой цепи и IC17L-k0 (SEQ ID NO: 342) в качестве легкой цепи, KLH-G1m экспрессируют и очищают способами, известными специалистам в данной области. Используя MDX10D1H-G1m (SEQ ID NO: 210) в качестве тяжелой цепи и MDX10D1L-k0MT (SEQ ID NO: 211) в качестве легкой цепи, ипилидумаб экспрессируют и очищают способами, известными специалистам в данной области. Используя IC17HdK-G1m (SEQ ID NO: 341) в качестве тяжелой цепи и IC17L-k0 (SEQ ID NO: 342) в качестве легкой цепи, KLH-G1m экспрессируют и очищают способами, известными специалистам в данной области.

В настоящем описании гетеродимеризованные антитела (антитела, имеющие два разных полипептида тяжелой цепи и/или два разных полипептида легкой цепи) названы в соответствии со следующим правилом: (вариабельная область первой тяжелой цепи) - (константная область первой тяжелой цепи) / (вариабельная область первой легкой цепи) - (константная область первой

легкой цепи) // (вариабельная область второй тяжелой цепи) - (константная область второй тяжелой цепи) / (вариабельная область второй легкой цепи) - (константная область второй легкой цепи). Например, название антитела 04Н1654-КТ456/04L1610-lam1//04Н1656-НТ446/04L1610-lam1 указывает на то, что вариабельной областью первой тяжелой цепи антитела является 04Н1654, константной областью первой тяжелой цепи является КТ456, вариабельной областью первой легкой цепи – 04L1610, константной областью первой легкой цепи - lam1, вариабельной областью второй тяжелой цепи - 04Н1656, константной областью второй тяжелой цепи - НТ446, вариабельной областью второй легкой цепи - 04L1610, и константной областью второй легкой цепи - lam1.

Соответствие между названиями каждой константной области тяжелой цепи, используемой в настоящем описании, и следующими последовательностями следующее: КТ498 (SEQ ID NO: 343), НТ518 (SEQ ID NO: 344), Кр462 (SEQ ID NO: 345), Кр473 ( SEQ ID NO: 346), Нр441 (SEQ ID NO: 347), Нр451 (SEQ ID NO: 348), КТ456 (SEQ ID NO: 350) и НТ446 (SEQ ID NO: 351).

Для одной тяжелой цепи антитела SW1610-ART4 ген тяжелой цепи антитела 04Н1654-КТ456 (SEQ ID NO: 352), где Gly и Lys на С-конце IgG1 человека (IGHG1\*03) удалены, CH2-область имеет ту же модификацию, что и Кп456, описанная в контрольном примере 7, CH3-область имеет модификацию E356K, которая способствует гетеродимеризации, описанную в WO 2006/106905 и 04Н1654 (SEQ ID NO: 140), и включена в качестве вариабельной области тяжелой цепи. Аналогично, ген тяжелой цепи антитела 04Н1656-НТ446 (SEQ ID NO: 353), где Gly и Lys на С-конце IgG1 человека (IGHG1\*03) удалены, CH2-область имеет ту же модификацию, что и НТ446, описанная в контрольном примере 7, CH3-область имеет модификацию K439E, которая способствует гетеродимеризации и описана в WO 2006/106905, и 04Н1656 (SEQ ID NO: 141), включенная в качестве вариабельной области тяжелой цепи. В качестве легких цепей используют 04L1610-lam1 (SEQ ID NO: 161), антитело экспрессируют и очищают способами, известными специалистам в данной области.

Пример 2. Оценка *in vivo* эффективности переключающих анти-CTLA-4 антител на моделях мышей, которым трансплантировали различные линии сингенных опухолей.

(2-1) Оценка эффективности лекарственного средства переключающего анти-CTLA-4 антитела в модели трансплантации сингенных опухолевых клеток (модель рака толстой кишки) с использованием мышей дикого типа.

5 (2-1-1) Клеточная линия и получение мышинной модели с трансплантированной сингенной опухолевой линией

10 Клетки линии CT26 рака толстой кишки мыши приобретены в коллекции ATCC и использованы в эксперименте. Клетки CT26 поддерживают и пассируют в среде RPMI1640 (фирма SIGMA), содержащей 10% FBS (фирма SIGMA), 1 мМ пирувата натрия (фирма GIBCO), 10 мМ HEPES (фирма SIGMA) и 0,45% D-глюкозы (фирма SIGMA). В качестве мышей используют мышей BALB/c (7-недельного возраста, самки), приобретенных в фирме CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.

Величины  $K_D$  SW1610-ART12 и Tremfya в отношении  $\text{cyFcyR}$

	SW1610-ART12		Tremfya	
	$K_D$ (М/л) Среднее значение	Стандартное отклонение	$K_D$ (М/л) Среднее значение	Стандартное отклонение
cyFcyRIa	$1,06 \times 10^{-11}$	$5,77 \times 10^{-14}$	$1,09 \times 10^{-11}$	$2,65 \times 10^{-13}$
cyFcyRIIa2	$2,32 \times 10^{-6}$	$5,77 \times 10^{-9}$	$7,53 \times 10^{-6}$	$2,65 \times 10^{-8}$
cyFcyRIIa3	$5,29 \times 10^{-6}$	$1,53 \times 10^{-8}$	$3,98 \times 10^{-5}$	$1,00 \times 10^{-7}$
cyFcyRIIb	$2,52 \times 10^{-6}$	$1,53 \times 10^{-8}$	$5,67 \times 10^{-6}$	$4,16 \times 10^{-8}$
cyFcyRIIIa(R)	$1,01 \times 10^{-9}$	$5,77 \times 10^{-12}$	$5,79 \times 10^{-7}$	$4,00 \times 10^{-9}$
cyFcyRIIIa(S)	$9,33 \times 10^{-10}$	$7,00 \times 10^{-12}$	$4,97 \times 10^{-7}$	$2,52 \times 10^{-9}$

15 Объем трансплантированной опухоли рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли = большой диаметр  $\times$  короткий диаметр  $\times$  короткий диаметр / 2

Пример 2-1-2. Получение агентов для введения

20 Контрольное антитело против CTLA-4 мыши (mNS-mFa55), полученное в контрольном примере 3-4, и переключающее анти-CTLA-4 антитело (SW1208-mFa55) вводят модели трансплантата клеток CT26 в качестве агентов для введения. С помощью His-буфера (20 мМ His-HCl и 150 мМ NaCl, pH 6,0) концентрацию mNS-mFa55 доводят до 0,1 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,4 мг/мл и 0,8 мг/мл, а SW1208-mFa55 доводят до 3 мг/мл, соответственно.

25 Пример 2-1-3. Введение агентов для измерения противоопухолевого эффекта

На восьмой день после трансплантации мышам вводят mNS-mFa55 в дозе 1 мг/кг, 2 мг/кг, 4 мг/кг и 8 мг/кг и SW1208-mFa55 в дозе 30 мг/кг, соответственно. Приготовленный раствор для введения вводят в объеме 20 мл/кг через хвостовую вену.

- 5 В табл. 2 показаны подробности лечения агентами для измерения противоопухолевого эффекта.

Таблица 2

Группа	Число животных	Лекарство	Доза	Способ введения	День введения
1	4	Разбавитель	-	Хвостовая вена	8-й день после трансплантации
2	4	mNS-mFa55	1	Хвостовая вена	8-й день после трансплантации
3	4	mNS-mFa55	2	Хвостовая вена	8-й день после трансплантации
4	4	mNS-mFa55	4	Хвостовая вена	8-й день после трансплантации
5	4	mNS-mFa55	8	Хвостовая вена	8-й день после трансплантации
6	4	SW1208-mFa55	30	Хвостовая вена	8-й день после трансплантации

Пример 2-1-5. Оценка противоопухолевого эффекта

- 10 Противоопухолевый эффект оценивают по объему опухоли, рассчитанному по формуле, приведенной в примере 2-1-1.

Величину ингибирования роста опухоли (tumor growth inhibition – TGI) рассчитывают по следующей формуле:

- 15 
$$TGI (\%) = (1 - ([\text{среднее значение объема опухоли в тестируемой группе на момент измерения}] - [\text{среднее значение объема опухоли в тестируемой группе на момент первоначального введения}]) / ([\text{среднее значение объема опухоли в контрольной группе на момент измерения}] - [\text{среднее значение объема опухоли в контрольной группе на момент первичного введения}])) * 100$$

- 20 В результате на 13-й день после введения эффективность препарата TGI = 50% и более была показана для mNS-mFa55 в дозе 1, 2, 4 и 8 мг/кг и SW1208-mFa55 в дозе 30 мг/кг (фиг. 1).

Пример 2-2. Оценка лекарственной эффективности анти-CTLA-4 переключающего антитела в модели сингенной трансплантированной опухоли на мышах



Пример 2-2. Оценка эффективности переключаемого антитела против CTLA-4 в модели трансплантации сингенных опухолевых клеток (модель рака мочевого пузыря) с использованием мышей дикого типа.

Пример 2-2-1. Клеточная линия и получение мышинной модели трансплантата сингенной опухолевой линии

5 Клетки мышинной линии рака мочевого пузыря MBT2 приобретены в JCRB Cell Bank и использованы в эксперименте. Клетки MBT2 поддерживали и пассировали в среде E-MEM (SIGMA), содержащей 10% FBS (SIGMA).  
Используемыми мышами были C3H/HeN (7-недельные самки), приобретенные у  
10 CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.

Объем пересаженной опухоли рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли = большой диаметр × короткий диаметр × короткий диаметр / 2

15 Контрольное антитело против CTLA-4 мыши (mNS-mFa55), полученное в контрольном примере 3-4, и переключающее антитело против CTLA-4 (SW1208-mFa55) вводят в модели трансплантата клеток MBT2 в качестве агентов для введения. С помощью His-буфера (20 мМ His-HCl и 150 мМ NaCl, pH 6,0) концентрацию mNS-mFa55 доводят до 0,1 мг/мл, а SW1208-mFa55 доводят до 3  
20 мг/мл, соответственно.

Пример 2-2-3. Введение агентов для измерения противоопухолевого эффекта

На восьмой день после трансплантации мышам вводят mNS-mFa55 в дозе 1 мг/кг и SW1208-mFa55 в дозе 30 мг/кг, соответственно. Приготовленный раствор для введения вводят в объеме 20 мл/кг через хвостовую вену.

25 В табл. 3 показаны подробности обработки агентами для измерения противоопухолевого эффекта.

Таблица 3

Группа	Число животных	Лекарство	Доза	Способ введения	День введения
1	4	Разбавитель	-	Хвостовая вена	8-й день после трансплантации
2	4	mNS-mFa55	1	Хвостовая вена	8-й день после трансплантации
3	4	SW1208-mFa55	30	Хвостовая вена	8-й день после трансплантации

#### Пример 2-2-4. Оценка противоопухолевого эффекта

Противоопухолевый эффект оценивают по объему опухоли, рассчитанному по формуле расчета, приведенной в примере 2-2-1.

5 Величину ингибирования роста опухоли (TGI) рассчитывают по следующей формуле:

10 
$$TGI (\%) = (1 - ([\text{среднее значение объема опухоли в тестируемой группе на момент измерения}] - [\text{среднее значение объема опухоли в тестируемой группе на момент первоначального введения}]) / ([\text{среднее значение объема опухоли в контрольной группе на момент измерения}] - [\text{среднее значение объема опухоли в контрольной группе на момент первичного введения}])) * 100$$

В результате на девятый день после введения mNS-mFa55 в дозе 1 мг/кг и SW1208-mFa55 в дозе 30 мг/кг показывают эффективность препарата TGI = 51% и 37% (фиг. 2).

2).

15 Пример 2-3. Оценка лекарственной эффективности анти-CTLA-4 переключающих антител в модели трансплантации сингенных опухолевых клеток (модель рака толстой кишки) с использованием нокаутированного CTLA-4 человека трансгенных мышей с CD3 человека

#### Пример 2-3-1. Клеточная линия

20 Клетки линии рака толстой кишки мыши Colon 38 были предоставлены Японским фондом исследования рака по соглашению NCI (Национальный институт рака) и используются в данном эксперименте. Клетки Colon 38 сохраняют и пассируют в среде RPMI1640 (фирма SIGMA), содержащей 10% FBS (фирма SIGMA).

25 Пример 2-3-2. Получение мышинной модели трансплантата сингенной опухолевой линии

30 Мыши с замещением на CTLA-4 KI человека, мыши с замещением на CD3 EDG человека (замещенные мыши hCTLA-4 KI hCD3 EDG) (12-недельный возраст, самцы), которые представляют собой гибридную линию мышей с нокином CTLA-4 человека (*Blood* 2005, 106(9): 3127 -3133) и полученные авторами в ходе данного исследования мыши с замещением на CD3 EDG человека (*Sci Rep* 2017, 7: 45839).

Объем пересаженной опухоли рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли = большой диаметр × короткий диаметр × короткий диаметр / 2

Пример 2-3-3. Получение агентов для введения

5 Анти-CTLA-4 переключающее антитело (SW1610-mFa55 или SW1612-mFa55), полученное в контрольном примере 5-2, или контрольное анти-CTLA-4 антитело человека (hNS-mFa55), полученное в контрольном примере 4-2, вводят в модель трансплантата клеток Colon 38 в качестве агента для введения. С помощью His-буфера (150 мМ NaCl / 20 мМ His-HCl-буфера, pH 6,0) переключающие антитела (SW1610-mFa55 и SW1612-mFa55) и контрольное антитело разводят до концентрации 0,03, 0,1 и 1 мг/мл, 0,03, 0,1 и 1 мг/мл, 0,03, 0,1 и 0,1 мг/мл, соответственно.

Пример 2-3-4. Введение агентов для измерения противоопухолевого эффекта

15 На 10-й день после трансплантации SW1610-mFa55 в дозе 0,3 мг/кг, 1 мг/кг и 10 мг/кг, SW1612-mFa55 в дозе 0,3 мг/кг, 1 мг/кг и 10 мг/кг, а hNS-mFa55 – в дозе 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг и 1 мг/кг, вводят мышам через хвостовую вену. В табл. 4 показаны подробности лечения агентами для измерения противоопухолевого эффекта.

Таблица 4

Группа	Число животных	Лекарство	Доза	Способ введения	День введения
1	4	His-буфер	-	Хвостовая вена	10-й день после трансплантации
2	4	hNS-mFa55	0,1	Хвостовая вена	10-й день после трансплантации
3	4	hNS-mFa55	0,3	Хвостовая вена	10-й день после трансплантации
4	4	hNS-mFa55	1	Хвостовая вена	10-й день после трансплантации
5	4	SW1610-mFa55	0,3	Хвостовая вена	10-й день после трансплантации
6	4	SW1610-mFa55	1	Хвостовая вена	10-й день после трансплантации
7	4	SW1610-mFa55	10	Хвостовая вена	10-й день после трансплантации
8	4	SW1612-mFa55	0,3	Хвостовая вена	10-й день после трансплантации
9	4	SW1612-mFa55	1	Хвостовая вена	10-й день после трансплантации
10	4	SW1612-	10	Хвостовая	10-й день после

		mFa55		вена	трансплантации
--	--	-------	--	------	----------------

#### Пример 2-3-5. Оценка противоопухолевого эффекта

Противоопухолевый эффект оценивают по объему опухоли, рассчитанному по формуле, приведенной в примере 2-3-2.

5        Значение TGI (ингибирование роста опухоли) рассчитывают по следующей формуле:

$$10 \quad TGI = (1 - ([\text{среднее значение объема опухоли в исследуемой группе на момент измерения}] - [\text{среднее значение объема опухоли в момент, предшествующий введению антитела}]) / ([\text{среднее значение объем опухоли в контрольной группе на момент измерения}] - [\text{среднее значение объема опухоли в момент, предшествующий введению антитела}]))) * 100$$

В результате, эффективность препарата при TGI = 55% или более продемонстрирована hNS-mFa55 в дозе 0,3 мг/кг или более, а также SW1610-mFa55 и SW1612-mFa55 в дозе 1 мг/кг или более на 21-й день после введения.

15        Результаты показаны на фиг. 3 для hMS-mFa55, фиг. 4 для SW1610-mFa55 и фиг. 5 для SW1612-mFa55, соответственно.

Пример 2-4. Оценка лекарственной эффективности анти-CTLA-4 переключающих антител в модели трансплантации сингенных опухолевых клеток (модель рака молочной железы) с использованием нок-даун CTLA-4 человека, трансгенных мышей с CD3 человека

#### Пример 2-4-1. Клеточная линия

Мышиные клетки рака молочной железы линии A755 были предоставлены доктором Ииго из Национального онкологического центра Японии и использованы в эксперименте. Клетки A755 сохраняют и пассируют *in vivo*.

25        Пример 2-4-2. Получение мышинной модели с трансплантированной сингенной опухолевой линией

30        Применяют мышей с замещением на CTLA-4 KI человека, мышей с замещением на CD3 EDG человека (замещенные мыши hCTLA-4 KI hCD3 EDG) (19-недельный возраст, самки), которые представляют собой гибридную линию мышей с нок-дауном CTLA-4 человека (*Blood* 2005, 106(9): 3127 -3133) и полученные авторами в ходе данного исследования мыши с замещением на CD3 EDG человека (*Sci Rep* 2017, 7: 45839).

Объем трансплантированной опухоли рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли = большой диаметр × короткий диаметр × короткий диаметр / 2

5 Пример 2-4-3. Получение агентов для введения

10 Анти-CTLA-4 переключающее антитело (SW1610-mFa55 или SW1389-mFa55), полученное в контрольном примере 3-4 и контрольном примере 5-2, или контрольное антитело анти-CTLA-4 человека (hNS-mFa55), полученное в контрольном примере 4-2 вводят в модель с трансплантацией клеток A755 в качестве агента для введения. С помощью His-буфера (150 мМ NaCl / 20 мМ His-HCl-буфера, pH 6,0) переключающие антитела (SW1610-mFa55 и SW1389-mFa55) и контрольное антитело доводят до концентрации 3 мг/мл, 3 мг/мл и 1 мг/мл, соответственно.

15 Пример 2-4-4. Введение агентов для измерения противоопухолевого эффекта

На седьмой день после трансплантации мышам вводят SW1610-mFa55 в дозе 30 мг/кг, SW1389-mFa55 в дозе 10 мг/кг и hNS-mFa55 в дозе 10 мг/кг через хвостовую вену. В табл. 5 показаны подробности обработки агентами для измерения противоопухолевого эффекта.

20 Таблица 5

Группа	Число животных	Лекарство	Доза	Способ введения	День введения
1	4	Разбавитель	-	Хвостовая вена	7-й день после трансплантации
2	4	SW1389-mFa55	30	Хвостовая вена	7-й день после трансплантации
3	4	SW1610-mFa55	30	Хвостовая вена	7-й день после трансплантации
4	4	hNS-mFa55	10	Хвостовая вена	7-й день после трансплантации

Пример 2-4-5. Оценка противоопухолевого эффекта

Противоопухолевый эффект оценивают по объему опухоли, рассчитанному по формуле, приведенной в примере 2-4-2.

25 Величину ингибирования роста опухоли (tumor growth inhibition – TGI) рассчитывают по следующей формуле:

$$\text{TGI (\%)} = (1 - ([\text{среднее значение объема опухоли в тестируемой группе на момент измерения}] - [\text{среднее значение объема опухоли в тестируемой группе на момент, предшествующий введению антитела}]) / ([\text{среднее значение объема опухоли в контрольной группе на момент измерения}] - [\text{среднее значение объема опухоли в контрольной группе на момент, предшествующий введению}])) * 100$$

В результате эффективность лекарственного средства TGI = 46% и более показана для hNS-mFa55 в дозе 10 мг/кг, SW1610-mFa55 в дозе 30 мг/кг и SW1389-mFa55 в дозе 30 мг /кг, соответственно, на 10-е сутки после введения (фиг. 6).

Пример 2-5. Оценка эффективности лекарственного средства переключающих анти-CTLA-4 антител в модели трансплантации сингенных опухолевых клеток (модель меланомы) с использованием трансгенных мышей с CD3 человека с нокином CTLA-4 человека

Пример 2-5-1. Клеточная линия

Мышиную линию меланомы B16F1 приобрели в коллекции ATCC (CRL-6323) и трансфицировали геном куриного овальбумина (OVA, SEQ ID NO: 349) для его конститутивной экспрессии. Клетки клонируют и используют в эксперименте. Клетки B16F1/OVA поддерживают и пассируют в среде D-MEM (с высоким содержанием глюкозы) (фирма SIGMA), содержащей 10% FBS (фирма SIGMA) и 0,5 мг/мл G-418 (фирма NACALAI TESQUE, INC.).

Пример 2-5-2. Получение мышинной модели трансплантата сингенной опухолевой линией

Применяют мышей с замещением на CTLA-4 KI человека, мышей с замещением на CD3 EDG человека (замещенные мыши hCTLA-4 KI hCD3 EDG) (17-недельный возраст, самки), которые представляют собой гибридную линию мышей с нокином CTLA-4 человека (*Blood* 2005, 106(9): 3127 -3133) и полученные авторами в ходе данного исследования мыши с замещением на CD3 EDG человека (*Sci Rep* 2017, 7: 45839).

Объем трансплантированной опухоли рассчитывают по следующей формуле:

$$\text{Объем опухоли} = \text{большой диаметр} \times \text{короткий диаметр} \times \text{короткий диаметр} / 2$$

Пример 2-5-3. Получение агентов для введения

Переключающее анти-CTLA-4 антитело (SW1610-mFa55 или SW1389-mFa55), полученное в контрольном примере 3-4 и контрольном примере 5-2, или контрольное анти-CTLA-4 антитело человека (hNS-mFa55), полученное в контрольном примере 4-2, вводят в модель с трансплантатом клеток B16F1/OVA в качестве агента для введения. С помощью His-буфера (150 мМ NaCl / 20 мМ His-HCl-буфера, pH 6,0) переключающие антитела (SW1610-mFa55 и SW1389-mFa55) и контрольное антитело доводят до концентрации 10 мг/мл, 10 мг/мл и 1 мг/мл, соответственно.

10 Пример 2-5-4. Введение агентов для измерения противоопухолевого эффекта

На седьмой день после трансплантации мышам через хвостовую вену вводят SW1610-mFa55 в дозе 100 мг/кг, SW1389-mFa55 в дозе 100 мг/кг и hNS-mFa55 в дозе 10 мг/кг. В табл. 6 показаны подробности обработки агентами для измерения противоопухолевого эффекта.

15 Таблица 6

Группа	Число животных	Лекарство	Доза	Способ введения	День введения
1	4	Разбавитель	-	Хвостовая вена	7-й день после трансплантации
2	4	SW1389-mFa55	100	Хвостовая вена	7-й день после трансплантации
3	4	SW1610-mFa55	100	Хвостовая вена	7-й день после трансплантации
4	4	hNS-mFa55	10	Хвостовая вена	7-й день после трансплантации

Пример 2-5-5. Оценка противоопухолевого эффекта

Противоопухолевый эффект оценивают по объему опухоли, рассчитанному по формуле, приведенной в примере 2-5-2.

20 Величину ингибирования роста опухоли (tumor growth inhibition – TGI) рассчитывают по следующей формуле:

25 
$$TGI (\%) = (1 - ([\text{среднее значение объема опухоли в тестируемой группе на момент измерения}] - [\text{среднее значение объема опухоли в тестируемой группе на момент, предшествующий введению антитела}]) / ([\text{среднее значение объема опухоли в контрольной группе на момент измерения}] - [\text{среднее значение объема опухоли в контрольной группе на момент, предшествующий введению антитела}]))) * 100$$

В результате эффективность лекарственного средства TGI = 47% и более продемонстрирована для hNS-mFa55 в дозе 10 мг/кг, SW1610-mFa55 в дозе 30 мг/кг и SW1389-mFa55 в дозе 30 мг/кг на 11-е сутки после введения (фиг. 7).

Пример 3. Оценка *in vitro* активности по истощению Treg анти-CTLA-4 переключающих антител с модифицированной Fc-областью с использованием МКПК пациента-человека

*In vitro* оценивают цитотоксическую активность анти-CTLA-4 переключающих антител с модифицированной Fc-областью, полученных в примере 1 (SW1610-ART12 и SW1389-ART5+ACT1), или ипилимумаба против CTLA-4-положительных регуляторных Т-клеток (CD3+ CD4+ FoxP3high CD45RA-CTLA-4high). МКПК (моноклеарные клетки периферической крови, фирма Discovery Life Sciences), полученные от онкологических больных, замораживают-оттаивают, суспендируют в 200 ЕД/мл интерлейкина 2 (IL-2)/RPMI/10% FBS при плотности клеток  $5 \times 10^6$  клеток/мл и культивируют при 37°C в течение четырех дней в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. Через четыре дня клетки собирают, ресуспендируют в RPMI/10% FBS, а затем высевают в количестве 50 мкл в каждую лунку 96-луночных планшетов V-образным дном ( $3-10 \times 10^5$  клеток/лунку). Раствор анти-KLH антитела (KLH-G1m), доведенный до концентрации 4 мг/мл с помощью RPMI/10% FBS, добавляют по 50 мкл в каждую лунку, а затем раствор антитела доводят до каждой требуемой концентрации (0, 40 и 200 мкг/мл) добавлением RPMI/10% FBS по 50 мкл в каждую лунку 96-луночного планшетов V-образным дном. Далее добавляют раствор АТФ, доведенный до концентрации 400 мкМ с помощью RPMI/10% FBS, по 50 мкл, клетки хорошо суспендируют и оставляют при 37°C в течение шести часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (раствор АТФ, доведенный до 4000 мкМ добавляют по 50 мкл, всего дважды с интервалом два часа). Через шесть часов МКПК собирают, промывают промывочным раствором auto MACS (фирма Milteny), а затем вводят в реакцию со следующими антителами для анализа существующих фракций иммунных клеток с помощью FACS-анализа: реагент для определения жизнеспособности (фирма Biolegend, Zombie NIR), анти-CD3 антитело (BD, клон: UCHL1), анти-CD4 антитело (BD, клон: RPA-T4), анти-CD45RA антитело (Biolegend, клон: HI100), анти-FoxP3 антитело (фирма eBioscience, клон: 236A/E7) и анти-CTLA-4 антитело (BD, клон: BNI3). FACS-анализ проводят с помощью BD FACSCelesta (фирма BD). Из регуляторных Т-клеток,



соответствующих фракции CD45RA-FoxP3<sup>high</sup> живых клеток при каждой концентрации антитела, примерно 10% с самой высокой интенсивностью экспрессии CTLA-4 собирают и используют в качестве показателя для оценки цитотоксической активности каждого антитела. Полученные результаты представлены на фиг. 8 (больные раком ободочной кишки), фиг. 9 (больные раком головы и шеи), фиг. 10 (больные раком поджелудочной железы), фиг. 11 (больные раком почки) и фиг. 12 (больной раком легкого).

На основании этих результатов подтверждено, что анти-CTLA-4 антитела переключающие антитела с модифицированной Fc-областью обладают цитотоксической активностью против регуляторных T-клеток с высокой экспрессией CTLA-4 в присутствии АТФ в МКПК, полученных от онкологических больных.

Пример 4. Оценка *in vivo* эффективности комбинированного применения анти-CTLA-4 переключающих антител и различных химиотерапевтических агентов на моделях мышей, которым трансплантировали различные линии сингенных опухолей

Пример 4-1. Оценка эффективности комбинированного применения переключающего анти-CTLA-4 антитела и различных химиотерапевтических агентов в модели с трансплантацией сингенных опухолевых клеток (модель рака толстой кишки) с использованием мышей дикого типа

Пример 4-1-1. Клеточная линия и получение мышинной модели с трансплантированной сингенной опухолевой линией

Клетки линии рака толстой кишки мыши CT26.WT были приобретены в коллекции ATCC и использованы в эксперименте. Клетки CT26.WT поддерживают и пассируют в среде RPMI1640 (NACALAI TESQUE, INC.), содержащей 10% FBS (CORNING), 1 мМ пирувата натрия (GIBCO), 10 мМ HEPES (SIGMA) и 0,45% D-глюкозы (SIGMA). В качестве мышей используют мышей BALB/c (7-недельного возраста, самки), приобретенных в фирме JACKSON LABORATORY JAPAN, INC.

Объем трансплантированной опухоли рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли = большой диаметр × короткий диаметр × короткий диаметр / 2

Пример 4-1-2. Получение агентов для введения

Переключающее антитело против CTLA-4 мыши (SW1208-mFa55), полученное в контрольном примере 3-4, и карбоплатин, паклитаксел или гемцитабин в качестве химиотерапевтического агента вводят в модели, трансплантированные клетками CT26, в качестве агентов для введения. SW1208-mFa55 получают в концентрации 10 мг/мл с использованием D-PBS. Карбоплатин готовят в концентрации 8 мг/мл с использованием физиологического раствора, гемцитабин готовят в концентрации 12 мг/мл с использованием физиологического раствора, и паклитаксел готовят в концентрации 2 мг/мл с использованием этанола, кремофора EL и физиологического раствора (1:1:18).

Пример 4-1-3. Введение агентов для измерения противоопухолевого эффекта

Химиотерапевтический агент вводят мышам на 9-й день после трансплантации, а SW1208-mFa55 вводят на 10-й день после трансплантации. SW1208-mFa55 вводят в дозе 100 мг/кг, карбоплатин вводят в дозе 80 мг/кг, гемцитабин вводят в дозе 120 мг/кг и паклитаксел вводят в дозе 20 мг/кг. Приготовленный раствор для введения в объеме 10 мл/кг вводят через хвостовую вену.

В табл. 7 показаны подробности обработки агентами для измерения противоопухолевого эффекта.

Таблица 7

Группа	Число животных	Лекарство 1	Доза (мг/кг)	День введения (после трансплантации)	Лекарство 2	Доза (мг/кг)	День введения (после трансплантации)
1	5	Разбавитель	-	10-й день	-	-	9-й день
2	5	SW1208-mFa55	100	10-й день	-	-	9-й день
3	5	-	-	10-й день	карбоплатин	80	9-й день
4	5	SW1208-mFa55	100	10-й день	карбоплатин	80	9-й день
5	5	-	-	10-й день	паклитаксел	20	9-й день
6	5	SW1208-mFa55	100	10-й день	паклитаксел	20	9-й день
7	5	-	-	10-й день	гемцитабин	120	9-й день
8	5	SW1208-mFa55	100	10-й день	гемцитабин	120	9-й день

Пример 4-1-4. Оценка противоопухолевого эффекта

Противоопухолевый эффект оценивают по объему опухоли, рассчитанному по формуле, приведенной в примере 4-1-1.

Величину ингибирования роста опухоли (tumor growth inhibition – TGI) рассчитывают по следующей формуле:

$$TGI (\%) = (1 - ([\text{среднее значение объема опухоли в тестируемой группе на момент измерения}] - [\text{среднее значение объема опухоли в тестируемой группе на момент начала введения антитела}]) / ([\text{среднее значение объема опухоли в контрольной группе на момент измерения}] - [\text{среднее значение объема опухоли в контрольной группе на момент начала введения}])) * 100$$

В результате комбинированная терапия SW1208-mFa55 в дозе 100 мг/кг с карбоплатином в дозе 80 мг/кг, гемцитабином в дозе 120 мг/кг и паклитакселом в дозе 20 мг/кг показала более сильный противоопухолевый эффект, чем монотерапия (табл. 8).

Таблица 8

Лекарственное средство	TGI (%) на 9-й день после начала введения
SW1208-mFa55	3
Карбоплатин	46
Комбинация карбоплатин + SW1208-mFa55	72
Паклитаксел	0
Комбинация паклитаксел + SW1208-mFa55	14
Гемцитабин	70
Комбинация гемцитабин + SW1208-mFa55	92

Пример 4-2. Оценка эффективности комбинированного применения переключающего анти-CTLA-4 антитела и различных химиотерапевтических агентов в модели трансплантации сингенных опухолевых клеток (модель меланомы) с использованием мышей дикого типа

Пример 4-2-1. Клеточная линия и получение мышинной модели с трансплантированной сингенной опухолевой линией

Мышиную линию меланомы B16F1 приобрели в коллекции ATCC (CRL-6323) и трансфицируют геном куриного овальбумина (OVA, SEQ ID NO: 349) для его конститутивной экспрессии. Клетки клонируют и используют в эксперименте. Клетки B16F1/OVA поддерживают и пассируют в среде D-MEM (с высоким содержанием глюкозы) (фирма NACALAI TESQUE, INC.), содержащей 10% FBS (фирма CORNING) и 0,5 мг/мл G-418 (фирма NACALAI

TESQUE, INC.). Используют мышей C57BL/6J (7-недельные самки), приобретенные в фирме JACKSON LABORATORY JAPAN, INC.

Объем трансплантированной опухоли рассчитывают по следующей формуле:

$$5 \quad \text{Объем опухоли} = \text{большой диаметр} \times \text{короткий диаметр} \times \text{короткий диаметр} / 2$$

Пример 4-2-2. Подготовка агентов для введения

10 Переключающее антитело против анти-CTLA-4 мыши (SW1208-mFa55), полученное в контрольном примере 3-4, и карбоплатин, паклитаксел или гемцитабин в качестве химиотерапевтического агента вводят в модели клеточного трансплантата B16F1/OVA в качестве агентов для введения. SW1208-mFa55 получают в концентрации 10 мг/мл с использованием D-PBS. Карбоплатин готовят в концентрации 6 мг/мл с использованием физиологического раствора, гемцитабин готовят в концентрации 12 мг/мл с  
15 использованием физиологического раствора, а паклитаксел готовят в концентрации 2 мг/мл с использованием этанола, кремофора EL и физиологического раствора (1:1:18).

Пример 4-2-3. Введение агентов для измерения противоопухолевого эффекта

20 Химиотерапевтический агент вводят на 8-й день после трансплантации и SW1208-mFa55 вводят на 9-й день после трансплантации. SW1208-mFa55 вводят мышам в дозе 100 мг/кг, карбоплатин вводят в дозе 60 мг/кг, гемцитабин вводят в дозе 120 мг/кг и паклитаксел вводят в дозе 20 мг/кг. Приготовленный раствор для введения вводят в объеме 10 мл/кг через хвостовую вену.

25 В табл. 9 показаны подробности обработки агентами для измерения противоопухолевого эффекта.

Таблица 9

Группа	Число животных	Лекарство 1	Доза (мг/кг)	День введения (после трансплантации)	Лекарство 2	Доза (мг/кг)	День введения (после трансплантации)
1	5	Разбавитель	-	9-й день	-		8-й день
2	5	SW1208-mFa55	100	9-й день	-		8-й день

3	5	-	-	9-й день	карбоплатин	60	8-й день
4	5	SW1208-mFa55	100	9-й день	карбоплатин	60	8-й день
5	5	-	-	9-й день	паклитаксел	20	8-й день
6	5	SW1208-mFa55	100	9-й день	паклитаксел	20	8-й день
7	5	-	-	9-й день	гемцитабин	120	8-й день
8	5	SW1208-mFa55	100	9-й день	гемцитабин	120	8-й день

Пример 4-2-4. Оценка противоопухолевого эффекта

Противоопухолевый эффект оценивают по объему опухоли, рассчитанному по формуле, приведенной в примере 4-2-1.

5 Величину ингибирования роста опухоли (tumor growth inhibition – TGI) рассчитывают по следующей формуле:

$$TGI (\%) = (1 - ([\text{среднее значение объема опухоли в тестируемой группе на момент измерения}] - [\text{среднее значение объема опухоли в тестируемой группе на момент начала введения антитела}]) / ([\text{среднее значение объема опухоли в контрольной группе на момент измерения}] - [\text{среднее значение объема опухоли в контрольной группе на момент начала введения}])) * 100$$

10

В результате комбинированная терапия SW1208-mFa55 в дозе 100 мг/кг с гемцитабином в дозе 120 мг/кг показывает более сильный противоопухолевый эффект, чем монотерапия (табл. 10).

15 Таблица 10

Лекарственное средство	TGI (%) на 9-й день после начала введения
SW1208-mFa55	24
Карбоплатин	18
Комбинация карбоплатин + SW1208-mFa55	23
Паклитаксел	-1
Комбинация паклитаксел + SW1208-mFa55	11
Гемцитабин	18
Комбинация гемцитабин + SW1208-mFa55	36

Пример 4-3. Оценка эффективности комбинированного применения переключающего анти-CTLA-4 антитела и различных химиотерапевтических агентов в модели трансплантации сингенных опухолевых клеток (модель рака легких) с использованием мышей дикого типа

20

Пример 4-3-1. Клеточная линия и получение мышинной модели трансплантата сингенной опухолевой линии

Мышиную линию рака легких LLC1 приобрели в коллекции ATCC (CRL-1642) и трансфицировали геном куриного овальбумина (OVA, SEQ ID NO: 349) для его конститутивной экспрессии. Клетки клонируют и используют в эксперименте. Клетки LLC1/OVA поддерживают и пассируют в среде D-MEM (с высоким содержанием глюкозы) (фирма NACALAI TESQUE, INC.), содержащей 10% FBS (фирма CORNING) и 0,5 мг/мл G-418 (фирма NACALAI TESQUE, INC.). Используют мышей C57BL/6J (6-недельные самки), приобретенных в фирме JACKSON LABORATORY JAPAN, INC.

Объем трансплантированной опухоли рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли = большой диаметр × короткий диаметр × короткий диаметр / 2

Пример 4-3-2. Подготовка агентов для введения

Переключающее антитело против анти-CTLA-4 мыши (SW1208-mFa55), полученное в контрольном примере 3-4, и карбоплатин, паклитаксел или гемцитабин в качестве химиотерапевтического агента вводят в модели клеточного трансплантата LLC1/OVA в качестве агентов для введения. SW1208-mFa55 получают в концентрации 10 мг/мл с использованием D-PBS. Карбоплатин готовят в концентрации 8 мг/мл с использованием физиологического раствора, гемцитабин готовят в концентрации 12 мг/мл с использованием физиологического раствора, и паклитаксел готовят в концентрации 2 мг/мл с использованием этанола, кремофора EL и физиологического раствора (1:1:18).

Пример 4-3-3. Введение агентов для измерения противоопухолевого эффекта

Химиотерапевтический агент вводят на 11-й день после трансплантации и SW1208-mFa55 вводят на 12-й день после трансплантации. SW1208-mFa55 вводят мышам в дозе 100 мг/кг, карбоплатин вводят в дозе 80 мг/кг, гемцитабин вводят в дозе 120 мг/кг и паклитаксел вводят в дозе 20 мг/кг. Приготовленный раствор для введения вводят в объеме 10 мл/кг через хвостовую вену.

В табл. 11 показаны подробности обработки агентами для измерения противоопухолевого эффекта.

Таблица 11

Группа	Число животных	Лекарство 1	Доза (мг/кг)	День введения (после трансплантации)	Лекарство 2	Доза (мг/кг)	День введения (после трансплантации)
1	5	Разбавитель	-	12-й день	-		11-й день
2	5	SW1208-mFa55	100	12-й день	-		11-й день
3	5	-	-	12-й день	карбоплатин	80	11-й день
4	5	SW1208-mFa55	100	12-й день	карбоплатин	80	11-й день
5	5	-	-	12-й день	паклитаксел	20	11-й день
6	5	SW1208-mFa55	100	12-й день	паклитаксел	20	11-й день
7	5	-	-	12-й день	гемцитабин	120	11-й день
8	5	SW1208-mFa55	100	12-й день	гемцитабин	120	11-й день

#### (4-3-4) Оценка противоопухолевого эффекта

Противоопухолевый эффект оценивают по объему опухоли, рассчитанному по формуле, приведенной в примере 4-3-1.

Величину ингибирования роста опухоли (TGI) рассчитывают по следующей формуле:

$$TGI (\%) = (1 - ([\text{среднее значение объема опухоли в тестируемой группе на момент измерения}] - [\text{среднее значение объема опухоли в тестируемой группе на момент первоначального введения}]) / ([\text{среднее значение объема опухоли в контрольной группе на момент измерения}] - [\text{среднее значение объема опухоли в контрольной группе на момент первичного введения}])) * 100$$

В результате комбинированная терапия 100 мг/кг SW1208-mFa55 с 80 мг/кг карбоплатина и 120 мг/кг гемцитабином показывает более сильный противоопухолевый эффект, чем монотерапия (табл. 12).

Таблица 12

Лекарственное средство	TGI (%) на 15-й день после начала введения
SW1208-mFa55	23
Карбоплатин	34
Комбинация карбоплатин + SW1208-mFa55	50
Паклитаксел	14
Комбинация паклитаксел + SW1208-mFa55	22
Гемцитабин	36
Комбинация гемцитабин + SW1208-mFa55	51

5 Пример 5. Оценка эффективности *in vivo* комбинированного применения переключающих анти-CTLA-4 антител и ингибиторов иммунных контрольных точек в моделях мышей, трансплантированных сингенными опухолевыми линиями

10 Пример 5-1. Оценка эффективности комбинированного применения переключающих анти-CTLA-4 антител и антитела против PDL1 мыши в модели трансплантации сингенными опухолевыми клетками (модель рака толстой кишки) с использованием нок-дауна CTLA-4 человека, трансгенных мышей CD3 человека

Пример (5-1-1). Клеточная линия

15 Клетки линии рака толстой кишки мыши Colon 38 получены от Японского фонда исследования рака по соглашению с NCI (Национального института рака) и использованы в эксперименте. Клетки Colon 38 сохраняют и пассируют в среде RPMI1640 (фирма NACALAI TESQUE, INC.), содержащей 10% FBS (фирма CORNING).

Пример 5-1-2. Получение мышинной модели с трансплантированной сингенной опухолевой линией

20 Применяют мышей с замещением на CTLA-4 KI человека, мышей с замещением на CD3 EDG человека (замещенные мыши hCTLA-4 KI hCD3 EDG) (7-недельный возраст, самки), которые представляют собой гибридную линию мышей с нокином CTLA-4 человека (*Blood* 2005, 106(9): 3127 -3133) и  
 25 полученные авторами в ходе данного исследования мыши с замещением на CD3 EDG человека (*Sci Rep* 2017, 7: 45839).



Объем трансплантированной опухоли рассчитывают по следующей формуле:

Объем опухоли = большой диаметр × короткий диаметр × короткий диаметр / 2

5 Пример 5-1-3. Подготовка агентов для введения

10 Переключающее антитело анти-CTLA-4 (SW1610-mFa55 или SW1389-mFa55), полученное в контрольном примере 3-4 и контрольном примере 5-2, вводят модели трансплантата клеток Colon 38 в качестве агента для введения. Переключающие антитела (SW1610-mFa55, SW1389-mFa55) приготавливают в концентрации 0,03 мг/мл и 0,1 мг/мл, соответственно, и антитело против мышинового PDL1 (Bio X Cell, InVivoMAb против мышинового PD-L1 (B7-H1) ), #BE0101) приготавливают в концентрации 1 мг/мл с использованием D-PBS.

15 Пример 5-1-4. Введение агентов для измерения противоопухолевого эффекта

20 На 14-й день после трансплантации мышам через хвостовую вену вводят SW1610-mFa55 в дозе 0,3 мг/кг и SW1389-mFa55 в дозе 1 мг/кг. На 14-й, 17-й и 20-й дни или на 14-й и 17-й дни после трансплантации антитело против PDL1 (aPDL1) вводят мышам в дозе 10 мг/кг через хвостовую вену в группах однократного введения антитела против PDL1 и в группах комбинированного введения.

В табл. 13 и 14 показаны подробности обработки агентами для измерения противоопухолевого эффекта.

Таблица 13

Группа	Число животных	Лекарство 1	Доза	День введения (после трансплантации)	Лекарство 2	Доза	День введения (после трансплантации)
1	5	Разбавитель	-	14-й день	Разбавитель	-	14-й, 17-й и 20-й день
2	5	SW1610-mFa55	0,3	14-й день	Разбавитель	-	14-й, 17-й и 20-й день
3	5	Разбавитель	-	14-й день	aPDL1	10	14-й, 17-й и 20-й день
4	5	SW1610-mFa55	0,3	14-й день	aPDL1	10	14-й, 17-й и 20-й день

Таблица 14

Группа	Число животных	Лекарство 1	Доза	День введения (после трансплантации)	Лекарство 2	Доза	День введения (после трансплантации)
1	5	Разбавитель	-	14-й день	Разбавитель	-	14-й и 17-й дни
2	5	SW1389-mFa55	1	14-й день	Разбавитель	-	14-й и 17-й дни
3	5	Разбавитель	-	14-й день	aPDL1	10	14-й и 17-й дни
4	5	SW1389-mFa55	1	14-й день	aPDL1	10	14-й и 17-й дни

Пример 5-1-5. Оценка противоопухолевого эффекта

5 Противоопухолевый эффект оценивают по объему опухоли, рассчитанному по формуле, приведенной в примере 5-1-2.

Значение TGI (ингибирование роста опухоли) рассчитывают по следующей формуле:

$$10 \quad TGI = (1 - ([\text{среднее значение объема опухоли в исследуемой группе на момент измерения}] - [\text{среднее значение объема опухоли перед введением антитела}]) / ([\text{среднее значение объем опухоли в контрольной группе в момент измерения}] - [\text{среднее значение объема опухоли перед введением антитела}])) * 100$$

15 В результате как для SW1610-mFa55, так и для 1389-mFa55 комбинированная терапия антителом против PDL1 показывает более мощный противоопухолевый эффект, чем монотерапия. Результаты для SW1610-mFa55 и SW1389-mFa55 показаны на фиг. 13 и 14, соответственно.

Контрольный пример 1. Приобретение антител, которые связываются с антигенами в присутствии АТФ или его метаболита, из наивной библиотеки и библиотеки антител рационального дизайна с использованием метода фагового дисплея.

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

В качестве антигенов получают биотинилированную внеклеточную область CTLA-4 мыши (mCTLA-4), внеклеточную область CTLA-4 человека (hCTLA-4) и белок абатацепт. В частности, что касается внеклеточной области hCTLA-4, был синтезирован ген hCTLA-4-His-BAP (SEQ ID NO: 1), в котором His-метка и BAP-метка слиты с С-концом внеклеточной области hCTLA-4, которые встраивают в экспрессионную плазмиду животного. Белок-антиген экспрессируют и очищают, используя следующий метод. Подготовленную плазмиду вводят методом липофекции в линию клеток FreeStyle 293-F, полученную из клеток эмбриональной почки человека (фирма Invitrogen), и клетки высевают в колбу после суспендирования в экспрессионной среде FreeStyle 293 (фирма Invitrogen) при плотности клеток  $1,33 \times 10^6$  клеток/мл. Через три часа после введения плазмиды добавляют биотин до конечной концентрации 100 мкМ, культивируют в инкубаторе в атмосфере CO<sub>2</sub> (37°C, 8% CO<sub>2</sub>, 125 об/мин) в течение 4 суток и очищают антиген из культурального супернатанта по методике, известной специалистам в данной области. Поглощение очищенного раствора антигена при 280 нм измеряют с помощью спектрофотометра. Концентрацию очищенного антигена рассчитывают из полученного значения с использованием коэффициента экстинкции, рассчитанного методом PACE (*Protein Science*, 1995, 4: 2411-2423). С другой стороны, mCTLA-4-His (фирма Sino Biologicals Inc. 50503-M08H, номер в каталоге NP\_033973.2), в котором His-метка слита с внеклеточной областью mCTLA-4, и абатацепт (фирма Alfresa Corporation), в котором константная область IgG1 человека слита с hCTLA-4, биотинилируют методом сочетания с амином (фирма PIERCE, номер в каталоге 21329).

30 Контрольный пример 1-2. Получение антител, которые связываются с CTLA-4 мыши в присутствии малых молекул из библиотеки наивных антител человека, путем пэннинга с применением гранул

Библиотека фагового дисплея человеческих антител, состоящая из множества фагов, которые представляют домены Fab последовательностей

антител человека, отличающиеся друг от друга, сконструирована в соответствии со способом, известным специалистам в данной области, с использованием в качестве матрицы поли-А РНК, полученные из человеческих МКПК, коммерчески доступные поли-А РНК человека и т.п.

5 Из сконструированной библиотеки фагового дисплея наивных антител человека отбирают антитела, связывающая активность которых с внеклеточной областью CTLA-4 мыши (mCTLA-4) изменяется в присутствии и в отсутствие малой молекулы. Точнее, собирают фаги, презентующие антитела, которые проявляют активность по связыванию с mCTLA-4 и захватываются на гранулах в  
10 присутствии малой молекулы. Фаги выделяли из фагового элюата, элюированного с гранул в отсутствие малой молекулы. В этом методе получения в качестве антигена использовали меченый биотином mCTLA-4 (mCTLA-4-His-Biotin).

Фаги, полученные из клеток *E. coli*, несущих сконструированную фагмиду  
15 для фагового дисплея, очищают по общей методике. Затем получают раствор фаговой библиотеки, диализованный против TBS. Пэннинг проводят с использованием антигена, иммобилизованного на магнитных гранулах. В качестве магнитных гранул используют гранулы, покрытые NeutrAvidin (гранулы Sera-Mag SpeedBeads, покрытые NeutrAvidin) или гранулы, покрытые стрептавидином (Dynabeads M-280 Streptavidin).  
20

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

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

30 Из одиночных колоний *E. coli*, полученных в контрольном примере 1-2 получают культуральный супернатант, содержащий фаг, в соответствии с общепринятым методом (*Methods Mol. Biol.* 2002, 178:133-145). Супернатанты культур, полученные с помощью NucleoFast 96 (фирма MACHERY-NAGEL), подвергают ультрафильтрации. По 100 мкл супернатанта каждой культуры

вносят в каждую лунку NucleoFast 96 и центрифугируют в режиме 4500 g в течение 45 мин для удаления протока. Добавляют по 100 мкл H<sub>2</sub>O и снова промывают центрифугированием при 4500 g в течение 30 мин. Затем добавляют по 100 мкл TBS и смесь оставляют при комнатной температуре в течение 5 мин, после чего растворы фагов, содержащиеся в супернатантах, извлекают.

Очищенные фаги, к которым добавляют TBS, анализируют ELISA по следующей методике. Планшет для микротитрования StreptaWell 96 (фирма Roche) на ночь покрывают 100 мкл TBS, содержащего mCTLA-4-His-биотин. После промывания каждой лунки TBST для удаления mCTLA-4-His-биотина, не связанного с планшетом, лунки блокируют 250 мкл 2% обезжиренного молока-TBS на 1 ч или дольше. После удаления 2% обезжиренного молока-TBS в каждую лунку добавляют подготовленные очищенные фаги и планшет оставляют стоять при комнатной температуре в течение 1 ч, что позволяет фагам, презентующим антигена, связываться с mCTLA-4-His-биотином, присутствующим в каждой лунке в отсутствие или в присутствии АТФ. После промывания каждой лунки TBST или ATP/TBST туда добавляют HRP-конъюгированное анти-M13 антитело (фирма Amersham Pharmacia Biotech), разведенное TBS или ATP/TBS, и планшет инкубируют в течение 1 ч. После промывки TBST или ATP/TBST реакцию развития окраски раствора в каждой лунке, в которую добавляли один раствор TMB (ZYMED), останавливают добавлением серной кислоты, а затем измеряют изменение окраски по поглощению при 450 нм. В результате были подтверждены множественные антитела, которые связывались с mCTLA-4 только в присутствии АТФ. Результаты фагового ELISA показаны в табл. 15. В данном случае клоны, имеющие коэффициент поглощения выше 0,2 в присутствии АТФ, определены как положительные, а клоны, имеющие коэффициент поглощения выше 2 в присутствии/отсутствии АТФ, определены как положительные клоны, обладающие АТФ-зависимой антигенсвязывающей способностью (переключающие клоны). В этом примере SM может использоваться как аббревиатура для малой молекулы (small molecule)/низкомолекулярной молекулы, такой как АТФ.

Таблица 15.

	Общее количество
--	------------------

Количество ELISA-обработанных клонов	192
Количество положительных клонов (поглощение >0,2)	103
Количество переключающих клонов (SM +/- соотношение>2)	28

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

5 Из библиотеки фагового дисплея с рациональным дизайном антител, созданной в предшествующей практике (WO 2015/083764), антитела, проявляющие антигенсвязывающую активность в условиях присутствия АТФ или метаболита АТФ (например, АДФ, АМФ, аденозина (ADO) и т.д.) были получены. Для получения антител собирают фаги, презентующие антитела, 10 демонстрирующие способность связывания с антигеном, захваченным на гранулах, в присутствии АТФ или метаболита АТФ, после чего фаги выделяют из элюата, элюированного с шариков, в условиях отсутствия АТФ или метаболита АТФ.

15 Фаги получают обычным способом из *E. coli*, несущей сконструированную фагмиду для фагового дисплея. Раствор фаговой библиотеки получают разбавлением TBS популяции фагов, осажденных путем добавления 2,5 М NaCl/10% ПЭГ к культуральному раствору *E. coli*, в котором были получены фаги. Затем к раствору фаговой библиотеки добавляют БСА до конечной концентрации 4%. Пэннинг проводят с использованием антигена, 20 иммобилизованного на магнитных гранулах. В качестве магнитных гранул используют гранулы, покрытые NeutrAvidin (гранулы Sera-Mag SpeedBeads, покрытые NeutrAvidin), или гранулы, покрытые стрептавидином (Dynabeads M-280 Streptavidin). В качестве антигена используют биотинилированный абатацепт (Abatacept-Biotin).

25 Чтобы эффективно получить зависимое от малых молекул низкомолекулярное антитело-переключатель, которое может действовать как переключатель в раковой ткани, пэннинг для обогащения антител, которые связываются с антигеном в присутствии аденозин-5'-трифосфата (АТФ) или метаболита АТФ, и не связываются с антигеном в отсутствие АТФ или 30 метаболита АТФ, проводят со ссылкой на метод, показанный в предшествующей патентной литературе (WO 2015/083674).

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

Из одиночных колоний *E. coli*, полученных вышеописанным способом, получают культуральный супернатант, содержащий фаг, в соответствии с  
5 общепринятым методом (*Methods Mol. Biol.* 2002, 178:133-145). Восстановленный культуральный супернатант подвергают ультрафильтрации с использованием NucleoFast 96 (MACHEREY-NAGEL). Проток удаляют центрифугированием (4500 g, 45 минут) NucleoFast 96 с добавлением 100 мкл культурального супернатанта в каждую лунку. NucleoFast 96 с добавлением 100  
10 мкл H<sub>2</sub>O в каждую лунку снова промывают центрифугированием (4500 g, 30 мин). В итоге добавляют по 100 мкл TBS и получают раствор фага, содержащийся в супернатанте каждой лунки NucleoFast 96, который оставляют при комнатной температуре на 5 мин.

TBS или TBS, содержащий АТФ или его метаболит (SM/TBS), добавляют к  
15 очищенным фагам, и фаги подвергают анализу ELISA по следующей процедуре. Планшет для микротитрования StreptaWell 96 (фирма Roche) покрывают в течение ночи 100 мкл TBS, содержащего меченый биотином антиген (абатацепт-биотин), полученный в примере 1-1. После того как свободный абатацепт-биотин удаляют путем промывания каждой лунки планшета TBST, лунки  
20 блокируют 250 мкл 2% обезжиренного молока-TBS на 1 ч или дольше. После удаления 2% обезжиренного молока-TBS в каждую лунку добавляют подготовленные очищенные фаги и планшет оставляют при 37°C в течение 1 ч, что позволяет фагам, презентующим антигены, связываться с абатацептом-биотином, присутствующим в каждой лунке в отсутствие или присутствие АТФ  
25 или его метаболита. После того как каждую лунку планшета промывают TBST или TBST, содержащим АТФ или его метаболит (SM/TBST), туда добавляют HRP-конъюгированное анти-M13-антитело (фирма Amersham Pharmacia Biotech), разведенное TBS или SM/TBS, и этот планшет инкубируют 1 ч. После промывки TBST или ATP/TBST реакцию развития окраски раствора в каждой лунке, в  
30 которую добавляли один раствор TMB (ZYMED), останавливают добавлением серной кислоты, а затем измеряют изменение окраски по поглощению при 450 нм. В результате были подтверждены множественные антигены, которые связывались с mCTLA-4 только в присутствии АТФ. Результаты фагового ELISA показаны в табл. 16. В данном случае клоны, имеющие коэффициент

поглощения выше 2 в присутствии АТФ, определены как положительные, а клоны, имеющие коэффициент поглощения выше 2 в присутствии/отсутствии АТФ или его метаболита, определены как клоны, обладающие антигенсвязывающей способностью, которая зависит от АТФ или его метаболита (переключение клонов).

Таблица 16.

	4-й тест	5-й тест	Общее количество
Количество ELISA-обработанных клонов	288	288	576
Количество положительных клонов (S/N >2)	157	159	316
Количество переключающих клонов (SM± соотношение>2)	6	16	22

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

Нуклеотидные последовательности генов, амплифицированных с использованием специфических праймеров lacPF (SEQ ID NO: 2) и G1seqR (SEQ ID NO: 3) из клонов, обладающих антигенсвязывающей активностью, при условии наличия АТФ и ее метаболитов в результате анализа методом фагового ИФА (ELISA). В результате анализа были получены клоны ABADh11-4\_020, ABADh11-4\_086, ABADh12-4\_014, ABADh12-5\_001, ABADh12-5\_046 и ABADh5-5\_041, которые, как было установлено, обладают активностью связывания с меченым биотином абатацептом в присутствии АТФ и его метаболитов. Имена клонов были переименованы и стали обозначаться как АВАМ001, АВАМ002, АВАМ003, АВАМ004, АВАМ005 и АВАМ006, соответственно (табл. 17).

Таблица 17.

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



Контрольный пример 1-7. Экспрессия и очистка переключающих антител, у которых антиген-связывающая активность изменяется в зависимости от присутствия и отсутствия АТФ и ее метаболитов

Гены, кодирующие переменные области АВАМ001, АВАМ002, АВАМ003, АВАМ004, АВАМ005 и АВАМ006, полученные из библиотеки фагов рационального дизайна человека, встраивают в экспрессионную плазмиду животных IgG1/Lambda человека. Антитела экспрессируют с использованием следующего метода. Полученную плазмиду вводят методом липофекции в линию клеток FreeStyle 293-F, полученную из клеток эмбриональной почки человека (фирма Invitrogen), которая была суспендирована в экспрессионной среде FreeStyle 293 (фирма Invitrogen) при плотности клеток  $1,33 \times 10^6$  клеток/мл, и высевают по 3 мл/лунку в каждую лунку 6-луночных планшетов. Антитела очищают из культурального супернатанта, культивируемого в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (37°C, 8% CO<sub>2</sub>, 90 об/мин) в течение 4 дней с использованием среды rProtein A Sepharose™ Fast Flow (фирма Amersham Biosciences) методом, известным специалистам в данной области. Поглощение растворов очищенных антител при 280 нм измеряют с использованием спектрофотометра. По полученным измеренным значениям рассчитывают концентрацию очищенных антител с использованием коэффициента экстинкции, рассчитанного методом PACE (*Protein Science*, 1995, 4: 2411-2423).

Контрольный пример 1-8. Оценка связывающей активности полученных антител против hCTLA-4 в присутствии и в отсутствие АМФ методом IgG ELISA

Полученные шесть антител АВАМ001, АВАМ002, АВАМ003, АВАМ004, АВАМ005 и АВАМ006 анализируют методом IgG ELISA. Буферы, показанные в табл. 18, готовят надлежащим образом. В качестве антигена используют меченный биотином CTLA-4 человека (hCTLA-4-His-Biotin).

Таблица 18.

Буфер	Состав
Промывочный буфер	TBS, 0,1% Твин 20
Блокирующий буфер	TBS, 2% БСА
Буфер образца	TBS, 1 мМ АМФ

Сначала планшет для микротитрования StreptaWell 96 (фирма Roche) покрывают 100 мкл TBS, содержащего hCTLA-4-His-биотин, при комнатной температуре на 1 ч или дольше. После того как каждую лунку планшета

промывают буфером для промывки для удаления hCTLA-4-His-биотина, не связанного с планшетом, лунки блокируют 250 мкл блокирующего буфера на 1 ч или дольше. В каждую лунку, из которой удаляли блокирующий буфер, добавляют по 100 мкл каждого очищенного IgG в итоговой концентрации 2,5 мкг/мл в буфере для образцов, содержащем АМФ, в конечной концентрации 1 мМ, и планшет оставляют при комнатной температуре в течение 1 ч, что позволяет каждому IgG связываться с hCTLA-4-His-биотином, присутствующим в каждой лунке. После промывки промывочным буфером, содержащим АМР в конечной концентрации 1 мМ, планшет, в каждую лунку которого было добавлено HRP-конъюгированное анти-IgG антитело человека (фирма BIOSOURCE), разведенное буфером для образцов, инкубируют в течение 1 ч. После промывки промывочным буфером, содержащим малую молекулу, реакцию изменения окраски раствора в каждой лунке, в которую добавляли раствор ТМВ (фирма ZYMED), останавливают добавлением серной кислоты, а затем измеряют развитие окраски по поглощению при 450 нм. Использовали буферы, содержащие композиции, показанные в табл. 18.

Результаты измерений представлены в табл. 19. Переполненным лункам присваивают оценку 5,00. Результаты показывают, что у всех клонов АВАМ001, АВАМ002, АВАМ003, АВАМ004, АВАМ005 и АВАМ006 поглощение в отсутствие АМФ было значительно ниже, чем в присутствии АМФ. Этот результат подтверждает, что все клоны АВАМ001, АВАМ002, АВАМ003, АВАМ004, АВАМ005 и АВАМ006 обладают свойством изменять связывание с антигеном в зависимости от присутствия или отсутствия малых молекул.

Таблица 19.

Антитело	Абсорбция при 450 нм		
	Наличие малых молекул	Отсутствие малых молекул	S/N
АВАМ001	5000	3,455	1,45
АВАМ002	5000	0,139	35,97
АВАМ003	5000	3,180	1,57
АВАМ004	5000	0,643	7,78
АВАМ005	0,303	0,069	4,46
АВАМ006	2,995	0,776	3,86

25

Контрольный пример 1-9. Оценка воздействия АТФ и его метаболитов на связывание с CTLA-4 человека методом поверхностного плазмонного резонанса

АВАМ004 дополнительно оценивают как антитело-переключатель CTLA-4.

Взаимодействие реакции антиген-антитело между АВАМ004 и hCTLA-4-His-ВАР анализируют с использованием Biacore T200 (фирма GE Healthcare). После захвата АВАМ004 сенсорным чипом CM5 (фирма GE Healthcare), на  
 5 котором иммобилизован белок А/G (фирма Pierce) в соответствующем количестве методом сочетания с амином, допускают взаимодействие с антигеном hCTLA-4-His-ВАР, полученным в контрольном примере 1-1. TBS используют в качестве подвижного буфера, а 10 мМ глицин-HCl (pH 1,5) используют в качестве раствора для регенерации.

10 После захвата 1 мкг/мл АВАМ004, суспендированного в TBS, раствор, содержащий 500 нМ hCTLA-4-His-ВАР и 10 концентраций АТФ, АДФ или АМФ, разбавленных до концентрации от 4 из 4000 мкМ, и 2 мМ MgCl<sub>2</sub> вводят в каждую проточную кювету со скоростью потока 10 мкл/мин в течение 3 мин. Эти 3 минуты используют в качестве фазы связывания hCTLA-4-His-ВАР. После  
 15 завершения фазы связывания инъекцией вводят уже рабочий буфер в течение 2 мин, которые используют в качестве фазы диссоциации hCTLA-4-His-ВАР. После завершения фазы диссоциации вводят регенерирующий раствор со скоростью потока 30 мкл/мин в течение 30 сек. Указанное выше определяют как цикл измерения связывающей активности АВАМ004. Количество связывания  
 20 hCTLA-4-His-ВАР, которое взаимодействует с АВАМ004 в фазе связывания, корректируют в отношении количества захваченного антитела. Для анализа и построения графика по полученным результатам используют программное обеспечение Biacore T200 Evaluation Software Version: 2.0 и Microsoft Excel 2013 (фирма Microsoft).

25 Фиг. 15 представляет количество связывания АВАМ004 и hCTLA-4-His-ВАР в присутствии АТФ и его метаболитов, полученное с помощью описанного измерения.

На фиг. 15 подтверждено, что АВАМ004 обладает свойством связываться с hCTLA-4, используя в качестве переключателя не только АТФ, но и метаболиты  
 30 АТФ. Кроме того, показано, что это антитело обладает наиболее сильной связывающей активностью, особенно в присутствии АМР.

Контрольный пример 1-10. Оценка связывания антител с клетками, экспрессирующими CTLA-4 человека

Проточный цитометр используют для оценки изменений взаимодействия антиген-антитело между АВАМ004 и СТЛА-4 человека в присутствии и в отсутствие АМФ. Клетки СНО, которые стабильно экспрессируют СТЛА-4 человека (клетки hCTLA-4-СНО), получают в соответствующей концентрации.

5 Одновременно для суспензии используют PBS, содержащий 0,1% БСА (буфер FACS). К 100 мкл клеточного раствора добавляют антитело до конечной концентрации 10 мг/мл, затем добавляют АМФ до конечной концентрации 0, 0,4, 4, 40, 200 и 1000 мкМ и оставляют при 4°C в течение 30 мин. После этого клеточную линию промывают промывочным буфером, который представляет собой буфер FACS, содержащий АМФ в конечной концентрации 0, 0,4, 4, 40, 200 и 1000 мкМ, а затем вторичное антитело, меченное FITC ((Goat F(ab'2) Anti-Human IgG Mouse ads-FITC, фирма Beckman, номер в каталоге 732598), и снова оставляют при 4°C в течение 30 мин в темноте. После повторной промывке измеряют и анализируют с использованием проточного цитометра (FACS

10 CyAn™ ADP). Результаты представлены на фиг. 16.

Приведенные выше результаты показывают, что АВАМ004 проявляет связывающую активность, зависящую от концентрации АМФ, с клетками, экспрессирующими hCTLA-4, и зависит от концентрации АМФ активность связывания не только с растворимыми антигенами, но также и с антигенами мембранного типа.

20

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

Активность ADCC исследуемого антитела, которое связывается с антигеном АТФ-зависимым образом, измеряют в соответствии со следующим методом. Активность ADCC исследуемого антитела одновременно измеряют следующим образом с использованием моноклеарных клеток периферической крови человека (далее называемых МКПК человека) в качестве эффекторных клеток.

25

30 Сначала готовят раствор МКПК человека. У здоровых добровольцев (взрослых мужчин) отбирают по 50 мл периферической крови с помощью шприца, уже содержащего 200 мкл раствора гепарина 1000 ЕД/мл (Ново-гепарин для инъекций 5000 ЕД, фирма Novo Nordisk). Периферическую кровь, разведенную в 2 раза PBS(-), делят на 4 аликвоты и добавляют в пробирки для

разделения лимфоцитов Leucosep (фирма Greiner Bio-One), которые центрифугируют после предварительной инъекции 15 мл Ficoll-Paque PLUS. Пробирки для разделения, в которые вносили аликвоты периферической крови, центрифугируют в режиме 2150 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем разделяют фракции мононуклеарных клеток. После однократной промывки содержащихся во фракциях клеток однократно препаратом RPMI-1640 (фирма Nacalai Tesque), содержащим 10 % FBS (далее – 10 % FBS/RPMI), клетки суспендируют в 10 % FBS/RPMI до плотности клеток  $1 \times 10^7$  клеток/мл. Суспензию клеток используют в качестве раствора МКПК человека для последующих экспериментов.

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

Активность ADCC оценивают по высвобождению ЛДГ (лактатдегидрогеназы). Сначала в каждую лунку 96-луночного планшета с U-образным дном добавляют по 50 мкл раствора антител, приготовленного в каждой из концентраций (0, 0,04, 0,4, 4 и 40 мкг/мл), и в лунки высевали по 50 мкл из клеток-мишеней ( $1 \times 10^4$  клеток/лунку). Кроме того, в каждую лунку добавляют по 50 мкл раствора АМФ и смесь оставляют при комнатной температуре на 15 мин. В каждую лунку добавляют по 50 мкл ( $5 \times 10^5$  клеток/лунку) раствора МКПК человека, центрифугируют планшет и затем оставляют на 4 ч при 37°C в инкубаторе с 5% углекислым газом. После завершения реакции 100 мкл культурального супернатанта собирают и переносят в 96-луночный планшет для измерения, а затем катализатор (C) и раствор красителя (D), присоединенные к набору для обнаружения ЛДГ (ТаКаRa), смешивают 1:45, и добавляют 100 мкл этой смеси. После реакции при комнатной температуре в течение 15 мин добавляют 50 мкл 1N HCl для остановки реакции. Измеряют поглощение при 492 нм и активность ADCC оценивают по высвобождению ЛДГ. Активность ADCC определяют на основе следующей формулы:

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

В приведенной выше формуле А означает среднее значение активности ЛДГ (ОП при 492 нм) в лунках, в которые добавляют каждое тестируемое антитело. В означает среднее значение активности ЛДГ (ОП при 492 нм) в лунках, в которые после реакции добавляют 10 мкл 20% водного раствора Triton-X. С означает среднее значение активности ЛДГ (ОП при 492 нм) в лунках, в которые к клеткам-мишеням добавляют 150 мкл 10% FBS/RPMI или 100 мкл 10% FBS/RPMI и 50 мкл раствора АМФ. D означает среднее значение активности ЛДГ (ОП при 492 нм) в лунках, содержащих только 10% FBS/RPMI. Тест проводят в двух повторностях и рассчитывают среднее значение активности ADCC (%) в тесте, отражающее активность ADCC исследуемого антитела. Результаты представлены на фиг. 17.

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

Контрольный пример 2. Анализ кристаллической структуры анти-CTLA-4 антитела, обладающего АТФ-зависимыми связывающими свойствами

Контрольный пример 2-1. Рентгеноструктурный анализ анти-CTLA-4-связывающего антитела АВАМ004, в котором АМР используется в качестве переключателя

Для hCTLA-4-связывающего антитела АВАМ004, которое использует АМФ в качестве переключателя и получено из библиотеки в контрольном примере 1, анализируют кристаллические структуры отдельно фрагмента Fab АВАМ004, комплекса фрагмента Fab АВАМ004 и АМФ и комплекса фрагмента Fab АВАМ004, АМФ и внеклеточного домена hCTLA-4.

Контрольный пример 2-2. Приготовление антитела АВАМ004 полной длины для кристаллизации

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

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

Фрагмент Fab антитела АВАМ004 получают обычным методом рестрикционного расщепления протеазой rLys-C (фирма Promega, номер в каталоге V1671) с последующей загрузкой в колонку с белком А (MabSelect

SuRe, фирма GE Healthcare), катионообменную колонку (HiTrap SP HP, фирма GE Healthcare) и колонку для гель-фильтрации (Superdex200 16/60, фирма GE Healthcare) для удаления фрагментов Fc. Фракции, содержащие фрагменты Fab, объединяют и хранят при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

5            Контрольный пример 2-4. Получение кристаллов фрагмента Fab АВАМ004

Фрагмент Fab антитела АВАМ004 для кристаллизации, очищенный методом из примера 2-3, концентрируют примерно до 13 мг/мл и кристаллизуют при  $20^{\circ}\text{C}$  методом диффузии паров в сидячей капле. Резервуарный раствор состоит из 0,1 М MES, pH 6,5, 25 % масс./об. полиэтиленгликоля 4000.

10          Полученные кристаллы погружают в раствор 0,08 М MES, pH 6,5, 20 % масс./об. полиэтиленгликоля 4000 и 20 % этиленгликоля.

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

15          Данные рентгеновской дифракции измеряют с помощью BL-17A радиационной установки Photon Factory Исследовательской организации ускорителей высоких энергий (High Energy Accelerator Research Organization). Во время измерения кристаллы постоянно выдерживают в замороженном состоянии в токе азота при температуре  $-178^{\circ}\text{C}$ , в общей сложности было получено 360 рентгеновских дифракционных изображений с помощью CCD-

20          детектора Quantum 270 (ADSC), подключенного к каналу луча, при вращении кристаллы за раз поворачиваются на  $0,5^{\circ}$ . Определение параметров ячейки, индексирование дифракционных пятен и обработку дифракционных данных по дифракционным изображениям проводят с помощью программы Xia2 (*J. Appl. Cryst.* 2010, 43:186-190), пакета XDS (*Acta. Cryst.* 2010, D66:125-132. Scala (*Acta.*

25          *Cryst.* 2006, D62:72-82), и в результате получают данные интенсивности дифракции с разрешением до  $1,70 \text{ \AA}$ . Статистика кристаллографических данных представлена в табл. 20.

Структуру определяют методом молекулярного замещения с использованием программы Phaser (*J. Appl. Cryst.* 2007, 40, 658-674). Модель

30          поиска фрагментов Fab получена из опубликованной кристаллической структуры Fab (код PDB: 4NKI). Модель была построена с помощью программы Coot (*Acta Cryst.* 2010, D66: 486-501) и уточнена с помощью программы Refmac5 (*Acta Cryst.* 2011, D67: 355-467). Фактор кристаллографической достоверности (R) данных интенсивности дифракции от 52,92 до  $1,70 \text{ \AA}$  составил 16,92%, а

значение свободного R составило 21,22%. Статистика структурного уточнения представлена в табл. 20.

Таблица 20. Сводка данных рентгеноструктурного анализа и статистическое уточнение

Собранные данные	АБАМ004fab	АБАМ004fab -АМФ	АБАМ004fab -АМФ-СТЛА-4
Пространственная группа	$P2_12_12_1$	$P42_12$	$P4_12_12$
Габариты одной ячейки			
a,b,c (Å)	64,27, 70,86, 79,59	135,75, 135,75, 66,04	72,29, 72,29, 309,31
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90,00, 90,00, 90,00	90,00, 90,00, 90,00	90,00, 90,00, 90,00
Разрешение (Å)	52,92-1,70	47,33-2,89	52,81-3,09
Число общих отражений	296585	181799	157732
Число уникальных отражений	40500	14366	16037
Комплектность (крайняя оболочка)	99,6(98,8)	100,0(100,0)	99,9(99,9)
$R_{\text{merge}}^a$ (крайняя оболочка)(%)	5,8(67,6)	17,3(88,7)	14,1(63,2)
Доработка			
Разрешение (Å)	52,92-1,70	47,33-2,89	52,81-3,09
Число отражений	38523	13658	15145
Rфакторы <sup>б</sup> ( $R_{\text{free}}^c$ ) (%)	16,92 (21,22)	19,97(25,62)	23,49(31,02)
rms Отклонение от идеального значения			
длина связей (Å)	0,0128	0,0037	0,0038
углы связей (°)	1,7102	0,9275	0,8442

5

Угол связи (°)	1,7102	0,9275	0,8442
----------------	--------	--------	--------

a:  $R_{\text{merge}} = \frac{\sum hkl \sum j |I_j(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum hkl \sum j |I_j(hkl)|}$ , где  $I_j(hkl)$  и  $\langle I(hkl) \rangle$

10

представляют собой интенсивность измерения  $j$  и интенсивность среднего отражения с потенциалом  $hkl$ .

б: R-факторы  $= \frac{\sum hkl |F_{\text{расчетн.}}(hkl) - F_{\text{обзорн.}}(hkl)|}{\sum hkl |F_{\text{обзорн.}}(hkl)|}$ , где  $F_{\text{обзорн.}}$  и  $F_{\text{расчетн.}}$  соответственно представляют собой обзорную и расчетную амплитуды структурных факторов.

15

в:  $R_{\text{free}}$  рассчитывают от 5% отражений, случайно не используемых.

Контрольный пример 2-6. Получение фрагмента Fab АВАМ004 из антитела полной длины для анализа кристаллической структуры комплекса фрагмента Fab антитела АВАМ004 с АМФ, и комплекса фрагмента Fab антитела АВАМ004, АМФР и hCTLA-4



Фрагмент Fab АВАМ004 получают обычным методом рестрикционного расщепления папаином (фирма Roche Diagnostics, номер в каталоге 1047825) с последующей загрузкой в колонку с белком А (MabSelect SuRe, фирма GE Healthcare), катионообменную колонку (HiTrap SP HP, фирма GE Healthcare) и колонку для гель-фильтрации (Superdex200 16/60, фирма GE Healthcare) для удаления фрагментов Fc. Фракции, содержащие фрагменты Fab, объединяют и хранят при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

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

10 Фрагмент Fab АВАМ004 для кристаллизации, очищенный по способу примера 2-6, концентрируют примерно до 13 мг/мл, к которому добавляют АМФ, чтобы получить конечную концентрацию 2 мМ, и кристаллизацию проводят при  $20^{\circ}\text{C}$  с помощью метода диффузии паров в сидячей капле. Резервуарный раствор состоит из 0,1 М буфера Morpheus 2, pH 7,5, 37,5% мас./об. MPD\_P1K\_P3350, 10% карбоновых кислот Morpheus (Morpheus, фирма Molecular Dimensions).

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

20 Данные рентгеновской дифракции были измерены с помощью BL-1A радиационной установки Photon Factory в Исследовательской организации ускорителей высоких энергий (High Energy Accelerator Research Organization). Во время измерения кристаллы постоянно выдерживают в замороженном состоянии в токе азота при температуре  $-178^{\circ}\text{C}$ , было получено 720  
25 рентгеновских дифракционных изображений с помощью детектора Pilatus 2M (фирма DECTRIS), подключенного к пучку, при повороте кристаллов на  $0,25^{\circ}$  за один раз. Определение параметров ячейки, индексирование дифракционных пятен и обработку данных по дифракционным изображениям проводят с помощью программы Xia2 (*J. Appl. Cryst.* 2010, 43:186-190), пакета XDS (*Acta. Cryst.* 2010, D66:125-132) и Scala (*Acta. Cryst.* 2006, D62:72-82), и в результате  
30 получены данные интенсивности дифракции до разрешения  $1,70 \text{ \AA}$ . Статистика кристаллографических данных представлена в табл. 10.

Структуру определяют методом молекулярного замещения с использованием программы Phaser (*J. Appl. Cryst.* 2007, 40, 658-674). Модель

поиска фрагментов Fab получена из опубликованной кристаллической структуры Fab (код PDB: 4NKI). Модель построена с помощью программы Coot (*Acta Cryst.* 2010, D66: 486-501) и уточнена с помощью программы Refmac5 (*Acta Cryst.* 2011, D67: 355-367). Фактор кристаллографической достоверности (R) данных интенсивности дифракции от 47,33-2,89 Å составляет 19,97%, значение свободного R составляет 25,62%. Статистика структурного уточнения представлена в табл. 20.

#### Контрольный пример 2-9. Получение внеклеточного домена hCTLA-4

Внеклеточный домен hCTLA-4 получают обычным методом рестрикционного расщепления абатацепта эндопротеиназой Lys-C (фирма Roche, номер в каталоге 11047825001) с последующей загрузкой в колонку с белком А (MabSelect SuRe, фирма GE Healthcare) и колонку для гель-фильтрации (Superdex200 10/300, фирма GE Healthcare) для удаления фрагментов Fc. Фракции, содержащие внеклеточный домен hCTLA-4, объединяют и хранят при -80°C.

#### Контрольный пример 2-10. Получение комплекса фрагмента Fab АВАМ004, АМФ и внеклеточного домена hCTLA-4

Внеклеточный домен hCTLA-4, очищенный по способу из примера 2-9, смешивают с фрагментом Fab АВАМ004, очищенным по способу из примера 2-6, в молярном соотношении 1,5:1, и к нему добавляют АМФ, чтобы получить конечную концентрацию 2 мМ. Комплекс очищают гель-фильтрационной хроматографией (Superdex200 10/300, фирма GE Healthcare) с использованием колонки, уравновешенной 25 мМ HEPES, pH 7,5, 100 мМ NaCl, 2 мМ АМФ.

#### Контрольный пример 2-11. Получение кристаллов комплекса фрагмента Fab АВАМ004, АМФ и внеклеточного домена hCTLA-4

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

#### Контрольный пример 2-12. Сбор данных рентгеноструктурного анализа кристаллов комплекса фрагмента Fab АВАМ004, АМФ и hCTLA-4 и определение структуры

Данные рентгеновской дифракции измеряют с помощью BL32XU SPring-8. Во время измерения кристаллы постоянно выдерживают в замороженном состоянии в потоке азота при температуре  $-178^{\circ}\text{C}$ , и в общей сложности было получено 180 рентгеновских дифракционных изображений с помощью детектора  
5 CCD MX-225HS (фирма RAYONIX), подключенного к пучку, при повороте кристаллы на  $1,0^{\circ}$  за один раз. Определение параметров ячейки, индексирование дифракционных пятен и обработку данных по дифракционным изображениям проводят с помощью программы Xia2 (*J. Appl. Cryst.* 2010, 43:186-190), пакета XDS (*Acta. Cryst.* 2010, D66:125-132) и Scala (*Acta. Cryst.* 2006, D62:72-82), и в  
10 результате получены данные интенсивности дифракции до разрешения  $1,70 \text{ \AA}$ . Статистика кристаллографических данных представлена в табл. 20.

Структуру определяют методом молекулярного замещения с использованием программы Phaser (*J. Appl. Cryst.* 2007, 40, 658-674). Модель поиска фрагментов Fab получена из опубликованной кристаллической структуры  
15 Fab (код PDB: 4NKI), а модель поиска внеклеточного домена hCTLA-4 получена из опубликованной кристаллической структуры CTLA-4 человека (код PDB: 3OSK, *J. Biol. Chem.* 2011, 286: 6685-6696). Модель была построена с помощью программы Coot (*Acta Cryst.* 2010, D66: 486-501) и уточнена с помощью программы Refmac5 (*Acta Cryst.* 2011, D67: 355-367). Фактор  
20 кристаллографической достоверности (R) данных интенсивности дифракции от  $52,81\text{-}3,09 \text{ \AA}$  составил 23,49%, а значение свободного R составило 31,02%. Статистика структурного уточнения представлена в табл. 20.

#### Контрольный пример 2-13. Определение сайта взаимодействия между АВАМ004 и АМФ

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

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

В частности, как показано на фиг. 18, фрагмент аденинового кольца АМФ  
30 распознается боковыми цепями T33, принадлежащими CDR1 тяжелой цепи, и Y95, L100B и W100C, принадлежащими CDR3, и основными цепями G96 и M100A антитела. В частности установлено, что карбонильные атомы кислорода в основных цепях G96 и M100A образуют водородные связи с N в положении 6 АМФ, группа NH амида основной цепи W100C образует водородную связь с N в

положении 1, а боковые цепи Y95, L100B и W100C взаимодействуют с использованием пи-электронов фрагмента аденинового кольца, так что антитело строго распознает фрагмент аденинового кольца. Фрагмент рибозы распознается каждой из боковых цепей T33, принадлежащих CDR1 тяжелой цепи, и Y56 и Y58, принадлежащих CDR2, посредством сил Ван-дер-Ваальса и посредством взаимодействия пи-электронов Y56. Кроме того, фрагмент фосфатной группы распознается каждой из боковых цепей T33, принадлежащих тяжелой цепи CDR1, и S52, S52A и R53, принадлежащих CDR2, и основной цепи S52A. В частности, считается, что водородные связи, образованные боковой цепью T33 и амидной группой NH основной цепи S52A с фрагментом фосфатной группы, и ван-дер-ваальсовы взаимодействия S52 и R53 играют важную роль в распознавании части фосфатной группы. Нумерация аминокислотных остатков Fab основана на схеме нумерации Kabat.

#### Контрольный пример 2-14. Идентификация эпитопов АВАМ004

На фиг. 19 и 20 эпитопы контактной области Fab АВАМ004 картированы в кристаллической структуре hCTLA-4 и в аминокислотной последовательности, соответственно. Эпитопы содержат аминокислотные остатки hCTLA-4, содержащие один или более атомов, отличных от водорода, расположенных в пределах 4,2 Å от любой части Fab АВАМ004 или АМФ в кристаллической структуре.

Из кристаллической структуры становится ясно, что по крайней мере M3, E33, R35, T53, E97, M99, Y100, P101, P102, P103, Y104, Y105 и L106 антигена распознаются CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, CDR1 и CDR3 легких цепей антитела и АМФ. В частности, петля, состоящая из фрагмента M99-Y104 антигена, отчетливо распознается антителом, так как она скрыта в петле CDR антитела, и считается, что эта петля играет основную роль в распознавании антигена антителом.

#### Контрольный пример 2-15. АМФ-зависимый механизм связывания антигена

Вариабельную область антитела экстрагируют из кристаллической структуры только АВАМ004 Fab, кристаллической структуры комплекса АВАМ004 Fab и АМФ и кристаллической структуры тройного комплекса, состоящего из АВАМ004 Fab, АМФ и CTLA-4; фиг. 21. представляет собой наложенный рисунок выделенных вариабельных областей, сосредоточенных вокруг тяжелой цепи. Для АМФ-зависимого связывания антигена важным

считают не только прямое взаимодействие между АМФ и CTLA-4, показанным в контрольном примере 2-14, но и структурное изменение антитела, связанное со связыванием АМФ.

5 Как показано на фиг. 21, путем сравнения кристаллической структуры одного антитела с кристаллической структурой антитела, с которым связывается АМФ, установлено, что петлевые структуры CDR3 тяжелой цепи и CDR3 легкой цепи, а также угол кручения между тяжелой цепью и легкой цепью в вариабельной области антитела также изменялся. Кроме того, сравнивая кристаллическую структуру антитела, с которым связывается АМФ, и 10 кристаллическую структуру тройного комплекса, состоящего из антитела, АМФ и CTLA-4, также признано, что структуры CDR3 тяжелой цепи и CDR1 легкой цепи дополнительно изменены путем антиген-связывающих, проявляющих антигенную зависимость структурных изменений. С другой стороны, поскольку структура петли CDR3 легкой цепи и угол закручивания между тяжелой цепью и 15 легкой цепью не изменились, полагают, что связывание АМФ может изменить структуру антитела до состояния, близкого к структуре во время связывания антигена. Таким образом, полагают, что структурные изменения, связанные со связыванием АМФ, необходимы для формирования подходящей структуры для связывания антигена и играют важную роль в зависимом от АМФ связывании 20 антигена.

### Контрольный пример 3. Получение CTLA-4-измененных антител и оценка их активности

#### Контрольный пример 3-1. Получение CTLA-4-связывающих с повышенной активностью вариантов антитела АВАМ004

25 Аминокислотная последовательность АВАМ004 (VH SEQ ID NO: 10, VL SEQ ID NO: 11), полученная из фаговой библиотеки рационального дизайна человека, описанной в контрольном примере 1, изменена для снижения CTLA-4-связывающей активности указанной последовательности в отсутствие аналогов АТФ и для повышения активности связывания CTLA-4 человека в присутствии 30 аналогов АТФ и для усиления связывания с АТФ и аналогами АТФ. Чтобы достичь этого, были созданы варианты с точечными мутациями в остатках, которые, как ожидается, будут участвовать в связывании, на основе ко-кристаллической структуры АВАМ004 и АМФ и ко-кристаллической структуры АВАМ004, АМФ и CTLA-4 человека, полученных описанным методом в

контрольном примере 2. Кроме того, также созданы варианты, в которых каждая аминокислота, содержащаяся в CDR, заменена на Ala или Pro. Варианты точечных мутаций измеряют с помощью Biacore T200 или Biacore 4000 (фирма GE Healthcare) для активности связывания CTLA-4 человека (абатацепт и hCTLA-4-His-ВАР) в отсутствие АТФ и в присутствии АТФ, АДФ или АМФ для скрининга мутаций, которые усиливают связывающую активность. Варианты получают путем объединения мутаций, которые усиливают связывающую активность, и значение  $K_D$  рассчитывали с помощью программного обеспечения Biacore. В результате установлено, что введение замен Н32А и S52аТ в тяжелую цепь АВАМ004 и Т24D, Т26Р и Е50F в легкую цепь (согласно нумерации Kabat) усиливает способность связывания АВАМ004. Вариант обозначен как 04Н0150/04L0072 (VH SEQ ID NO: 47, VL SEQ ID NO: 48).

Контрольный пример 3-2. Измерение методом поверхностного плазмонного резонанса влияния АТФ и его метаболитов на активность по связыванию CTLA-4 человека с АВАМ004 и 04Н0150/04L0072

Сначала был создан чип для измерения Biacore T200. Температура Biacore T200 установлена на 25°C, а скорость потока установлена на 10 мкл/мин. HBS-EP+ используют в качестве подвижного буфера. Смесь равных объемов NHS (N-гидроксисукцинимид) и EDC (N-этил-N'-(диметиламинопропил)карбодиимид) добавляют к сенсорному чипу CM5 (фирма GE Healthcare) со скоростью потока 10 мкл/мин в течение 10 минут для активирования проточных кювет. Затем добавляют 25 мкг/мл белка А/С (фирма Pierce), суспендированного в 10 мМ ацетата натрия, рН 4,0, и оставляют для связывания при 10 мкл/мин в течение 30 мин. Затем избыточные активные группы на проточных кюветах блокируют добавлением 1 М раствора этаноламина-НСl со скоростью 10 мкл/мин в течение 10 мин.

Затем измеряют влияние АТФ и его метаболитов на связывание целевого антитела с CTLA-4 человека. Заданная температура составляет 25°C, а в качестве подвижного буфера используют ТBS. 10 мМ глицин-НСl (рН 1,5) используют в качестве раствора для регенерации. После того как антитело, суспендированное в ТBS, можно было захватить, в каждую проточную кювету вводят раствор ТBS, содержащий 500 нМ hCTLA-4-His-ВАР, 10 концентраций АТФ, АДФ или АМФ, разбавленных в обычном соотношении 4 из 4000 мкМ и 2 мМ MgCl<sub>2</sub> при скорости потока 10 мкл/мин в течение 3 мин. Эти 3 мин

используют в качестве фазы связывания hCTLA-4-His-ВАР. После завершения фазы связывания инъекцию переключают на подвижный буфер на 2 минуты, которые используют в качестве фазы диссоциации. После завершения фазы диссоциации вводят регенерирующий раствор со скоростью потока 30 мкл/мин в течение 30 сек; описанное выше рассматривают как цикл измерения активности связывания. Количество связывания hCTLA-4-His-ВАР, которое взаимодействовало с АВАМ004 или 04Н0150/04L0072 в фазе связывания, корректируют по количеству захваченного антитела. Результаты показаны на фиг. 12. Кроме того, при измерении связывания АВАМ004 и 04Н0150/04L0072 концентрацию малых молекул в фазе связывания поддерживают на уровне 62,5 мкМ или 1 мМ, а 8 концентраций hCTLA-4-His-ВАР разбавляют в обычном соотношении 2 из 2000 нМ и используют в фазе связывания. Значения  $K_D$ , полученные в результате анализа количества связывания hCTLA-4-His-ВАР, показаны в табл. 11. Для анализа и построения графика данных используют программное обеспечение Biacore T200 версия: 2.0 и Microsoft Excel 2013 (фирма Microsoft). Для расчета значения  $K_D$  используют устойчивую модель аффинности.

Таблица 21

Лиганд	Образец	$K_D$ (М)	
		SM (62,5 мкМ)*	SM (1мМ)
04Н0150/04L0072	hCTLA-4_АМФ	6,9E-07	2,3E-07
	hCTLA-4_АДФ	4,2E-07	3,2E-07
	hCTLA-4_АТФ	8,1E-07	3,2E-07
АВАМ004	hCTLA-4_АМФ	4,3E-06	1,4E-06
	hCTLA-4_АДФ	2,5E-06	1,5E-06
	hCTLA-4_АТФ	5,5E-06	2,3E-06

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

Контрольный пример 3-3. Повышение связывающей способности за счет внесения различных изменений

Для создания улучшенных анти-CTLA-4 антител аминокислотные изменения были специально введены в 04H0150/04L0072, которые представляют собой переменные области антитела против CTLA-4 человека, полученного в контрольном примере 3-1. Варианты, в которых аминокислотная замена каждой из 18 аминокислот, кроме цистеина, проводилась во всех CDR 04H0150 и 04L0072, были созданы способами, известными специалистам в данной области, такими как ПЦР. Измерения около 1200 вариантов, созданных для связывания с CTLA-4 человека, были выполнены с использованием программного обеспечения Biacore 4000. Белок A/G (фирма Thermo Fisher Scientific) иммобилизован на сенсорном чипе Series S CM5 (фирма GE Healthcare), и антитела захватываются чипом путем взаимодействия с культуральным супернатантом, содержащим вариант антитела. Затем раствор CTLA-4 человека, к которому добавлена малая молекула (АТФ, АДФ или АМФ), или раствор CTLA-4 человека, к которому не добавлялась малая молекула, приводят во взаимодействие с антителом для оценки связывающей способности антитела к CTLA-4 человека в присутствии или в отсутствие малой молекулы. Анализ проводят при 25°C с использованием трис-буферного солевого раствора, 0,02% PS20 в качестве подвижного буфера.

Изменения, усиливающие связывание с CTLA-4 человека в присутствии малой молекулы, и изменения, снижающие связывание с CTLA-4 человека в отсутствие малой молекулы, были выявлены с помощью описанного выше метода, и объединены для получения антител против CTLA-4 человека, показывающих лучшие профили. К гену тяжелой цепи антитела 04H0150-G1m (SEQ ID NO: 209), который имеет последовательность 04H0150 в качестве переменной области тяжелой цепи и G1m (SEQ ID NO: 82), в котором удалены С-концевые Gly и Lys IgG1 человека в качестве константной области тяжелой цепи, изменения, обусловленные введением изменений триплетного кода аминокислотной последовательности и замен нуклеотидов рамки считывания, объединяют для получения генов тяжелой цепи антитела. Для легкой цепи антитела 04L0072-lam1 (SEQ ID NO: 208), имеющей 04L0072 в качестве переменной области легкой цепи и  $\lambda$ -цепи lam1 (SEQ ID NO: 87) в качестве константной области легкой цепи человека, обнаруженные изменения объединяют для получения генов легкой цепи антитела. Кроме того, также создают вариант, в котором рамка считывания переменной области и



константной области легкой цепи заменены последовательностью к-цепи человека. Для сравнения, получают ген тяжелой цепи антитела MDX10D1H-G1m (SEQ ID NO: 210), содержащий переменную область тяжелой цепи MDX10D1H (SEQ ID NO: 154), и ген легкой цепи антитела MDX10D1L-k0MT (SEQ ID NO: 211), имеющие переменную область легкой цепи MDX10D1L (SEQ ID NO: 155) существующего антитела против CTLA-4 человека, описанного в WO 0114424. Антитела экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области, путем объединения этих генов для получения представляющих интерес антител против CTLA-4. В табл. 12 перечислены SEQ ID NO

5

10

вариабельных областей тяжелой цепи, переменных областей легкой цепи, константных областей тяжелой цепи, константных областей легкой цепи и гиперпеременных областей полученных антител.

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

15

20

Таблица 22. Аминокислотные последовательности тяжелых цепей, легких цепей и их гиперпеременных областей (обозначены как SEQ ID NO:).

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

5 Biacore T200 используют для измерения связывания полученных антител с CTLA-4 человека. В качестве рабочего буфера используют 20 мМ ACES (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween 20 с добавлением АТФ до нужной концентрации, анализ проводят при 37°C. Во-первых, белок G (фирма CALBIOCHEM) иммобилизуют на сенсорном чипе серии S CM3 (фирма GE Healthcare), и антитела захватывают путем взаимодействия с чипом раствора антител, приготовленного в подвижном буфере, не содержащем АТФ. Далее, при
 10 взаимодействии с раствором CTLA-4 человека, приготовленным в подвижном буфере, содержащем АТФ до желаемой концентрации, или с раствором CTLA-4 человека, приготовленным в подвижном буфере, не содержащем АТФ, оценивают связывающую способность антитела к CTLA-4 человека в присутствии или в отсутствие АТФ. Чипы регенерируют с помощью 25 мМ
 15 NaOH и 10 мМ глицин-HCl (pH 1,5) и проводят анализ путем повторного захвата антител. Константу диссоциации каждого антитела относительно CTLA-4 рассчитывают с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software 2.0. В частности, константу скорости связывания  $k_a$  (л/моль/сек) и константу скорости диссоциации  $k_d$  (1/сек) рассчитывают путем
 20 глобальной подгонки сенсорограмм, полученных в результате измерения, с

использованием модели связывания Ленгмюра 1:1. По этим значениям рассчитывают константу диссоциации  $K_D$  (моль/л). В качестве альтернативы константу диссоциации  $K_D$  (моль/л) рассчитывают по модели стационарного состояния. Кроме того, количество связывания CTLA-4 на единицу количества антитела рассчитывают путем корректировки количества связанного CTLA-4, рассчитанного по сенсограмме, полученной в результате анализа, с количеством антител, захваченных на поверхности чипа. В табл. 23 показаны результаты этих анализов.

Таблица 23. Анализ связывания измененного антитела с CTLA-4 человека

Антитело	Связывание с CTLA4 человека				$K_D$ CTLA4 человека (M)		
	Без АТФ	АТФ= 1 мкМ	АТФ= 10 мкМ	АТФ= 100 мкМ	Без АТФ	АТФ= 10 мкМ	АТФ= 100 мкМ
MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT	0,189	0,189	0,181	0,170	4,8E-08	4,9E-08	4,5E-08
04H0150-G1m/04L0072-lam1	0,001	0,001	0,010	0,056	N.A.	N.A.	1,9E-06
04H1077-G1m/04L1041-lam1	0,006	0,023	0,094	0,172	N.A.	7,3E-07	1,4E-07
04H1077-G1m/04L1063-lam1	0,001	0,003	0,029	0,105	N.A.	N.A.	5,8E-07
04H1077-G1m/04L1027-lam1	0,000	0,001	0,024	0,099	N.A.	N.A.	6,7E-07
04H1077-G1m/04L1034-lam1	0,004	0,007	0,041	0,114	N.A.	N.A.	3,2E-07
04H1077-G1m/04L1066-lam1	0,020	0,057	0,142	0,185	*6,9E-06	2,8E-07	4,8E-08
04H1077-G1m/04L1067-lam1	0,012	0,041	0,131	0,192	N.A.	4,0E-07	7,6E-08
04H1077-G1m/04L1068-lam1	0,005	0,018	0,080	0,165	N.A.	8,8E-07	1,5E-07
04H1077-G1m/04L1086-lam1	0,010	0,031	0,106	0,181	N.A.	6,9E-07	1,1E-07
04H1077-G1m/04L1305-k0MT	0,018	0,046	0,128	0,185	*6,5E-06	3,6E-07	5,6E-08
04H1206-G1m/04L1086-lam1	0,010	0,029	0,103	0,179	N.A.	6,8E-07	1,2E-07
04H1207-G1m/04L1086-lam1	0,013	0,047	0,137	0,196	N.A.	3,3E-07	5,9E-08
04H1208-G1m/04L1086-lam1	0,005	0,030	0,108	0,170	N.A.	4,5E-07	7,4E-08
04H1208-G1m/04L1407-k0MT	0,138	0,175	0,200	0,214	*4,3E-07	2,3E-08	6,2E-09

10

N.A. Результаты чрезвычайно низкие и не позволяют определить величину  $K_D$ .

\*Константу диссоциации  $K_D$  (М/л) рассчитывают по модели стационарного состояния.

Значение «связывание с CTLA-4 человека» в таблице указывает количество связываемого антигена CTLA-4 человека на единицу количества антитела, когда  
5 применяют 1000 нМ CTLA-4 человека при каждой из перечисленных концентраций АТФ, и « $K_D$  для CTLA-4 человека (М)» означает константу диссоциации для CTLA-4 человека при каждой концентрации АТФ. Значения  $K_D$ , отмеченные знаком «\*», рассчитаны с использованием стационарной модели. Установлено, что все варианты, полученные с использованием 04Н0150-  
10 G1m/04L0072-lam1 в качестве исходного антитела, обладают повышенным связыванием в присутствии АТФ по сравнению с 04Н0150-G1m/04L0072-lam1. Кроме того, как 04Н0150-G1m/04L0072-lam1, так и эти варианты проявляют повышенное связывание при концентрации АТФ 10 мкМ по сравнению с концентрацией 1 мкМ; связываемое количество при 100 мкМ еще выше, таким  
15 образом показана зависимость связывания с CTLA-4 человека от концентрации АТФ. С другой стороны, сравнение с MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT не показало такого зависимого от концентрации АТФ связывания с CTLA-4 человека. Хотя 04Н1077-G1m/04L1305-k0MT, в котором последовательность легкой цепи 04Н1077-G1m/04L1086-lam1 и константная область заменены к-  
20 цепью человека, обладают повышенным связыванием с CTLA-4 человека в отсутствие АТФ в отличие от 04Н1077-G1m/04L1086-lam1, зависящее от концентрации АТФ связывание также усиливалось. Эти результаты показали, что свойство связываться с CTLA-4 человека АТФ-зависимым образом сохраняется, даже когда последовательность заменена последовательностью к-  
25 цепи человека. Среди разработанных в настоящем изобретении антител 04Н1077-G1m/04L1066-lam1, 04Н1077-G1m/04L1305-k0MT и 04Н1207-G1m/04L1086-lam1 показывают почти такую же связывающую активность, что и существующее анти-CTLA-4 антитело человека MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT в условиях, когда АТФ присутствует в количестве 100 мкМ, и 04Н1208-  
30 G1m/04L1407-k0MT проявляет более сильную связывающую активность, чем MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT в условиях, когда АТФ присутствует в количестве 10 мкМ или более.

Затем среди антител, представленных в табл. 23, оценивают связывание 04Н1077-G1m/04L1086-lam1 и 04Н1208-G1m/04L1407-k0MT с CTLA-4 мыши.

Для сравнения получают ген тяжелой цепи антитела hUH02-G1d (SEQ ID NO: 212), содержащий переменную область тяжелой цепи hUH02 (SEQ ID NO: 156) антитела против CTLA-4 мыши, и ген легкой цепи антитела hUL01-k0 (SEQ ID NO: 213), содержащая переменную область hUL01 легкой цепи (SEQ ID NO: 157), антитело экспрессируют, очищают и используют. Анализ проводят с использованием Вiascore T200 в тех же условиях, что и измерение связывания с CTLA-4 человека, за исключением использования CTLA-4 мыши в качестве образца (табл. 24). CTLA-4 мыши получают следующим образом.

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

Таблица 24. Анализ связывания измененных антител с CTLA-4 мыши

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

N.D. – нет данных; чрезвычайно слабые данные для обнаружения связывания

Значение «связывание с CTLA-4 мыши» в таблице означает количество связывания CTLA-4 мыши на единицу количества антитела, когда CTLA-4 мыши взаимодействует при концентрации 1000 нМ с каждой из концентраций АТФ, и «K<sub>D</sub> для CTLA-4 мыши (M)» означает константу диссоциации для CTLA-4 мыши при каждой концентрации АТФ. Установлено, что hUH02-G1d/hUL01-k0

связывается с CTLA-4 мыши в равной степени независимо от концентрации АТФ, тогда как 04Н1077-G1m-04L1086-lam1 и 04Н1208-G1m/04L1407-k0MT связываются с CTLA-4 мыши в зависимости от концентрации АТФ. По сравнению со связыванием с CTLA-4 человека, показанной в табл. 23, способность связывания 4Н1077-G1m-04L1086-lam1 с CTLA-4 мыши примерно в 5 раз слабее по сравнению со способностью связываться с CTLA-4 человека, а способность 04Н1208-G1m/ 04L1407-k0MT связываться с CTLA-4 мыши примерно в два раза слабее по сравнению со способностью связываться с CTLA-4 человека в присутствии 100 мкМ АТФ.

10 Контрольный пример 3-4. Создание контрольного анти-mCTLA-4 антитела и переключающих анти-mCTLA-4 антител

Создают контрольное анти-mCTLA-4 антитело (hUH02-mFa55/hUL01-mk1, аббревиатура: mNS-mFa55) и анти-CTLA-4 переключатели (04Н1077-mFa55/04L1086-m10r, аббревиатура: SW1077-mFa55; и 04Н1208-mFa55/04L1407s-mk1, аббревиатура: SW1208-mFa55). В антителе mNS-mFa55 используют переменную область тяжелой цепи hUH02 (SEQ ID NO: 16) и переменную область легкой цепи hUL01 (SEQ ID NO: 17), а в качестве константных областей используют константную область тяжелой цепи мыши mFa55 (SEQ ID NO: 18) и константную область mk1 легкой цепи мыши дикого типа (SEQ ID NO: 19). Также используют константную область тяжелой цепи мыши, в которой сделаны изменения аминокислотной последовательности для усиления связывания с рецептором Fcγ. Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

В антителе SW1077-mFa55 используют переменную область тяжелой цепи 04Н1077 (SEQ ID NO: 20) и переменную область легкой цепи 04L1086 (SEQ ID NO: 21), а в качестве константных областей используют константную область тяжелой цепи мыши mFa55 (SEQ ID NO: 18) и константную область легкой цепи мыши дикого типа m10r (SEQ ID NO: 22). Также используют константную область тяжелой цепи мыши, в которой сделаны изменения аминокислотной последовательности для усиления связывания с рецептором Fcγ. Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

В антителе SW1208-mFa55 используют переменную область тяжелой цепи 04Н1208 (SEQ ID NO: 23) и переменную область легкой цепи 04L1407s

(SEQ ID NO: 21), а в качестве константных областей используют константную область тяжелой цепи мыши mFa55 (SEQ ID NO: 18) и константную область легкой цепи мыши дикого типа mk1 (SEQ ID NO: 19). Также используют константную область тяжелой цепи мыши, в которой сделаны изменения аминокислотной последовательности для усиления связывания с рецептором Fcγ. Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

Контрольный пример 3-6. Оценка нейтрализующей активности переключающего антитела CTLA-4

10           Нейтрализующую активность переключающего анти-CTLA-4 антитела (SW1077-mFa55), полученного в примере 3-4, оценивают методом конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA). В mCTLA-4-Fc (SEQ ID NO: 25), в котором константная область человека связана с mCTLA-4, разбавляют до концентрации 5 мкг/мл (55 нМ) 0,1 М NaHCO<sub>3</sub>, 0,05% NaN<sub>3</sub> для  
15           приготовления раствора mCTLA-4-Fc. По 100 мкл каждого приготовленного раствора mCTLA-4-Fc добавляют в 96-луночный планшет, и планшет оставляют при 4°C в течение ночи для иммобилизации mCTLA-4-Fc на поверхности планшета. После 3-кратной промывки TBS, 0,1% Tween 20, в каждую лунку добавляют по 250 мкл раствора БСА, разбавленного до 2% TBS, для  
20           блокирования поверхности планшета. Затем планшет промывают 3 раза. mCD86-Fc-His (Sino Biologicals Inc. 50068-M03H, номер доступа NP\_062261.3), в котором константная область человека и His-метка слиты с мышинным CD86, разведенным TBS до конечной концентрации 55 нМ, раствор антитела SW1077-mFa55, разбавленный до конечной концентрации 6,25, 1,56, 0,390, 0,0977, 0,0061  
25           и 0 мкг/мл, и раствор АТФ, разведенный до конечной концентрации 0, 1, 10 и 100 мкМ, каждый смешивают таким образом, чтобы получить в сумме 100 мкл, смесь добавляют в каждую лунку и планшет оставляют при 37°C на 1 ч. Каждую лунку затем промывают 3 раза TBS, 0,1% Tween 20, приготовленным так, чтобы он содержал ту же концентрацию АТФ, что и раствор, добавленный в каждую  
30           лунку. Затем в каждую лунку добавляют 100 мкл анти-His-tag mAb-HRP-Direct (фирма MBL Life Sciences), разбавленного в 10000 раз блокирующим буфером таким образом, чтобы концентрация АТФ была такой же, как и в растворе, добавленном в каждую лунку, и планшет оставляют при 37°C на 1 ч. Каждую лунку затем промывают 3 раза TBS, 0,1% Tween 20, приготовленным так, чтобы

он содержал ту же концентрацию АТФ, что и раствор, добавленный в каждую лунку. В каждую лунку добавляют по 100 мкл раствора ТМБ и оставляют планшет при 37°C на 1 ч. В каждую лунку добавляют 50 мкл 1 М Н<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, чтобы остановить реакцию, и определяют оптическую плотность при 450 нм с помощью считывающего устройства для микропланшетов (фирма Wako Sunrise).

Величина поглощения в лунках без антител при равной концентрации АТФ принимают за степень связывания mCTLA-4-mCD86, равную 100%, и оценивают, насколько скорость связывания снижается при добавлении антител. Результаты представлены на фиг. 23.

Из полученных результатов следует, что нейтрализующая активность антитела SW1077 в отношении взаимодействия mCTLA-4-mCD86 становится сильнее по мере увеличения концентрации АТФ в анализе. Эти результаты подтвердили, что антитело SW1077 обладает АТФ-зависимой нейтрализующей активностью.

Контрольный пример 3-7. Эффективность переключающего анти-CTLA-4 антитела в мышинной модели с трансплантированными сингенными опухолевыми клетками, увеличение/уменьшение регуляторных Т-клеток (Treg) в опухоли и изменение маркера системного ответа в селезенке

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

Используемые клетки являются клетками линии рака молочной железы мыши FM3A, приобретенными в фирме RIKEN. Клетки FM3A поддерживают и пассируют в среде RPMI 1640 (фирма Sigma), содержащей 10% бычьей сыворотки (фирма Thermo Fisher Scientific). Используют мышей СЗН/HeN (7-недельный возраст, самки), приобретенных в фирме Charles River Laboratories, Япония. Клетки FM3A трансплантируют в живот мышам под кожу, и подтверждают, что модель приживается, когда объем трансплантированной опухоли достигает размера примерно от 150 мм<sup>3</sup> до примерно 300 мм<sup>3</sup>.

Объем трансплантированной опухоли рассчитывают по следующей формуле:

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

Контрольный пример 3-7-2. Приготовление лекарственных средств для введения



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

10 Контрольный пример 3-7-3. Введение лекарственных средств для измерения противоопухолевого эффекта

15 На 9-й день после трансплантации мышам вводят mNS-mFa55 в дозах 0,01 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,25 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг, 30 мг/кг и 100 мг/кг, а SW1208-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг, 100 мг/кг и 500 мг/кг, соответственно. Приготовленные растворы для введения вводят в дозе 20 мл/кг через хвостовую вену.

В табл. 25 подробно изложена обработка лекарственным средством при измерении противоопухолевого эффекта.

Таблица 25. Измерение противоопухолевого эффекта в модели трансплантированных клеток FM3A

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

Группа	Число животных	Лекарство	Доза	Введение	Дата введения
		mFa55			трансплантации
10	4	SW1208-mFa55	1 мг/кг	В хвостовую вену	9-й день после трансплантации
11	4	SW1208-mFa55	10 мг/кг	В хвостовую вену	9-й день после трансплантации
12	4	SW1208-mFa55	100 мг/кг	В хвостовую вену	9-й день после трансплантации
13	4	SW1208-mFa55	500 мг/кг	В хвостовую вену	9-й день после трансплантации

Контрольный пример 3-7-4. Оценка противоопухолевого эффекта

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

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

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

10

В результате эффективность препарата TGI = 60% и более на 13-й день после введения, что было установлено для mNS-mFa55 в дозах 0,1 мг/кг и более и для SW1208-mFa55 в дозах 1 мг/кг и более (фиг. 24 и 25).

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

На 7-й день после трансплантации через хвостовую вену вводят контрольное антитело против мышинового CTLA-4 (mNS-mFa55) в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг и 100 мг/кг, а переключающее анти-CTLA-4 антитело (SW1208-mFa55) вводят через хвостовую вену в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг, 100 мг/кг и 500 мг/кг. В табл. 26 показаны подробности медикаментозного лечения для оценки клеток Treg в опухоли и подтверждения системных эффектов в селезенке.

20

Таблица 26. Подтверждение внутриопухолевых и системных эффектов в модели трансплантированных клеток FM3A (mNS-mFa55 и SW1208-mFa55)

Группа	Число животных	Лекарство	Доза	Введение	Дата введения
1	3	His-буфер	-	В хвостовую вену	7-й день после трансплантации
2	3	mNS-mFa55	0,1 мг/кг	В хвостовую вену	7-й день после трансплантации
3	3	mNS-mFa55	1 мг/кг	В хвостовую вену	7-й день после трансплантации
4	3	mNS-mFa55	10 мг/кг	В хвостовую вену	7-й день после трансплантации
5	3	mNS-mFa55	100 мг/кг	В хвостовую вену	7-й день после трансплантации
6	3	SW1208-mFa55	0,1 мг/кг	В хвостовую вену	7-й день после трансплантации
7	3	SW1208-mFa55	1 мг/кг	В хвостовую вену	7-й день после трансплантации
8	3	SW1208-mFa55	10 мг/кг	В хвостовую вену	7-й день после трансплантации
9	3	SW1208-mFa55	100 мг/кг	В хвостовую вену	7-й день после трансплантации
10	3	SW1208-mFa55	500 мг/кг	В хвостовую вену	7-й день после трансплантации

Контрольный пример 3-7-6. Резекция опухоли и селезенки у модельных

5 мышей с трансплантированными клетками FM3A

На 6-й день после введения антител мышей подвергают эвтаназии под наркозом и проводят резекцию опухоли и селезенки. Из резецированной селезенки готовят клеточную суспензию с использованием среды RPMI-1640 (SIGMA), содержащей 10% FBS (фирма SIGMA), и затем подвергают гемолизу с использованием набора для лизирования эритроцитов мыши (фирма R&D) для получения клеток селезенки. Резецированные опухоли измельчают с помощью набора Tumor Dissociation Kt, mouse (фирма Miltenyi). Как клетки селезенки, так и раздробленные опухоли реагируют со следующими антителами, и фракции присутствующих иммунных клеток анализируют с помощью FACS-анализа:

15 анти-CD45 антитело (фирма BD, клон: 30-F11), анти-CD3 антитело (фирма BD, клон: 145-2C11), анти-CD4 антитело (фирма BD, клон: RM4-5), анти-FoxP3 антитело (фирма eBioscience, клон: FJK-16s)), анти-ICOS антитело (фирма eBioscience, клон: 7E17G9), анти-KLRG1 антитело (фирма Biolegend, клон:

2F1/KLRG1). Анализ FACS выполняют с помощью проточного цитофлуориметра BD LSR Fortessa X-20 (фирма BD).

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

5           Оценивают изменения эффекторных клеток Treg ( $CD4^+$  FoxP3 $^+$  KLRG1 $^+$ ) в опухоли после введения контрольного антитела против мышиного CTLA-4 (mNS-mFa55) или переключающего антитела против CTLA-4 (SW1208-mFa55). В результате как mNS-mFa55, так и SW1208-mFa55 снижают долю эффекторных клеток Treg до менее чем 0,2% CD45-положительных клеток в дозах 1 мг/кг и более (фиг. 26).

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

15           Изменения активированных хелперных Т-клеток ( $CD4^+$  Foxp3 $^-$  ICOS $^+$ ) в селезенке после введения mNS-mFa55 или SW1208-mFa55 оценивают с помощью анализа FACS. В результате соотношение активированных хелперных Т-клеток к CD45-положительным клеткам в селезенке значительно увеличивается при введении mNS-mFa55, но не было значительного увеличения соотношения активированных хелперных Т-клеток к CD45-положительным клеткам в селезенке даже при увеличении дозы введения SW1208-mFa55 (фиг. 17). Было подтверждено, что хотя антитело-переключатель показывает такую же эффективность, как и контрольное антитело, оно не вызывает ответа в тканях, отличных от опухоли, и концепция проявления активности только локально в опухоли доказана *in vivo* в опытах на мышах.

25           Контрольный пример 4. Получение измененных антител CTLA-4 и оценка их активности

          Проводят дальнейшее изменение и оценку анти-CTLA-4 переключающих антител, полученных в контрольном примере 3.

Контрольный пример 4-1. Усиление способности связывания с CTLA-4 путем изменения усиления связывания с АТФ

30           По результатам структурного анализа, выполненного в примере 2-1, показано, что CDR2 тяжелой цепи антитела взаимодействует с фосфатной группой АМФ. Полагают, что когда маленькой молекулой является АТФ,  $\gamma$ -фосфатная группа может вызывать стерические затруднения для CDR2 тяжелой цепи. Затем аминокислоты в этой области заменяют для изучения повышения

способности связывания с АТФ. В частности, 04Н1389-G1m/04L1086-lam1 и 04Н1382-G1m/04L1086-lam1 были получены путем введения изменений R53Q и G55H в переменные области тяжелой цепи 04Н1207-G1m/04L1086-lam1 и 04Н1208-G1m/04L1086-lam1, полученные в контрольном примере 3. Кроме того, 04Н1389-G1m/04L1305-k0MT получен путем замены легкой цепи 04Н1389-G1m/04L1086-lam1 последовательностью к-цепи человека. В табл. 27 перечислены SEQ ID NO переменных областей тяжелой цепи, переменных областей легкой цепи, константных областей тяжелой цепи, константных областей легкой цепи и гиперпеременных областей этих антител.

10 Таблица 27. Аминокислотные последовательности тяжелых цепей, легких цепей и их гиперпеременных областей (обозначены SEQ ID NO:)

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

Вiascore T200 используют для оценки связывания полученных вариантов с АТФ и с CTLA-4 человека. Анализ связывания с АТФ проводят при 37°C с использованием 20 мМ ACES (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween20 в качестве подвижного буфера. Во-первых, Sure Protein A (фирма GE Healthcare) иммобилизуют на сенсорном чипе CM3 серии S (фирма GE Healthcare), и антитела захватываются чипом путем взаимодействия с раствором антител, приготовленным в подвижном буфере. Далее способность связывания с антителом оценивают путем взаимодействия с раствором АТФ, приготовленным в подвижном буфере. Чипы регенерируют с помощью 25 мМ NaOH и 10 мМ глицин-HCl (pH 1,5) и проводят анализ путем повторного захвата антител. Для связывания количества каждого антитела с АТФ рассчитывают связываемое количество АТФ на единицу количества антитела путем корректировки количества связывания, когда АТФ вводят в концентрации 100 нМ с количеством антитела, захваченного на поверхности чипа. Связывание с CTLA-4

человека измеряют с использованием Biacore T200 по методу, описанному в контрольном примере 3-3. В табл. 28 показаны результаты этих измерений.

Таблица 28. Анализ связывания с АТФ и СТЛА-4 человека

Антитело	Связывание с АТФ	Связывание с СТЛА4 человека				K <sub>D</sub> СТЛА4 человека (M)		
		Без АТФ	АТФ = 1 мкМ	АТФ = 10 мкМ	АТФ = 100 мкМ	Без АТФ	АТФ = 10 мкМ	АТФ = 100 мкМ
04H1207-G1m/04L1086-lam1	0,00013	0,010	0,037	0,111	0,166	N.A.	4,0E-07	7,6E-08
04H1208-G1m/04L1086-lam1	0,00018	0,003	0,022	0,084	0,139	N.A.	5,1E-07	9,1E-08
04H1389-G1m/04L1086-lam1	0,00243	0,022	0,138	0,189	0,193	*5,1E-06	4,3E-08	2,1E-08
04H1382-G1m/04L1086-lam1	0,00204	0,008	0,090	0,152	0,159	N.A.	4,6E-08	1,4E-08
04H1389-G1m/04L1305-k0MT	0,00190	0,030	0,120	0,154	0,151	*3,2E-06	1,9E-08	5,4E-09

5 N.A. Результаты чрезвычайно низкие и не позволяют определить величину K<sub>D</sub>.

\*Константу диссоциации K<sub>D</sub> (M/л) рассчитывают по модели стационарного состояния.

Антитела 04H1389-G1m/04L1086-lam1 и 04H1382-G1m/04L1086-lam1  
 10 обладают повышенной связывающей способностью с АТФ по сравнению с исходными антителами 04H1207-G1m/04L1086-lam1 и 04H1208-G1m/04L1086-lam1, для которых не интродуцировали R53Q/G55H. Связывающая способность 04H1389-G1m/04L1086-lam1 и 04H1382-G1m/04L1086-lam1 с СТЛА-4 человека повышается примерно в 10 раз в присутствии 10 мкМ АТФ по сравнению с  
 15 исходными антителами 04H1207-G1m/04L1086-lam1 и 04H1208-G1m/04L1086-lam1, для которых R53Q/G55H не был интродуцирован. Сравнение связываемого количества показывает, что способность связываться с СТЛА-4 человека при более низких концентрациях АТФ повышалась. Также было показано, что 04H1389-G1m/04L1305-k0MT, в котором легкая цепь 04H1389-G1m/04L1086-lam1  
 20 заменена последовательностью к-цепи человека, обладает эквивалентной АТФ-связывающей способностью и АТФ-зависимой способностью связывать СТЛА-4 человека как и 04H1389-G1m/04L1086-lam1.

Контрольный пример 4-2. Получение контрольного антитела против CTLA-4 человека и анти-CTLA-4 переключающего антитела, а также оценка их связывающей способности

Были созданы контрольное антитело против CTLA-4 человека (MDX10D1H-mFa55/MDX10D1L-mk1, аббревиатура: hNS-mFa55) и антитело-переключатель против CTLA-4 (04H1389-mFa55/04L1305-mk1, аббревиатура: SW1389-mFa55). В антителе hNS-mFa55 используют переменную область тяжелой цепи MDX10D1H (SEQ ID NO: 26) и переменную область легкой цепи MDX10D1L (SEQ ID NO: 27), а в качестве константных областей используют константную область тяжелой цепи мыши mFa55 (SEQ ID NO: 18) и константную область mk1 легкой цепи мыши дикого типа (SEQ ID NO: 19). Также используют константную область тяжелой цепи мыши, к которой добавлены изменения для усиления связывания с рецептором Fcγ. Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

В антителе SW1389-mFa55 используют переменную область тяжелой цепи 04H1389 (SEQ ID NO: 29) и переменную область легкой цепи 04L1305 (SEQ ID NO: 30), а в качестве константных областей используют константную область тяжелой цепи мыши mFa55 (SEQ ID NO: 18) и константную область mk1 легкой цепи мыши дикого типа (SEQ ID NO: 19). Также используют константную область тяжелой цепи мыши, к которой добавлены изменения для усиления связывания с рецептором Fcγ. Антитело экспрессировали и очищали способом, известным специалистам в данной области.

Оценивали связывание разработанных hNS-mFa55 и SW1389-mFa55 с CTLA-4 человека. В качестве подвижного буфера используют 20 mM ACES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween 20 с добавлением АТФ до требуемых концентраций, анализ проводят при 37°C. Сначала кроличьи анти-мышинные IgG (фирма Thermo Fisher Scientific) иммобилизуют на сенсорных чипах серии S CM5 (фирма GE Healthcare), и антитело захватывается чипом путем взаимодействия с раствором антител, приготовленным в подвижном буфере, не содержащим АТФ. Затем связывающую способность антитела к CTLA-4 человека в присутствии или в отсутствие АТФ оценивают путем взаимодействия с раствором CTLA-4 человека, приготовленным в подвижном буфере с добавлением АТФ до нужной концентрации, или раствором CTLA-4 человека, приготовленным в подвижном буфере, не содержащим АТФ. Чипы

регенерируют с помощью 25 мМ NaOH и 10 мМ глицин-HCl (pH 1,5) и проводят анализ путем повторного захвата антител. Константу диссоциации каждого антитела к CTLA-4 рассчитывают с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software 2.0. В частности, константу скорости связывания  $k_a$  (л/моль/с) и константу скорости диссоциации  $k_d$  (1/сек) рассчитывают путем глобальной подгонки сенсорограмм, полученных при измерении с использованием модели связывания Ленгмюра 1:1, а константу диссоциации  $K_D$  (моль/л) рассчитывают по этим значениям. В табл. 29 показаны результаты этих анализов.

10 Таблица 29. Анализ связывания вариантов с константными областями мыши с CTLA-4 человека

Антитело	$K_D$ CTLA-4 человека (M)		
	АТФ = 1 мкМ	АТФ = 10 мкМ	АТФ = 100 мкМ
MDX10D1H-mFa55/MDX10D1L-mk1	3,2E-08	3,8E-08	3,6E-08
04H1389-mFa55/04L1305-mk1	5,1E-08	1,8E-08	8,9E-09

15 Было подтверждено, что оба антитела, полученные с использованием константных областей мыши, связываются с CTLA-4 человека. Также было показано, что SW1389-mFa55 связывается с CTLA-4 человека АТФ-зависимым образом, аналогично 04H1389-G1m/04L1305-k0MT, полученному с использованием той же вариабельной области и константной области человека, показанных в табл. 28.

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

25 Контрольный пример 4-3-1. Клеточная линия

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

30



глюкозы) (фирма SIGMA), содержащей 10% FBS (фирма SIGMA) и 600 мкг/мл GENETICIN (фирма Gibco).

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

5 Применяют CTLA-4 KI человека, CD3 человека EDG-замещенную мышь (hCTLA-4 KI hCD3 EDG-замещенная мышь), которая является гибридом мыши с нокаутом CTLA-4 человека (*Blood*, 2005, 106(9): 3127-3133), и мыши, полученной авторами настоящего изобретения, с заменой CD3 EDG человека (*Sci Rep*, 2017, 7: 45839). Клетки Нера1-6/hGPC3 трансплантируют подкожно  
10 мышам с заменой hCTLA-4 KI hCD3 EDG, и было определено, что модель приживается, когда средний объем трансплантированных опухолей достигает приблизительно от 200 мм<sup>3</sup> до приблизительно 400 мм<sup>3</sup>.

Объем трансплантированной опухоли рассчитывают по формуле:

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

15 Контрольный пример 4-3-3. Получение лекарственных средств для введения

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

25 Контрольный пример 4-3-4. Введение лекарственного средства для измерения противоопухолевого эффекта

На 7-й день после трансплантации мышам вводят SW1389-mFa55 в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг и 100 мг/кг, и hNS-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг /кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг через хвостовую вену. В табл. 20 показаны  
30 подробности лечения лекарственным средством при измерении противоопухолевого эффекта.

Таблица 30. Измерение противоопухолевого эффекта на модели трансплантации клеток Нера1-6/hGPC3

Группа	Число животных	Лекарство	Доза	Введение	Дата введения
--------	----------------	-----------	------	----------	---------------

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

#### Контрольный пример 4-3-5. Оценка противоопухолевого эффекта

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

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

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

В результате как hNS-mFa55, так и SW1389-mFa55 показали эффективность препарата TGI = 60% и более на 18-й день после введения в дозах 1 мг/кг или более (фиг. 28 и 29).

#### Контрольный пример 4-3-6. Введение лекарственного средства для оценки клеток Treg в опухоли и подтверждения системных эффектов в селезенке

На 7-й день после трансплантации SW1389-mFa55 вводят мышам в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг, 100 мг/кг и 500 мг/кг через хвостовую вену, а hNS-mFa55 вводят в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг через хвостовую

вену. В табл. 31 показаны подробности применения лекарственных средств для оценки клеток Treg в опухоли и подтверждения системных эффектов в селезенке.

5 Таблица 31. Проверка внутриопухолевых и системных эффектов на модели трансплантации клеток Hera1-6/hGPC3 (hNS-mFa55 и SW1389-mFa55)

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

Контрольный пример 4-3-7. Резекция опухоли и селезенки у модельных мышей с трансплантированными клетками Hera1-6/hGPC3

10 На 6-й день после введения антител мышей подвергают эвтаназии под наркозом, и проводят резекцию опухоли и селезенки. Из полученных селезенок готовят клеточную суспензию с использованием среды RPMI-1640 (фирма SIGMA), содержащей 10% FBS (фирма SIGMA), и затем подвергают гемолизу с использованием набора для лизирования эритроцитов мыши (фирма R&D) для получения клеток селезенки. Полученные опухоли измельчают с помощью набора Tumor Dissociation Kt, mouse (фирма Miltenyi). Как клетки селезенки, так и раздробленные опухоли реагируют со следующими антителами, и фракции присутствующих иммунных клеток анализируют с помощью FACS-анализа: анти-CD45 антитело (фирма BD, клон: 30-F11), анти-CD3 антитело (фирма BD, клон: UCHT1), анти-CD4 антитело (фирма BD, клон: RM4-5), анти-FoxP3

антитело (фирма eBioscience, клон: FJK-16s), анти-ICOS антитело (фирма eBioscience, клон: 7E17G9), анти-CCR7 антитело (фирма Biolegend, клон: 4B12). Анализ FACS выполняют с помощью проточного цитофлуориметра BD LSR Fortessa X-20 (фирма BD).

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

10 Оценивают изменения эффекторных клеток Treg ( $CD4^+$  FoxP3<sup>+</sup> CCR7<sup>low</sup> KLRG1<sup>+</sup>) в опухоли после введения SW1389-mFa55 или hNS-mFa55. В результате как hNS-mFa55, так и SW1389-mFa55 снижают долю эффекторных клеток Treg до менее чем 0,2% CD45-позитивных клеток в дозах 1 мг/кг и более (фиг. 30).

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

15 Изменения активированных хелперных Т-клеток ( $CD4^+$  Foxp3<sup>-</sup> ICOS<sup>+</sup>) в селезенке после введения hNS-mFa55 или SW1389-mFa55 оценивают методом FACS. В результате соотношение активированных хелперных Т-клеток к CD45-положительным клеткам в селезенке значительно увеличивается при введении hNS-mFa55, но не наблюдалось значительного увеличения активированных хелперных Т-клеток в селезенке при введении SW1389-mFa55, даже при  
20 увеличении дозы введения (фиг. 31). Это подтверждает, что переключающее антитело проявляет такую же эффективность, как и контрольное антитело, но не вызывает ответа в тканях, отличных от опухолевых. Таким образом, концепция проявления активности только локально в опухоли доказана *in vivo* на мышах с CTLA-4 KI человека.

25 Контрольный пример 5. Получение измененных антител CTLA-4 и оценка их активности

Осуществляют дальнейшее изменение и оценку переключающих антител против CTLA-4, полученных в контрольном примере 4.

30 Контрольный пример 5-1. Оптимизация антител путем внесения вставки новых аминокислот в последовательности и замены в рамках считывания.

Изменения аминокислотной последовательности целенаправленно введены в CDR 04H1389-G1m/04L1086-lam1, и изучены варианты с улучшенными профилями. Комплексное введение и оценку изменений последовательности аминокислот проводят с использованием метода, описанного в контрольном

5 примере 3-3. Созданы варианты, в которые введена комбинация обнаруженных в  
 настоящем изобретении изменений и заменены рамки считывания. В табл. 22  
 перечислены SEQ ID NO переменных областей тяжелой цепи, переменных  
 областей легкой цепи, константных областей тяжелой цепи, константных  
 областей легкой цепи и гиперпеременных областей этих антител. Легкие цепи  
 04L1594-lam1, 04L1581-lam1, 04L1610-lam1, 04L1612-lam1 и 04L1610-lam1 в  
 табл. 32 интродуцированы с изменениями в CDR и рамках считывания по  
 сравнению с легкой цепью исходного антитела 04L1086-lam1, и имеют рамки  
 считывания и константную область последовательностей эмбриональной линии  
 10  $\lambda$ -цепи человека. Кроме того, 04L1615-k0MT, 04L1616-k0MT и 04L1617-k0MT  
 имеют вставки аминокислот в CDR 04L1086-lam1, и изменения в рамках  
 считывания и константную область последовательностей эмбриональной линии  
 к-цепи человека. Переменная область тяжелой цепи 04H1389v373  
 интродуцирована с изменениями в CDR переменной области тяжелой цепи  
 15 04H1389 исходного антитела. Переменные области тяжелой цепи 04H1637,  
 04H1643, 04H1654, 04H1656, 04H1642 и 04H1735 имеют изменения,  
 интродуцированные в CDR 04H1389, а также замены в рамках считывания на  
 последовательности другой эмбриональной линии.

20 Таблица 32. Аминокислотные последовательности тяжелых цепей, легких  
 цепей и их гиперпеременных областей (обозначены SEQ ID NO:).

Антитело	Переменная область		Константная область		Гиперпеременная область (HVR)					
	Тяжелая цепь	Легкая цепь	Тяжелая цепь	Легкая цепь	H1	H2	H3	L1	L2	L3
04H1389v373-G1m/04L1086-lam1	137	97	82	87	107	111	102	122	117	133
04H1637-G1m/04L1086-lam1	138	97	82	87	107	111	102	122	117	133
04H1637-G1m/04L1594-lam1	138	144	82	87	107	111	102	124	125	133
04H1637-G1m/04L1581-lam1	138	145	82	87	107	111	102	126	127	133
04H1637-G1m/04L1610-lam1	138	146	82	87	107	111	102	128	117	133
04H1643-G1m/04L1610-lam1	139	146	82	87	107	111	102	128	117	133
04H1654-G1m/04L1610-lam1	140	146	82	87	107	112	102	128	117	133

Антитело	Вариабельная область		Константная область		Гипервариабельная область (HVR)					
	Тяжелая цепь	Легкая цепь	Тяжелая цепь	Легкая цепь	H1	H2	H3	L1	L2	L3
04H1656-G1m/04L1610-lam1	141	146	82	87	107	111	152	128	117	133
04H1654-G1m/04L1612-lam1	140	147	82	87	107	112	102	129	117	133
04H1656-G1m/04L1612-lam1	141	147	82	87	107	111	152	129	117	133
04H1654-G1m/04L1606-lam1	140	148	82	87	107	112	102	124	117	133
04H1656-G1m/04L1606-lam1	141	148	82	87	107	111	152	124	117	133
04H1389-G1m/04L1615-kOMT	136	149	82	96	107	110	102	130	117	133

Активность связывания созданных вариантов с CTLA-4 человека оценивают методом, описанным в контрольном примере 3-3 (табл. 33).

Таблица 33. Анализ связывания с CTLA-4 человека.

Антитело	K <sub>D</sub> для CTLA4 человека (M)		
	Без АТФ	АТФ 1 мкМ	АТФ 10 мкМ
MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-kOMT	4.8E-08	5.0E-08	4.9E-08
04H1389-G1m/04L1086-lam1	* 5.7E-06	1.8E-07	3.7E-08
04H1389v373-G1m/04L1086-lam1	* 5.3E-06	1.4E-07	2.8E-08
04H1637-G1m/04L1086-lam1	* 5.3E-06	1.6E-07	3.0E-08
04H1637-G1m/04L1594-lam1	* 4.3E-06	1.4E-07	2.8E-08
04H1637-G1m/04L1581-lam1	* 3.2E-06	8.9E-08	1.7E-08
04H1637-G1m/04L1610-lam1	* 3.3E-06	1.0E-07	1.8E-08
04H1654-G1m/04L1610-lam1	* 5.3E-06	1.2E-07	1.9E-08
04H1656-G1m/04L1610-lam1	* 2.2E-06	9.8E-08	1.9E-08
04H1654-G1m/04L1612-lam1	* 4.8E-06	2.0E-07	3.3E-08
04H1656-G1m/04L1612-lam1	* 7.6E-06	1.6E-07	3.2E-08
04H1654-G1m/04L1606-lam1	* 6.8E-06	1.4E-07	2.5E-08
04H1656-G1m/04L1606-lam1	* 2.3E-06	9.5E-08	1.9E-08
04H1389-G1m/04L1305-kOMT	* 2.4E-06	8.2E-08	1.5E-08
04H1389-G1m/04L1615-kOMT	* 2.0E-06	7.2E-08	1.5E-08

\* Величину  $K_D$  определяют по стационарной модели

Значения  $K_D$  в таблице, отмеченные «\*», рассчитаны с использованием стационарной модели. Показано, что все варианты, полученные с использованием 04H1389-G1m/04L1086-lam1 в качестве исходного антитела, связываются с CTLA-4 человека АТФ-зависимым образом и обладают более сильной связывающей способностью, чем исходное антитело с  $K_D 3,7 \times 10^{-8}$  М в условиях, когда АТФ присутствует в количестве 10 мкМ. Показано, что все эти антитела обладают более сильной связывающей способностью, чем существующее антитело против CTLA-4 человека MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT в условиях, когда АТФ присутствует в количестве 10 мкМ.

Способность связывать полученных вариантов с CTLA-4 человека в присутствии АДФ или АМФ оценивают с помощью Viacore T200 и сравнивают со способностью связываться в присутствии АТФ. Способность к связыванию с CTLA-4 человека в присутствии АДФ или АМФ измеряют с использованием метода, описанного в контрольном примере 3-3, как и при оценке связывающей способности в присутствии АТФ, но с использованием АДФ или АМФ вместо АТФ (табл. 34).

Таблица 34. Оценка зависимости от АТФ, АДФ и АМФ.

Антитело	Кинетические параметры для СТЛА4 человека											
	АТФ 10 мкМ				АДФ 10 мкМ				АМФ 10 мкМ			
	$K_a(M^{-1}сек^{-1})$	$k_d(сек^{-1})$	$K_D(M)$		$K_a(M^{-1}сек^{-1})$	$k_d(сек^{-1})$	$K_D(M)$		$K_a(M^{-1}сек^{-1})$	$k_d(сек^{-1})$	$K_D(M)$	
MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT	2.9E+05	1.3E-02	4.6E-08		3.6E+05	1.3E-02	3.6E-08		3.4E+05	1.3E-02	3.9E-08	
04H1389-G1m/04L1086-lam1	1.0E+05	3.2E-03	3.2E-08		1.4E+05	6.1E-03	4.4E-08		1.4E+05	1.8E-02	1.3E-07	
04H1637-G1m/04L1610-lam1	1.2E+05	1.9E-03	1.5E-08		1.6E+05	3.5E-03	2.2E-08		1.5E+05	1.0E-02	7.0E-08	
04H1654-G1m/04L1610-lam1	7.1E+04	1.4E-03	1.9E-08		8.8E+04	2.8E-03	3.2E-08		8.9E+04	8.9E-03	1.0E-07	
04H1656-G1m/04L1610-lam1	1.3E+05	1.9E-03	1.5E-08		1.7E+05	4.3E-03	2.5E-08		1.7E+05	1.4E-02	8.2E-08	
04H1654-G1m/04L1612-lam1	7.4E+04	2.7E-03	3.6E-08		8.9E+04	5.0E-03	5.6E-08		9.4E+04	1.6E-02	1.7E-07	
04H1656-G1m/04L1612-lam1	1.1E+05	2.9E-03	2.6E-08		1.5E+05	6.4E-03	4.2E-08		1.5E+05	2.0E-02	1.3E-07	
04H1654-G1m/04L1606-lam1	6.5E+04	1.3E-03	2.1E-08		8.0E+04	2.8E-03	3.5E-08		8.1E+04	9.0E-03	1.1E-07	
04H1656-G1m/04L1606-lam1	1.2E+05	2.2E-03	1.9E-08		1.6E+05	4.8E-03	3.0E-08		1.6E+05	1.6E-02	1.0E-07	
04H1389-G1m/04L1305-k0MT	1.1E+05	1.9E-03	1.7E-08		1.6E+05	3.8E-03	2.5E-08		1.5E+05	1.2E-02	7.9E-08	
04H1389-G1m/04L1615-k0MT	1.3E+05	1.5E-03	1.1E-08		1.8E+05	3.0E-03	1.7E-08		1.7E+05	9.7E-03	5.5E-08	

Существующее антитело к СТЛА-4 человека MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT показывает сходные кинетические параметры независимо от типа и



присутствия малых молекул, тогда как все АТФ-зависимые антитела к СТЛА-4 связываются с СТЛА-4 человека не только в присутствии АТФ, но и в присутствии АДФ или АМФ, и связывающая способность в присутствии этих малых молекул была выше, чем связывающая способность в отсутствие малых молекул, показанная в табл. 33. Таким образом, было показано, что эти антитела представляют собой антитела, которые связываются с СТЛА-4 АТФ-, АДФ- и АМФ-зависимым образом. Эти антитела имеют самую высокую связывающую способность в присутствии АТФ, за которой следует самая высокая связывающая способность в присутствии АДФ и самая низкая связывающая способность в присутствии АМФ. Во всех случаях связывающая способность в присутствии АДФ была примерно в 3 раза сильнее, чем связывающая способность в присутствии АМФ, а связывающая способность в присутствии АТФ была примерно в 5 раз сильнее, чем связывающая способность в присутствии АМФ. Величина  $K_D$  одинакова в присутствии любой из малых молекул, но есть разница в величине  $k_d$ . Поскольку диссоциация в присутствии АДФ происходит быстрее, чем в присутствии АТФ, а дальнейшая диссоциация в присутствии АМФ происходит быстрее, чем в присутствии АДФ, показано, что разница в величине  $K_D$  в зависимости от типа малой молекулы связана с разницей в степени диссоциации.

Затем оценивают связывающую способность некоторых вариантов с СТЛА-4 мыши и СТЛА-4 яванского макака. Активность связывания с СТЛА-4 человека, СТЛА-4 мыши и СТЛА-4 яванского макака оценивают с использованием Вiasore T200 по методу, описанному в контрольном примере 3-3 (табл. 35). СТЛА-4 яванского макака получали следующим способом.

Ген СуСТЛА-4-His-ВАР (SEQ ID NO: 50), представляющий собой слияние His-метки и ВАР-метки на С-конце внеклеточной области СТЛА-4 яванского макака, был синтезирован и инсертирован в плазмиду экспрессии животных. Полученную плазмиду вводят методом липофекции в линию клеток FreeStyle 293-F, полученную из клеток эмбриональной почки человека (фирма Invitrogen), эти клетки высевают в колбу после суспендирования в среду для экспрессии FreeStyle 293 (фирма Invitrogen) при плотности клеток  $1,33 \times 10^6$  клеток/мл. Через три часа после трансфекции плазмиды добавляют биотин до конечной концентрации 100 мкМ, клетки культивируют в  $CO_2$ -инкубаторе (37°C, 8%  $CO_2$ , 125 об/мин) в течение 4 сут и антиген очищают методом, известным

специалистам в данной области, из культурального супернатанта каждого образца. Поглощение растворов очищенного антигена при 280 нм измеряют с помощью спектрофотометра. Из полученных измеренных значений рассчитывают концентрацию очищенного антигена с использованием коэффициента экстинкции, рассчитанного методом PACE (*Protein Science*, 1995, 4, 2411-2423).

Таблица 35. Анализ связывания с CTLA-4 человека, мыши, яванского макака.

Антитело	K <sub>D</sub> для CTLA4 человека (M)			K <sub>D</sub> для CTLA4 мыши (M)			K <sub>D</sub> для CTLA4 обезьяны (M)		
	АТФ 1 мкМ	АТФ 10 мкМ	АТФ 100 мкМ	АТФ 1 мкМ	АТФ 10 мкМ	АТФ 100 мкМ	АТФ 1 мкМ	АТФ 10 мкМ	АТФ 100 мкМ
MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-kOMT	4.7E-08	5.3E-08	5.4E-08	N.T.	N.T.	N.T.	1.6E-07	1.2E-07	1.2E-07
04H1389-G1m/04L1305-kOMT	7.2E-08	1.4E-08	4.6E-09	2.1E-07	3.2E-08	1.2E-08	1.4E-07	2.6E-08	1.2E-08
04H1654-G1m/04L1610-lam1	1.1E-07	1.5E-08	4.4E-09	1.8E-07	2.7E-08	1.0E-08	1.8E-07	2.8E-08	8.1E-09
04H1656-G1m/04L1610-lam1	7.9E-08	1.6E-08	6.2E-09	2.3E-07	3.7E-08	1.4E-08	1.2E-07	2.6E-08	1.0E-08
04H1654-G1m/04L1612-lam1	1.7E-07	3.0E-08	1.1E-08	3.9E-07	4.8E-08	1.8E-08	3.1E-07	5.4E-08	2.1E-08
04H1656-G1m/04L1612-lam1	9.5E-08	2.5E-08	7.8E-09	3.2E-07	5.4E-08	2.1E-08	1.6E-07	4.1E-08	1.6E-08
04H1389-G1m/04L1615-kOMT	5.8E-08	1.2E-08	5.0E-09	1.6E-07	2.6E-08	1.0E-08	1.1E-07	2.1E-08	9.3E-09

N.T. – Не исследовали

Установлено, что все шесть изученных зависимых от малых молекул антител CTLA-4 связываются не только с CTLA-4 человека, но также с CTLA-4 мыши и с CTLA-4 яванского макака АТФ-зависимым образом.

Контрольный пример 5-2. Получение измененных анти-CTLA-4

5 переключающих антител и антител отрицательного контроля

10 Получают измененные анти-CTLA-4 переключающие антитела (04Н1654-  
mFa55m2P1/04L1610-ml0r//04Н1656-mFa55m2N1/04L1610-ml0r, аббревиатура:  
SW1610-mFa55; 04Н1654-mFa55m2P1/04L1612-ml0r//04Н1656-  
mFa55m2N1/04L1612-ml0r, аббревиатура: SW1612-mFa55; and 04Н1389-  
mFa55/04L1615-mk1, аббревиатура: SW1615-mFa55) и антитело отрицательного  
контроля (IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1, аббревиатура: KLH-mFa55).

15 В антителе SW1615-mFa55 используют переменную область тяжелой  
цепи 04Н1389 (SEQ ID NO: 29) и переменную область легкой цепи 04L1615  
(SEQ ID NO: 34), а в качестве константных областей используют константную  
область тяжелой цепи mFa55 мыши (SEQ ID NO: 18) и константную область mk1  
20 легкой цепи мыши дикого типа (SEQ ID NO: 19). Также используют  
константную область тяжелой цепи мыши, к которой были добавлены изменения  
для усиления связывания с рецептором Fcγ. Антитело экспрессируют и очищают  
способом, известным специалистам в данной области.

20 В антителе SW1610-mFa55 в качестве константных областей одна  
переменная область тяжелой цепи 04Н1654 (SEQ ID NO: 35) связана с  
константной областью тяжелой цепи мыши mFa55m2P1 (SEQ ID NO: 36), другая  
переменную область тяжелой цепи 04Н1656 (SEQ ID NO: 37) связана с  
константной областью тяжелой цепи мыши mFa55m2N1 (SEQ ID NO: 38), а для  
25 переменной области легкой цепи 04L1610 (SEQ ID NO: 39) – с константной  
областью легкой цепи мыши дикого типа ml0r (SEQ ID NO: 22). Антитело  
экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

30 В антителе SW1612-mFa55 в качестве константных областей одна  
переменная область тяжелой цепи 04Н1654 (SEQ ID NO: 35) связана с  
константной областью тяжелой цепи мыши mFa55m2P1 (SEQ ID NO: 36), другая  
переменная область тяжелой цепи 04Н1656 (SEQ ID NO: 37) связана с  
константной областью тяжелой цепи мыши mFa55m2N1 (SEQ ID NO: 38), а для  
переменной области легкой цепи 04L1612 (SEQ ID NO: 40) – с константной  
областью легкой цепи мыши дикого типа mFa55m2N1 (SEQ ID NO: 22).

Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

В антителе отрицательного контроля в качестве константных областей переменная область тяжелой цепи IC17Hdk (SEQ ID NO: 51) связана с константной областью тяжелой цепи mFa55 (SEQ ID NO: 18), а для переменной области легкой цепи IC17L (SEQ ID NO: 52) используют константную область mk1 легкой цепи мыши дикого типа (SEQ ID NO: 19). Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

10 Контрольный пример 5-3. Оценка связывающей способности антител, имеющих константную область мыши, с CTLA-4 человека

Способность анти-CTLA-4-антител, имеющих константную область мыши, связываться с антигеном оценивают методом, описанным в контрольном примере 4-2 (табл. 36). Установлено, что все эти антитела, имеющие константную область мыши, обладают такой же АТФ-зависимой способностью связываться с CTLA-4 человека, что и антитела, показанные в табл. 35, имеющие такую же переменную область, но с константной областью человека.

Таблица 36. Анализ связывания вариантов с константными областями мыши с CTLA-4 человека

Антитело	K <sub>D</sub> для CTLA4 человека (M)		
	АТФ 1 мкМ	АТФ 10 мкМ	АТФ 100 мкМ
MDX10D1H-mFa55/MDX10D1L-mk1	3.2E-08	3.8E-08	3.6E-08
04H1654-mFa55m2P1/04L1610-mI0r	5.8E-08	1.7E-08	8.5E-09
04H1656-mFa55m2N1/04L1610-mI0r	4.7E-08	1.3E-08	7.4E-09
04H1654-mFa55m2P1/04L1612-mI0r	9.4E-08	2.9E-08	1.2E-08
04H1656-mFa55m2N1/04L1612-mI0r	6.7E-08	2.0E-08	1.0E-08
04H1389-mFa55/04L1615-mk1	4.5E-08	1.5E-08	8.7E-09

20 Контрольный пример 5-4. Эффективность переключающих анти-CTLA-4 антител в модели трансплантированных сингенных опухолевых клеток с использованием нокина CTLA-4 человека, трансгенной мыши с CD3 человека, с увеличением/уменьшением клеток Treg в опухоли и изменением маркера системного ответа в селезенке нокина CTLA-4 человека, трансгенной мыши с CD3

человека, с увеличением/уменьшением клеток Treg в опухоли и изменением маркера системного ответа в селезенке

Контрольный пример 5-4-1. Клеточная линия

Используют клетки Нера1-6/hGPC3. Эта клеток линии рака печени мыши  
 5 Нера1-6 приобретена в коллекции ATCC, она обладает конститутивной экспрессией гена Glypican 3 человека (hGPC3) в результате трансфекции и клонирования. Клетки Нера1-6/hGPC3 поддерживают и пассируют в среде D-MEM (с высоким содержанием глюкозы) (фирма SIGMA), содержащей 10% FBS (фирма Sigma) и 0,6 мг/мл G418 (фирма Nacalai Tesque).

10 Контрольный пример 5-4-2. Получение модели мыши с трансплантированной сингенной опухолью

Используют мышей с заменой CTLA-4 KI человека, CD3 EDG человека (мышь с заменой hCTLA-4 KI hCD3 EDG), которые представляют собой гибрид  
 15 мышь с нокаутом CTLA-4 человека (*Blood*, 2005, 106 (9):3127-3133) и мышь, полученной авторами настоящего изобретения, с заменой на CD3 EDG человека (*Sci Rep*, 2017, 7: 45839). Клетки Нера1-6/hGPC3 трансплантируют подкожно мышам с заменой hCTLA-4 KI hCD3 EDG, и определяют, что модель приживается, когда средний объем трансплантированных опухолей достигает  
 20 приблизительно от 200 мм<sup>3</sup> до приблизительно 400 мм<sup>3</sup>.

Объем трансплантированной опухоли рассчитывают по следующей формуле:

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

25 Контрольный пример 5-4-3. Получение лекарственного средства для введения

Лекарственные средства, которые вводят модели с трансплантированными клетками Нера1-6/hGPC3, представляют переключающие анти-CTLA-4 антитела (SW1610-mFa55, SW1612-mFa55, SW1615-mFa55), полученные в контрольном  
 30 примере 5-2. Лекарственные средства для введения готовят с использованием His-буфера (20 mM His-HCl, 150 mM NaCl, pH 6,0) таким образом, чтобы они были в концентрации 0,03 мг/мл, 0,1 мг/мл и 0,3 мг/мл.

Контрольный пример 5-4-4. Введение лекарственного средства для измерения противоопухолевого эффекта

На 8-й день после трансплантации мышам через хвостовую вену вводят три образца переключающих анти-CTLA-4 антител в дозах 0,3 мг/кг, 1 мг/кг и 3 мг/кг, соответственно. В табл. 37 показаны подробности лечения лекарственным средством при измерении противоопухолевого эффекта.

Таблица 37. Измерение противоопухолевого эффекта в модели с трансплантированными клетками Нера1-6/hGPC3 (анти-CTLA-4 переключающие антитела)

Группа	Животных	Лекарство	Доза	Введение	Дата введения
1	5	His-буфер	-	В хвостовую вену	8-й день после трансплантации
2	5	SW1610-mFa55	0,3 мг/кг	В хвостовую вену	8-й день после трансплантации
3	5	SW1610-mFa55	1 мг/кг	В хвостовую вену	8-й день после трансплантации
4	5	SW1610-mFa55	3 мг/кг	В хвостовую вену	8-й день после трансплантации
5	5	SW1612-mFa55	0,3 мг/кг	В хвостовую вену	8-й день после трансплантации
6	5	SW1612-mFa55	1 мг/кг	В хвостовую вену	8-й день после трансплантации
7	5	SW1612-mFa55	3 мг/кг	В хвостовую вену	8-й день после трансплантации
8	5	SW1615-mFa55	0,3 мг/кг	В хвостовую вену	8-й день после трансплантации
9	5	SW1615-mFa55	1 мг/кг	В хвостовую вену	8-й день после трансплантации
10	5	SW1615-mFa55	3 мг/кг	В хвостовую вену	8-й день после трансплантации

10

Контрольный пример 5-4-5. Оценка противоопухолевого эффекта

Противоопухолевый эффект оценивают по объему опухоли, рассчитанному по формуле, описанной в контрольном примере 5-4-2.

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

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

момент измерения – средний объем опухоли в контрольной группе на момент первоначального введения))

× 100

В результате эффективность лекарственного средства SW1610-mFa55 и SW1612-mFa55 по критерию TGI составляет 60% и более на 16-й день после введения в дозах 1 мг/кг или более, а SW1615-mFa55 в дозах 3 мг/кг или более (фиг. 32-34).

Контрольный пример 5-4-6. Введение лекарственного средства для оценки клеток Treg в опухоли и подтверждения системного эффекта в селезенке

На 10-й день после трансплантации мышам вводят через хвостовую вену SW1610-mFa55 в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг, SW1612-mFa55 вводят в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг, и SW1615-mFa55 вводят в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг и 400 мг/кг. Кроме того, в контрольной группе через хвостовую вену вводят антитело отрицательного контроля IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1 (сокращенное обозначение: KLH-mFa55) в дозе 400 мг/кг. В табл. 38 показаны подробности медикаментозного лечения для оценки клеток Treg в опухоли и подтверждения системных эффектов в селезенке.

Таблица 38. Оценка внутриопухолевых и системных эффектов у модельных мышей с трансплантированными клетками Heral-6/hGPC3 (переключающие анти-CTLA-4 антитела)

Группа	Животных	Лекарство	Доза	Введение	Дата введения
1	3	KLH-mFa55	400 мг/кг	В хвостовую вену	10-й день после трансплантации
2	3	SW1610-mFa55	50 мг/кг	В хвостовую вену	10-й день после трансплантации
3	3	SW1610-mFa55	100 мг/кг	В хвостовую вену	10-й день после трансплантации
4	3	SW1610-mFa55	200 мг/кг	В хвостовую вену	10-й день после трансплантации
5	3	SW1612-mFa55	50 мг/кг	В хвостовую вену	10-й день после трансплантации
6	3	SW1612-mFa55	100 мг/кг	В хвостовую вену	10-й день после трансплантации
7	3	SW1612-mFa55	200 мг/кг	В хвостовую вену	10-й день после трансплантации
8	3	SW1615-mFa55	50 мг/кг	В хвостовую вену	10-й день после трансплантации
9	3	SW1615-mFa55	100 мг/кг	В хвостовую вену	10-й день после трансплантации
10	3	SW1615-	200	В хвостовую	10-й день после



		mFa55	мг/кг	вену	трансплантации
11	3	SW1615- mFa55	400 мг/кг	В хвостовую вену	10-й день после трансплантации

Контрольный пример 5-4-7. Резекция опухолей и селезенки у модельных мышей с трансплантированными клетками Hера1-6/hGPC3

5 На 6-й день после введения антител мышей подвергают эвтаназии под наркозом и отделяли опухоли и селезенки. Из полученных селезенки готовят клеточную суспензию с использованием среды RPMI-1640 (SIGMA), содержащей 10% FBS (фирма SIGMA), и затем подвергают гемолизу с использованием набора для лизирования эритроцитов мыши (фирма R&D) для получения клеток селезенки. Полученные опухоли измельчают с использованием набора для диссоциации опухолей мышей (фирма Miltenyi). Как клетки селезенки, так и раздробленные опухоли реагируют с приведенными ниже антителами и фракции присутствующих иммунных клеток анализируют с помощью метода FACS: антитело к CD45 (фирма BD, клон: 30-F11), антитело к CD3 (фирма BD, клон: UCHT1), анти-CD4 антитело (фирма BD, клон: RM4-5), 10 анти-FoxP3 антитело (фирма eBioscience, клон: FJK-16s), антитело к ICOS (фирма eBioscience, клон: 7E17G9), антитело к CCR7 (фирма Biolegend, клон : 4B12), антитело против KLRG1 (фирма Biolegend, клон: 2F1/KLRG1). Анализ FACS выполняют с помощью BD LSR Fortessa X-20 (BD).

20 Контрольный пример 5-4-8. Оценка Treg в опухоли в модели с трансплантированными клетками Hера1-6/hGPC3

Оценивают изменения эффекторных клеток Treg ( $CD4^+ FoxP3^+ CCR7^{low} KLRG1^+$ ) в опухолях после введения анти-CTLA-4 переключающих антител. В результате SW1610-mFa55, SW1612-mFa55 и SW1615-mFa55 снижают долю эффекторных клеток Treg до уровня менее 0,2% CD45-положительных клеток во всех вводимых дозах (фиг. 25).

Контрольный пример 5-4-9. Оценка системного эффекта в селезенке в модели с трансплантированными клетками Hера1-6/hGPC3

30 Изменения активированных хелперных Т-клеток ( $CD4^+ Foxp3^- ICOS^+$ ) в селезенке после введения анти-CTLA-4-переключающих антител оценивают с помощью метода FACS. В результате соотношение активированных хелперных Т-клеток к CD45-положительным клеткам в селезенке существенно не увеличивается при концентрации оцениваемых доз 50 мг/кг для SW1610-mFa55 и

SW1612-mFa55 и при 200 мг/кг или менее оцениваемых доз для SW1615-mFa55. Тест Даннета осуществляют в группе, получавшей KLH-mFa55, с использованием JMP 11.2.1 (фирма SAS Institute Inc.) для определения теста значимости (фиг. 26). Подтверждено, что хотя все переключающие антитела проявляют эффективность, они не вызывают ответа в тканях, отличных от опухоли, и что они обладают способностью проявлять активность только локально в опухоли.

Контрольный пример 6. Создание варианта Fc, способного усиливать активность ADCC/ADCP

10 Для получения антител с усиленной активностью ADCC и ADCP, которые являются цитотоксическими эффекторными функциями, исследуют получение вариантов Fc-области с повышенной способностью связываться с активирующими FcγR-рецепторами FcγRIIIa и FcγRIIa.

15 Контрольный пример 6-1. Получение и оценка вариантов с повышенным связыванием с FcγR

Получают гетеродимеризованное антитело 04H1637-Kn125/04L1610-lam1//04H1637-H1076/04L1610-lam1, имеющее константные области тяжелой цепи Kn125 и H1076 с повышенной способностью связывания с FcγR, описанное в WO 2013/002362, и имеющее 04H1637 в качестве переменной области тяжелой цепи и 04L1610-lam1 в качестве легкой цепи. В частности, создан ген тяжелой цепи антитела 04H1637-Kn125 (SEQ ID NO: 162), который содержит 04H1637 (SEQ ID NO: 138) в качестве одной переменной области тяжелой цепи и имеет L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A, интродуцированный в G1d (SEQ ID NO: 158) с удаленными Gly и Lys на C-конце константной области тяжелой цепи IgG1 человека, а также имеет изменения Y349C/T366W в области CH3, которые способствуют гетеродимеризации. Аналогичным образом создан ген тяжелой цепи антитела 04H1637-H1076 (SEQ ID NO: 163), который содержит 04H1637 (SEQ ID NO: 138) в качестве другой переменной области тяжелой цепи и имеет D270E/K326D/A330M/K334E, интродуцированный в константную область G1d тяжелой цепи IgG1 человека (SEQ ID NO: 158), а также имеет изменения D356C/T366S/L368A/Y407V в области CH3, которые способствуют гетеродимеризации. Используя 04L1610-lam1 (SEQ ID NO: 161) в качестве легкой цепи антитела, получают гетеродимер 04H1637-Kn125/04L1610-lam1//04H1637-H1076/04L1610-lam1 способом, известным специалистам в

данной области. Гены тяжелых цепей антител 04Н1637-Кп462 (SEQ ID NO: 164), 04Н1637-Н1441 (SEQ ID NO: 165), 04Н1637-Н1445 (SEQ ID NO: 166), 04Н1637-Кп461 (SEQ ID NO: 167) и 04Н1637-Н1443 (SEQ ID NO: 168), которые, в дополнение к L235Q, G236W, S239M, H268D, D270E, S298A, K326D и K334E, имеют изменения, внесенные в CH2-область L234F и A330K, описанные в WO 2013/002362 как изменения, которые меняют связывание с FcγR; G236A, I332E и I332D, о которых сообщается в *Mol. Cancer Ther.*, 2008, 7, 2517-2527 и WO 2004/029207; а также T250V и T307P, указанные в WO 2013/118858, как изменения для улучшения стабильности, в комбинации. Кроме того, получен ген тяжелой цепи антитела 04Н1654-КТ462 (SEQ ID NO: 182), в котором удалены Gly и Lys на С-конце IgG1 человека (IGHG1\*03), и он имеет те же изменения, что и Кп462 в области CH2, изменение E356K, которое способствует гетеродимеризации, как описано в WO 2006/106905 в области CH3, а также содержит 04Н1654 (SEQ ID NO: 140) в качестве варибельной области тяжелой цепи. Сходным образом создан ген тяжелой цепи антитела 04Н1656-НТ441 (SEQ ID NO: 170), в котором удалены Gly и Lys на С-конце IgG1 человека (IGHG1\*03), и он имеет те же изменения, что и Н1441 в области CH2, изменение K439E, которое способствует гетеродимеризации, как описано в WO 2006/106905 в области CH3, а также содержит 04Н1656 (SEQ ID NO: 141) в качестве варибельной области тяжелой цепи. Аналогичным образом созданы гены 04Н1656-НТ445 (SEQ ID NO: 171), 04Н1654-КТ461 (SEQ ID NO: 183) и 04Н1656-НТ443 (SEQ ID NO: 173). Кроме того, исследовали комбинацию изменений для улучшения в крови кинетики антител, описанных в *Mabs*, 2017, 9, 844-853. В частности, создан ген 04Н1654-КТ473 (SEQ ID NO: 184), в котором N434A/Y436T/Q438R/S440E введен в область CH3 04Н1654-КТ462 (SEQ ID NO: 182), что представляет собой комбинацию изменений, которые усиливают связывание с FcRn человека в кислых условиях, и изменения, снижающие связывание с ревматоидным фактором. Аналогичным образом создан ген для 04Н1656-НТ482 (SEQ ID NO: 185), который имеет N434A/Y436T/Q438R/S440E, интродуцированный в 04Н1656-НТ445 (SEQ ID NO: 171). Аналогично, тяжелая цепь антитела 04Н1654-КТ481 (SEQ ID NO: 186) и тяжелая цепь антитела 04Н1656-НТ498 (SEQ ID NO: 187) получены путем введения таких же изменений в 04Н1654-КТ461 и 04Н1656-НТ443, соответственно. Путем объединения этих тяжелых цепей и использования 04L1610-lam1 или 04L1612-lam1 (SEQ ID NO:

188) в качестве легкой цепи получены желаемые гетеродимеризованные антитела.

Внеклеточные домены FcγR получают следующим способом. Во-первых, гены внеклеточных доменов FcγR синтезированы способом, известным 5 специалистам в данной области. Также последовательности каждого FcγR получают на основе информации, зарегистрированной в NCBI. В частности, FcγRI получен на основе последовательности NCBI с номером доступа NM\_000566.3, FcγRIIa получен на основе последовательности NCBI с номером доступа NM\_001136219.1, FcγRIIb получен на основе последовательности NCBI 10 с номером доступа NM\_004001.3, FcγRIIIa получен на основе последовательности NCBI с номером доступа NM\_004001.3. получен на основе последовательности с номером доступа NCBI NM\_001127593.1, и к С-концу добавлена His-метка. Полиморфный сайт FcγRIIa получен со ссылкой на *J. Exp. Med.*, 1990, 172, 19-25, а полиморфный сайт FcγRIIIa подготовлен со ссылкой на 15 *J. Clin. Invest.*, 1997, 100, 1059-1070. Векторы экспрессии получают путем инсерции полученных фрагментов генов в векторы экспрессии в клетках животных. Полученные векторы экспрессии временно вводят в клетки FreeStyle293, производные от клеток эмбрионального рака почки человека (фирма Invitrogen), для экспрессии белков, представляющих интерес. После 20 получения культуральных супернатантов их пропускают через фильтр с порами 0,22 мкм и очищают, в принципе, на протяжении следующих четырех этапов. Первым этапом является катионообменная колоночная хроматография (SP Sepharose FF), вторым этапом является аффинная колоночная хроматография для His-tag (HisTrap HP), третьим этапом является колоночная хроматография с гель- 25 фильтрацией (Superdex200), а четвертым этапом является асептическая фильтрация. Однако для FcγRI на первой стадии выполняли колоночную хроматографию на анионообменной колонке с использованием Q-сефарозы FF. Концентрацию очищенного белка рассчитывают путем измерения поглощения при 280 нм с использованием спектрофотометра и с использованием 30 коэффициента экстинкции, рассчитанного из полученного значения с помощью такого метода, как PACE (*Protein Science*, 1995, 4, 2411-2423). FcRn человека получают способом, описанным в WO 2010/107110.

Взаимодействие между полученными антителами и FcγR человека анализируют методом с использованием Biacore T200. В качестве подвижного

буфера используют 50 мМ Na-фосфата, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween20 (pH 7,4), анализ проводят при 25°C. В качестве сенсорных чипов используют чипы Series S SA (фирма GE Healthcare), на которых иммобилизован биотиновый конъюгат CaptureSelect Human Fab-lambda Kinetics (фирма Thermo Fisher Scientific).

5 Исследуемые антитела захватываются этими чипами, и каждому FcγR, разведенному в рабочем буфере, созданы условия для взаимодействия с ними. Чипы регенерируют с помощью 10 мМ глицин-HCl (pH 1,5) и 25 мМ NaOH, и анализ проводят путем повторного захвата антител. Константы диссоциации  $K_D$  (моль/л) для FcγR и каждого антитела рассчитывают с использованием

10 программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software 2.0, используя модель связывания Ленгмюра 1:1 для FcγRIa и FcγRIIIa и модель аффинности стационарного состояния для FcγRIIa. Для FcγRIIb количество связывания FcγRIIb на единицу количества антитела рассчитывают путем корректировки количества связывания FcγRIIb, полученного из сенсограммы, построенной

15 путем измерения с количеством антитела, захваченного поверхностью чипа.

Взаимодействие между полученными антителами и FcRn человека анализируют методом с использованием Biacore T200. В качестве подвижного буфера используют 50 мМ Na-фосфата, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween20 (pH 6,0), анализ проводят при 25°C. В качестве сенсорных чипов используют чипы Series

20 S SA (фирма GE Healthcare), на которых иммобилизован биотиновый конъюгат CaptureSelect Human Fab-lambda Kinetics (фирма Thermo Fisher Scientific). Исследуемые антитела захватываются этими чипами, и FcRn, разведенному в подвижном буфере, созданы условия для взаимодействия с ними. Чипы регенерируют с помощью 10 мМ глицин-HCl (pH 1,5) и 25 мМ NaOH, и анализ

25 проводят путем повторного захвата антител. Константу диссоциации для FcRn и каждого антитела рассчитывают с использованием модели стационарного состояния с использованием программного обеспечения для оценки Biacore T200 2.0.

Табл. 39 показывает результаты измерений.

30 Таблица 39. Анализ связывания вариантов области Fc с рецепторами FcγRs и FcRn человека

Антигено	Замещения в домене СН2 в константной области тяжелой цепи К $\alpha$ или К $\beta$	Замещения в домене СН1 в константной области легкой цепи H1 или H2	К $D$ для hFcRn (M)	Отношение величина К $D$ между hFcRn и hFcR	К $D$ для hFcR (M)						Относительная величина К $D$ между hFcR и hFcR						Связывающее количество
					hFcR Ia	hFcR IIa R	hFcR IIa H	hFcR IIIa F	hFcR IIIa V	hFcR Ia	hFcR IIa R	hFcR IIa H	hFcR IIIa F	hFcR IIIa V			
04H1637-G1m/04L1610-lam1	L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/K334E	D270E/K326D/A330M/K334E	1.3E-06	1.0	4.9E-11	2.0E-06	1.5E-06	1.4E-06	2.4E-07	0.008	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0		
04H1637-K $\alpha$ 125/04L1610-lam1// 04H1637-H1076/04L1610-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K326D/K334E	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/K334E	N.T	N.T	4.0E-11	1.2E-06	4.1E-07	3.4E-09	1.9E-09	0.007	1.2	1.6	3.6	406.3	125.6		
04H1637-K $\alpha$ 482/04L1610-lam1// 04H1637-H1441/04L1610-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K326D	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/A330K/I332D/K334E	N.T	N.T	1.5E-10	2.2E-07	7.0E-08	1.7E-08	5.2E-08	0.013	0.3	9.2	20.9	79.5	45.8		
04H1637-K $\alpha$ 462/04L1610-lam1// 04H1637-H1443/04L1610-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K326D	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/A330K/I332D/K334E	N.T	N.T	7.6E-11	1.1E-07	3.9E-08	3.6E-09	1.8E-09	0.030	0.6	18.7	37.5	382.2	130.7		
04H1637-K $\alpha$ 461/04L1610-lam1// 04H1637-H1443/04L1610-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K326D/I332E	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/I332E/K334E	N.T	N.T	4.2E-11	1.9E-07	1.3E-07	2.2E-09	1.1E-09	0.025	1.2	10.7	11.1	616.5	225.7		
04H1654-KT462/04L1610-lam1// 04H1656-HT445/04L1610-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K326D	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/A330K/I332D/K334E	1.5E-06	0.9	3.0E-11	1.6E-07	1.1E-07	3.3E-09	2.2E-09	0.025	1.6	13.0	13.9	414.7	105.6		
04H1654-KT461/04L1610-lam1// 04H1656-HT443/04L1610-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K326D/I332E	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/I332E/K334E	1.5E-06	0.9	3.2E-11	2.4E-07	2.0E-07	2.6E-09	1.5E-09	0.025	1.5	8.4	7.3	525.5	156.1		
04H1654-KT473/04L1610-lam1// 04H1656-HT482/04L1610-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K326D	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/A330K/I332D/K334E	5.8E-07	2.3	4.6E-11	1.5E-07	8.1E-08	3.8E-09	2.1E-09	0.026	1.1	13.9	18.0	363.4	114.6		
04H1654-KT481/04L1610-lam1// 04H1656-HT498/04L1610-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K326D/I332E	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/I332E/K334E	5.7E-07	2.3	3.3E-11	2.6E-07	2.3E-07	2.8E-09	1.8E-09	0.022	1.5	7.7	6.5	495.2	152.0		
04H1654-KT462/04L1610-lam1// 04H1656-HT445/04L1610-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K326D	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/A330K/I332D/K334E	1.6E-06	0.8	4.1E-11	1.4E-07	9.1E-08	3.4E-09	2.3E-09	0.028	1.2	14.2	16.1	408.0	105.7		
04H1654-KT461/04L1610-lam1// 04H1656-HT443/04L1610-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K326D/I332E	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/I332E/K334E	1.6E-06	0.8	3.9E-11	2.5E-07	2.1E-07	2.6E-09	1.5E-09	0.025	1.3	8.2	7.1	536.8	158.8		
04H1654-KT473/04L1610-lam1// 04H1656-HT482/04L1610-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K326D	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/A330K/I332D/K334E	6.2E-07	2.1	4.8E-11	1.5E-07	9.1E-08	3.9E-09	2.2E-09	0.026	1.0	13.8	16.2	354.6	110.0		
04H1654-KT481/04L1610-lam1// 04H1656-HT498/04L1610-lam1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K326D/I332E	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/I332E/K334E	6.0E-07	2.2	4.3E-11	2.7E-07	2.3E-07	2.9E-09	1.7E-09	0.022	1.1	7.6	6.4	479.2	145.2		

N.T.: Не исследовали

Значения «К $D$  для hFcRn (M)» и «К $D$  для рецепторов hFcR (M)» в таблице указывают на константы диссоциации для hFcRn и каждого FcR, соответственно, а «количество связывания» показывает количество

связываемого FcγRIIb на единицу количества антитела, когда для FcγRIIb создавали возможность для взаимодействия при 1000 нМ. Понятия «относительное значение для K<sub>D</sub> между G1m и hFcRn» и «относительное значение для K<sub>D</sub> между G1m и рецепторами hFcγR» представляют собой значения, полученные путем деления значения K<sub>D</sub> для 04H1637-G1m/04L1610-lam1 для hFcRn и для каждого FcγR на значение K<sub>D</sub> для каждого варианта, соответственно. Понятие «относительное количество связывания» означает величину, полученную путем деления количества связывания каждого варианта с FcγRIIb на количество связывания 04H1637-G1m/04L1610-lam1.

Аминокислотные последовательности тяжелой цепи антитела 04H1637-G1m и легкой цепи антитела 04L1610-lam1 показаны в SEQ ID NO: 160 и 161, соответственно. Показано, что все полученные гетеродимеризованные антитела обладают повышенным связыванием с FcγRIIa и FcγRIIIa по сравнению с 04H1637-G1m/04L1610-lam1, имеющим константную область нативного IgG1 человека. Кроме того, было показано, что 04H1637-Kn462/04L1610-lam1//04H1637-H1441/04L1610-lam1, 04H1637-Kn462/04L1610-lam1//04H1637-H1445/04L1610-lam1 и 04H1637-Kn461/04L1610-lam1//04H1637-H1443/04L1610-lam1 обладают повышенным связыванием с FcγRIIa по сравнению с 04H1637-Kn125/04L1610-lam1//04H1637-H1076/04L1610-lam1, которое имеет вариант области Fc, описанный в WO 2013/002362. Показано, что связывающая способность 04H1637-Kn462/04L1610-lam1//04H1637-H1445/04L1610-lam1 с FcγRIIIa равна таковой у 04H1637-Kn125/04L1610-lam1//04H1637-H1076/04L1610-lam1, а связывающая способность 04H1637-Kn461/04L1610-lam1//04H1637-H1443/04L1610-lam1 с FcγRIIIa выше по сравнению с 04H1637-Kn125/04L1610-lam1//04H1637-H1076/04L1610-lam1. Показано, что аналогичным образом 04H1654-КТ462/04L1610-lam1//04H1656-НТ445/04L1610-lam1 и 04H1654-КТ462/04L1612-lam1//04H1656-НТ445/04L1610-lam1, имеющие разные изменения для гетеродимеризации константной области и области СН3 в IGHG1\*03, имеют сопоставимые профили связывания FcγR с 04H1637-Kn462/04L1610-lam1//04H1637-H1445/04L1610-lam1, а также показано, что 04H1654-КТ461/04L1610-lam1//04H1656-НТ443/04L1610-lam1 и 04H1654-КТ461/04L1612-lam1//04H1656-НТ443/04L1610-lam1 имеют сопоставимые профили связывания FcγR с FcγR с 04H1637-Kn461/04L1610-lam1//04H1637-H1443/04L1610-lam1. Кроме того, 04H1654-КТ473/04L1610-lam1//04H1656-

HT482/04L1610-lam1, 04H1654-KT481/04L1610-lam1//04H1656-HT498/04L1610-lam1, 04H1654-KT473/04L1612-lam1//04H1656-HT482/04L1612-lam1 и 04H1654-KT481/04L1612-lam1//04H1656-HT498/04L1612-lam1 с внесенными изменениями для улучшения кинетики крови обладают улучшенной способностью связывания с FcRn человека и сравнимой способностью связывания с FcγR по сравнению с антителами до внесения изменений для улучшения кинетики крови.

Также создан ген 04H1656-HT451 (SEQ ID NO: 272), в котором N434A/Y436T/Q438R/S440E введен в последовательность 04H1656-HT441, которая представляет собой комбинацию изменений, которые усиливают связывание с FcRn человека в кислых условиях, и изменений, снижающих связывание с ревматоидным фактором. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела HT451 показана в SEQ ID NO: 276.

Гетеродимеризованное антитело получено путем объединения 04H1654-KT473 и 04H1656-HT451 и использования 04L1610-lam1 в качестве легкой цепи антитела. В табл. 40 показаны результаты анализа взаимодействия полученных антител с FcRn человека и с FcγR человека.

Таблица 40. Анализ связывания вариантов области Fc с FcγR и FcRn человека



Аннотация	K <sub>D</sub> для hFcγRn (M)	Относительная величина K <sub>D</sub> между G1m и hFcγRn	K <sub>D</sub> для рецепторов hFcγR (M)						Связываемое количество	Относительное значение для K <sub>D</sub> между G1m и рецепторами hFcγR					Относительное связываемое количество
			hFcγR Ia	hFcγR IIa R	hFcγR IIa H	hFcγR IIIa F	hFcγR IIIa V	hFcγR IIb		hFcγR Ia	hFcγR IIa R	hFcγR IIa H	hFcγR IIIa F	hFcγR IIIa V	
04H1656-G1m/04L1610-lam1	1.7E-06	1.0	9.2E-11	1.6E-08	1.3E-08	1.0E-08	9.7E-07	0.008	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
04H1654-КТ462/04L1610-lam1// 04H1656-НТ441/04L1610-lam1	2.0E-06	0.9	1.2E-10	1.8E-07	9.9E-08	1.7E-08	4.4E-09	0.014	0.8	9.0	13.5	58.1	218.3	1.7	
04H1654-КТ473/04L1610-lam1// 04H1656-НТ451/04L1610-lam1	5.4E-07	3.2	1.4E-10	1.8E-07	9.2E-08	2.0E-08	5.1E-09	0.012	0.6	8.9	14.5	50.8	190.3	1.5	

\* – Величину K<sub>D</sub> определяют по стационарной модели

Установлено, что полученные гетеродимеризованные антитела 04Н1654-КТ462/04L1610-lam1//04Н1656-НТ441/04L1610-lam1 и 04Н1654-КТ473/04L1610-lam1//04Н1656-НТ451/04L1610-lam1 обладают усиленным связыванием с активизирующими FcγR, а именно FcγRIIIa и FcγRIIIa, по сравнению с 04Н1656-G1m/04L1610-lam1, которое имеет константную область нативного IgG1 человека. Кроме того, связывание с FcγRIIb, который является ингибирующим FcγR, поддерживалось на том же уровне, что и 04Н1656-G1m/04L1610-lam1 в обоих этих антителах. Показано, что 04Н1654-КТ473/04L1610-lam1//04Н1656-НТ451/04L1610-lam1, в котором фрагмент N434A/Y436T/Q438R/S440E интродуцирован в 04Н1654-КТ462/04L1610-lam1//04Н1656-НТ441/04L1610-lam1, проявляет повышенную способность связываться с FcRn человека по сравнению с таковой до внесения изменений.

Затем были получены варианты с усиленным связыванием FcγR с использованием различных изменений для гетеродимеризации, описанных в *Nat. Biotechnol.*, 1998, 16, 677-681, оценена их активность связывания с FcRn и FcγR человека. Получают гены тяжелых цепей антител 04Н1389-Ks462 (SEQ ID NO: 191) и 04Н1389-Km462 (SEQ ID NO: 199), которые содержат 04Н1389 (SEQ ID NO: 136) в качестве вариабельной области тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, которая имеет те же изменения, что и КТ462, введенные в область CH2 константной области с удаленными Gly и Lys на С-конце IgG1 человека (IGHG1\*03), и, кроме того, содержит в области CH3 T366W, введенный как изменение с целью гетеродимеризации для 04Н1389-Ks462, и Y349C/T366W, введенный как изменение с целью гетеродимеризации для 04Н1389-Km462. Кроме того, получены гены тяжелых цепей антител 04Н1389-Hs445 (SEQ ID NO: 192) и 04Н1389-Hm445 (SEQ ID NO: 200), которые имеют те же изменения, что и НТ445, введенные в область CH2, и, кроме того, имеют в области CH3 T366S/L368A/Y407V, введенные в качестве изменений для гетеродимеризации 04Н1389-Hs445. Аналогично, получают 04Н1389-Ks461 (SEQ ID NO: 193), 04Н1389-Km461 (SEQ ID NO: 201), 04Н1389-Hs443 (SEQ ID NO: 194) и 04Н1389-Hm443 (SEQ ID NO: 202), которые имеют те же изменения, что и у КТ461 и НТ443 в области CH2. Кроме того, получают гены тяжелых цепей антител 04Н1389-Ks473 (SEQ ID NO: 195), 04Н1389-Hs482 (SEQ ID NO: 196), 04Н1389-Ks481 (SEQ ID NO: 197), 04Н1389-Hs498 (SEQ ID NO: 198), 04Н1389-Km473 (SEQ ID NO: 203), 04Н1389-Hm482 (SEQ ID NO: 204), 04Н1389-Km481 (SEQ ID

NO: 205) и 04Н1389-Нм498 (SEQ ID NO: 206), которые имеют изменения N434A/Y436T/Q438R/S440E, которые улучшают кинетику крови, введенные в вышеуказанные константные области тяжелой цепи Ks462, Hs445, Ks461, Hs443, Km462, Hm445, Km461 и Hm443, и содержат 04Н1389 в качестве вариабельной области. 04L1615-k0MT (SEQ ID NO: 190) используют в качестве легкой цепи и получают представляющие интерес гетеродимеры. Для сравнения получен гомодимер 04Н1389-G1m/04L1615k0MT, содержащий 04Н1389-G1m (SEQ ID NO: 189). Взаимодействие между разработанными антителами и рецепторами FcγR человека анализируют с использованием Biacore T200. В качестве подвижного буфера используют 50 mM Na-фосфата, 150 mM NaCl, 0,05% Tween20 (pH 7,4), анализ проводят при 25°C. Для сенсорного чипа используют чипы Series S SA (фирма GE Healthcare), на которые был иммобилизован биотиновый конъюгат CaptureSelect Human Fab-каппа Kinetics (фирма Thermo Fisher Scientific). Исследуемые антитела захвачены этими чипами, и каждому FcγR, разведенному в подвижном буфере, дают возможность взаимодействовать с ними. Чипы регенерируют с помощью 10 mM глицин-HCl (pH 1,5) и 25 mM NaOH и проводят анализ путем повторного захвата антител. Константы диссоциации  $K_D$  (моль/л) для FcγR каждого антитела рассчитывают с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software 2.0 и модели связывания Ленгмюра 1:1 для FcγRIa и FcγRIIIa, а также модели стационарной аффинности для FcγRIIa. Для FcγRIIb количество связывания FcγRIIb на единицу количества антитела рассчитывают путем корректировки количества связывания FcγRIIb, полученного из сенсограммы, постноенной на основании измерения, с количеством антител, захваченных на поверхности чипа. Для измерения связывания с FcRn в качестве подвижного буфера используют 50 mM Na-фосфата, 150 mM NaCl, 0,05% Tween20 (pH 6,0), а константу диссоциации  $K_D$  (моль/л) рассчитывают по модели стационарного состояния (табл. 31). Что касается констант диссоциации для FcγRIIIa в табл. 41, значения, отмеченные знаком «\*», представляют собой значения, рассчитанные с помощью стационарной модели аффинности.

Таблица 41. Анализ связывания вариантов Fc-области с рецепторами FcγR и FcRn человека

Антитело	K <sub>D</sub> для hFcR <sub>II</sub> (M)	Относительная величина K <sub>D</sub> между G1m и hFcR <sub>II</sub>	K <sub>D</sub> для рецепторов hFcγR (M)						Связываемое количество	Относительная величина K <sub>D</sub> между G1m и рецепторами hFcγR				Относительное связываемое количество
			hFcγ R1a	hFcγR IIa R	hFcγR IIa H	hFcγR IIIa F	hFcγR IIIa V	hFcγR IIb		hFcγR Ia	hFcγR IIa R	hFcγR IIa H	hFcγR IIIa V	
04H1389-G1m/04L1615-kOMT	1.3E-06	1.0	4.5E-11	1.5E-06	1.1E-06	N.T.	*	9.1E-07	0.011	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
04H1389-Ks462/04L1615-kOMT// 04H1389-Hs445/04L1615-kOMT	1.6E-06	0.8	4.7E-11	1.6E-07	6.7E-08	2.1E-09	1.1E-09	0.030	1.0	9.1	15.8	829.9	2.6	
04H1389-Ks461/04L1615-kOMT// 04H1389-Hs443/04L1615-kOMT	1.7E-06	0.8	3.0E-11	2.5E-07	1.6E-07	1.2E-09	5.6E-10	0.024	1.5	5.9	6.7	1627.2	2.1	
04H1389-Ks473/04L1615-kOMT// 04H1389-Hs482/04L1615-kOMT	4.5E-07	2.9	5.1E-11	1.6E-07	7.5E-08	2.3E-09	1.2E-09	0.026	0.9	9.0	14.1	760.2	2.3	
04H1389-Ks481/04L1615-kOMT// 04H1389-Hs498/04L1615-kOMT	4.6E-07	2.8	2.8E-11	2.6E-07	1.9E-07	1.3E-09	6.0E-10	0.023	1.6	5.6	5.6	1500.7	2.0	
04H1389-Km462/04L1615-kOMT// 04H1389-Hm445/04L1615-kOMT	1.7E-06	0.8	4.8E-11	1.6E-07	7.4E-08	2.2E-09	1.1E-09	0.029	0.9	9.5	14.4	810.6	2.6	
04H1389-Km461/04L1615-kOMT// 04H1389-Hm443/04L1615-kOMT	1.7E-06	0.7	2.5E-11	2.6E-07	1.9E-07	1.2E-09	5.6E-10	0.024	1.8	5.8	5.7	1620.3	2.1	
04H1389-Km473/04L1615-kOMT// 04H1389-Hm482/04L1615-kOMT	4.6E-07	2.8	6.2E-11	1.8E-07	8.7E-08	2.6E-09	1.3E-09	0.024	0.7	8.2	12.3	705.1	2.1	
04H1389-Km481/04L1615-kOMT// 04H1389-Hm498/04L1615-kOMT	4.7E-07	2.8	4.2E-11	2.9E-07	2.1E-07	1.4E-09	6.2E-10	0.021	1.1	5.1	5.0	1469.1	1.9	

\* – Величину K<sub>D</sub> определяют по стационарной модели  
N.T. – Не исследовали

Все полученные в настоящем изобретении гетеродимеризованные антитела обладают повышенной активностью связывания с FcγRIIa и FcγRIIIa по сравнению с 04H1389-G1m/04L1615-k0MT. Кроме того, все 04H1389-  
 5 Ks473/04L1615-k0MT//04H1389-Hs482/04L1615-k0MT, 04H1389-Ks481/04L1615-k0MT//04H1389-Hs498/04L1615-k0MT, 04H1389-Km473/04L1615-k0MT//04H1389-Hm482/04L1615-k0MT и 04H1389-Km481/04L1615-k0MT//04H1389-Hm498/04L1615-k0MT, в которые были внесены изменения для улучшения кинетики антител в крови, обладают повышенной активностью  
 10 связывания с FcRn человека по сравнению с исходным антителом до внесения изменений и в отношении активности связывания FcγR они имели такой же профиль связывания, как и исходное антитело.

Кроме того, ген 04H1389-Hm441 (SEQ ID NO: 273), который содержит 04H1389 (SEQ ID NO: 136) в качестве варибельной области тяжелой цепи, имеет те же изменения, что и HТ441, введенный в область СН2 тяжелой цепи, и содержит Y349C. /366W, использованный для изменений с целью гетеродимеризации в области СН3. Напротив, получен 04H1389-Hm451 (SEQ ID NO: 274) с введенным N434A/Y436T/Q438R/S440E, который представляет собой комбинацию изменений, усиливающих связывание с FcRn человека в кислых  
 15 условиях, и изменений, снижающих связывание с ревматоидным фактором. Аминокислотные последовательности тяжелых цепей Hm441 и Hm451 антитела показаны в SEQ ID NO: 277 и 278 соответственно. Гетеродимеризованные антитела получены с использованием 04H1389-Km473, 04H1389-Hm451 или 04H1389-Hm482 в качестве тяжелой цепи антитела и 04L1305-k0MT в качестве легкой цепи антитела. В табл. 42 показаны результаты анализа взаимодействия полученных антител с FcRn человека и с рецепторами FcγR человека.  
 20

Таблица 42. Анализ связывания вариантов области Fc с FcRn человека и с рецепторами FcγR человека.

Антитело	$K_D$ для hFcRn (M)	Относительная величина $K_D$ между G1m и hFcRn	$K_D$ для рецепторов hFcγR (M)					Связываемое количество	Относительная величина $K_D$ между G1m и рецепторами hFcγR					Относительное связываемое количество
			hFcγR Ia	hFcγR IIa R	hFcγR IIa H	hFcγR IIIa F	hFcγR IIIa V		hFcγR IIb	hFcγR Ia	hFcγR IIa R	hFcγR IIa H	hFcγR IIIa F	
04H1389-G1m/04L1305-kOMT	1.0E-06	1.0	6.9E-11	1.6E-06	1.1E-06	6.9E-07	*8.8E-07	0.013	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
04H1389-Km473/04L1305-kOMT// 04H1389-Hm451/04L1305-kOMT	3.3E-07	3.0	1.5E-10	1.6E-07	5.3E-08	1.7E-08	3.9E-09	0.015	0.5	9.7	20.0	41.3	224.7	1.3
04H1389-Km473/04L1305-kOMT// 04H1389-Hm482/04L1305-kOMT	3.7E-07	2.7	6.1E-11	8.6E-08	3.5E-08	2.7E-09	9.5E-10	0.034	1.1	18.5	30.8	258.1	930.5	3.0

\* – Величину  $K_D$  определяют по стационарной модели

Показано, что полученные гетеродимеризованные антитела 04H1389-Km473/04L1305-k0MT//04H1389-Hm451/04L1305-k0MT и 04H1389-Km473/04L1305-k0MT//04H1389-Hm482/04L1305-k0MT обладают повышенным связыванием с активирующими рецепторами FcγR, а именно FcγRIIa and FcγRIIIa, по сравнению с 04H1389-G1m/04L1305-k0MT, имеющими константную область нативного IgG1 человека. Было также показано, что оба этих антитела обладают повышенной способностью связываться с FcRn человека по сравнению с 04H1389-G1m/04L1305-k0MT.

Затем варианты константной области с усиленным связыванием с FcγR, обнаруженные в настоящем изобретении, сравнивают с существующими вариантами с усиленным связыванием FcγR. Создают гены тяжелых цепей антител MDX10D1H-Kn125 (SEQ ID NO: 217), MDX10D1H-H1076 (SEQ ID NO: 218), MDX10D1H-Kn462 (SEQ ID NO: 219), MDX10D1H-H1445 (SEQ ID NO: 220), MDX10D1H-Kn461 (SEQ ID NO: 221) и MDX10D1H-H1443 (SEQ ID NO: 222), которые содержат MDX10D1H (SEQ ID NO: 154) в качестве вариабельной области тяжелой цепи, и константные области тяжелой цепи, перечисленные в табл. 39 и ген MDX10D1H-G1m (SEQ ID NO: 210), содержащий область CH2 нативного IgG1 человека. Создан ген тяжелой цепи антитела MDX10D1H-GASDIE (SEQ ID NO: 215), который имеет изменения G236A/S239D/I332E в области CH2, как описано в *Mol. Cancer Ther.*, 2008, 7, 2517-2527, как вариант с усиленным связыванием с FcγRIIa. Кроме того, был создан ген тяжелой цепи антитела MDX10D1H-GASDALIE (SEQ ID NO: 216), который имеет G236A/S239D/A330L/I332E в области CH2, как описано в *J. Struct. Biol.*, 2016, 194, 78-89 в качестве варианта с усиленным связыванием с FcγRIIIa. Для получения представляющих интерес антител используют в качестве легкой цепи антитела MDX10D1L-k0MT (SEQ ID NO: 211). Активность связывания этих антител с FcγR человека измеряют описанным выше способом с использованием биотинового конъюгата CaptureSelect Human Fab-kappa Kinetics (табл. 43).

Таблица 43. Анализ связывания вариантов Fc-области с рецепторами FcγR человека

Антигено	K <sub>D</sub> для рецепторов hFcγR (M)				Связывающее количество		Относительная величина K <sub>D</sub> между G1m и рецепторами hFcγR			Относительное связывающее количество	
	hFcγR IIIa R	hFcγR IIIa H	hFcγR IIIa F	hFcγR IIIa V	hFcγR IIIa H	hFcγR IIIa V	hFcγR IIIa R	hFcγR IIIa H	hFcγR IIIa V	hFcγR IIb	hFcγR IIb
	1.5E-06	1.0E-06	N.T.	9.5E-07	0.012	0.012	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-KOMT	6.1E-08	5.5E-08	2.3E-08	1.4E-08	0.077	0.077	24.2	18.9	68.2	5.8	5.8
MDX10D1H-CASDIE/MDX10D1L-KOMT	7.9E-07	6.7E-07	1.2E-08	6.9E-09	0.044	0.044	1.9	1.1	138.1	3.6	3.6
MDX10D1H-CASDALIE/MDX10D1L-KOMT	9.6E-07	2.7E-07	1.9E-09	1.1E-09	0.009	0.009	1.5	3.8	888.8	0.7	0.7
MDX10D1H-Kn462/MDX10D1H-H445/MDX10D1L-KOMT	1.0E-07	2.8E-08	2.7E-09	1.2E-09	0.037	0.037	14.9	37.3	807.1	3.0	3.0
MDX10D1H-Kn461/MDX10D1H-H443/MDX10D1L-KOMT	1.7E-07	8.8E-08	1.4E-09	5.7E-10	0.031	0.031	9.0	11.8	1576.4	2.5	2.5

\* – Величину K<sub>D</sub> определяют по стационарной модели  
N.T. – Не исследовали

Значение «K<sub>D</sub> для hFcγR (M)» в таблице означает константу диссоциации для каждого из перечисленных FcγR, а «количество связывания» означает количество связывания FcγRIIb на единицу количества антитела, когда у FcγRIIb есть возможность взаимодействовать при 1000 нМ. «Относительное значение K<sub>D</sub>



между G1m и рецепторами hFcγR» означает величину, полученную путем деления значения  $K_D$  MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT для каждого FcγR на значение  $K_D$  каждого варианта, а «относительное количество связывания» означает величину, полученную путем деления количества связывания каждого варианта с FcγRIIb на количество связывания MDX10D1H-G1m/MDX10D1L-k0MT.

Полученные гетеродимеры MDX10D1H-Kn125/MDX10D1H-H1076/MDX10D1L-k0MT, MDX10D1H-Kn462/MDX10D1H-H1445/MDX10D1L-k0MT и MDX10D1H-Kn461/MDX10D1H-H1443/MDX10D1L-k0MT все обладают повышенным связыванием с FcγRIIIa по сравнению с существующими антителами MDX10D1H-GASDIE/MDX10D1L-k0MT и MDX10D1H-GASDALIE/MDX10D1L-k0MT с усиленным связыванием FcγR. Также было показано, что связывание MDX10D1H-Kn462/MDX10D1H-H1445/MDX10D1L-k0MT с FcγRIIIaH примерно в 2 раза выше по сравнению с существующим антителом MDX10D1H-GASDIE/MDX10D1L-k0MT, усиленным FcγRIIIa.

Контрольный пример 6-2. Оценка *in vitro* активности ADCC различных антител с измененными константными областями

Для анализа активности ADCC *in vitro* используют набор hFcγRIIIaV ADCC Reporter Bioassay, Core Kit (фирма Promega). В каждую лунку 96-луночного планшета в качестве клеток-мишеней вносят 25 мкл суспензии клеток hCTLA-4-CHO в качестве клеток-мишеней в концентрации до  $2 \times 10^6$ /мл с использованием среды, в качестве которой используют буфер для анализа (90% RPMI1640, 10% FBS). Затем добавляют по 25 мкл каждого раствора антител, разбавленного буфером для анализа, таким образом, чтобы конечная концентрация составляла 0, 0,001, 0,01, 0,1 и 1 мкг/мл. Затем в качестве суспензии эффекторных клеток добавляют 25 мкл клеток Jurkat, экспрессирующих hFcγRIIIaV (входят в набор), приготовленных до концентрации  $6 \times 10^6$ /мл со средой, таким образом, чтобы растворы были смешаны до общего объема 75 мкл. Планшет оставляют стоять при 37°C в течение ночи в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. Затем планшет оставляют при комнатной температуре на 15 мин и в каждую лунку добавляют по 75 мкл реагента Bio-Glo. В качестве реагента Bio-Glo используют систему анализа люциферазы Bio-glo (буфер и субстрат). Люминесценцию каждой лунки затем измеряют с помощью планшет-ридера. Значение, полученное путем деления значения люминесценции каждой лунки на значение люминесценции лунок без

антител, определяют как индукцию кратности, которую используют в качестве показателя для оценки ADCC каждого антитела. Полученные результаты представлены на фиг. 37. На фигуре индукция кратности представлена в относительных единицах люминесценции (RLU).

5 Эти результаты показывают, что активность ADCC антител, содержащих измененный Fc, против клеток hCTLA-4-CHO выше, чем активность константной области IgG1 человека дикого типа.

Контрольный пример 6-3. Оценка активности ADCP *in vitro* различных антител с измененными константными областями

10 Основной набор hFcγRIIIaH ADCP Reporter Bioassay (фирма Promega) используют для анализа активности ADCC *in vitro*. В каждую лунку 96-луночного планшета в качестве клеток-мишеней добавляют по 25 мкл клеток hCTLA-4-CHO в качестве клеток-мишеней в концентрации  $1 \times 10^6$ /мл, приготовленной с использованием среды на основе буфера для анализа (с 4%  
15 среды RPMI1640, в которой содержится небольшое количество сыворотки IgG). Затем добавляют по 25 мкл каждого раствора антитела, разбавленного буфером для анализа, таким образом, чтобы конечная концентрация составляла 0, 0,001, 0,01, 0,1 и 1 мкг/мл. В итоге, 25 мкл клеток Jurkat, экспрессирующих hFcγRIIIaH, включенных в набор, добавляют в качестве суспензии эффекторных клеток,  
20 таким образом чтобы растворы смешивались до общего объема 75 мкл. Планшет оставляют при 37°C в течение ночи в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. Плотность клеточного раствора клеток Jurkat, экспрессирующих hFcγRIIIaH, составляет  $8,25 \times 10^5$ /мл. Затем планшет оставляют при комнатной температуре на 15 мин и в каждую лунку добавляют по 75 мкл реагента Bio-Glo. В качестве реагента Bio-Glo используют реактив с люциферазой Bio-Glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate). Люминесценцию в каждой лунке затем измеряют с помощью планшет-ридера. Значение, полученное путем деления значения люминесценции каждой лунки на значение люминесценции лунок без антител, определяют как индукцию кратности, которую используют в качестве индекса для оценки ADCP  
25 каждого антитела. Полученные результаты представлены на фиг. 38. На фигуре индукция кратности представлена в относительных единицах люминесценции (RLU).  
30

Результаты показывают, что активность ADCP антител, содержащих измененный фрагмент Fc, против клеток hCTLA-4-CHO выше, чем такой же показатель в случае константной области IgG1 дикого типа человека.

Контрольный пример 6-4. Оценка активности ADCC *in vitro* анти-CTLA-4 переключающего антитела с измененным фрагментом Fc

Получают анти-CTLA-4 переключающие антитела с измененным Fc (04H1654-Kn462/04L1610-lam1//04H1656-H1445/04L1610-lam1, аббревиатура: SW1610-ART6; 04H1654-Kn462/04L1612-lam1//04H1656-H1445/04L1612-lam1, аббревиатура: SW1612-ART6; and 04H1389-Kn462/04L1305-k0MT//04H1389-H1445/04L1305-k0MT, аббревиатура: SW1389-ART6).

В антителе SW1610-ART6 одна переменная область тяжелой цепи 04H1654 (SEQ ID NO: 35) связана с константной областью тяжелой цепи человека Kn462 (SEQ ID NO: 43), другая переменная область тяжелой цепи 04H1656 (SEQ ID NO: 37) связана с константной областью тяжелой цепи человека H1445 (SEQ ID NO: 44) в качестве константной области, а для переменной области легкой цепи 04L1610 (SEQ ID NO: 39) – с константной областью легкой цепи человека дикого типа lam1 (SEQ ID NO: 39). ID NO: 53). Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

В антителе SW1612-ART6 одна переменная область тяжелой цепи 04H1654 (SEQ ID NO: 35) связана с константной областью тяжелой цепи человека Kn462 (SEQ ID NO: 43), другая переменная область тяжелой цепи 04H1656 (SEQ ID NO: 37) связана с константной областью тяжелой цепи человека H1445 (SEQ ID NO: 44) в качестве константной области, а для переменной области легкой цепи 04L1612 (SEQ ID NO: 40) – с константной областью легкой цепи человека дикого типа lam1 (SEQ ID NO: 53). Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

В антителе SW1389-ART6 две переменные области тяжелой цепи 04H1389 (SEQ ID NO: 29) связаны, соответственно, с константной областью тяжелой цепи человека Kn462 (SEQ ID NO: 43) и константной областью тяжелой цепи человека H1445 (SEQ ID NO: 44) в качестве константной области, а также для переменной области легкой цепи 04L1305 (SEQ ID NO: 30) используют константную область легкой цепи человека k0MT дикого типа (SEQ ID NO: 33).

Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

Основной набор hFcγRIIIaV ADCP Reporter Bioassay (фирма Promega) используют для анализа активности ADCC *in vitro*. В каждую лунку 96-луночного планшета в качестве клеток-мишеней добавляют по 12,5 мкл клеток hCTLA-4-CHO в качестве клеток-мишеней в концентрации  $2 \times 10^6$ /мл, 5  
приготовленной с использованием среды на основе буфера для анализа (с 4% среды RPMI1640, в которой содержится небольшое количество сыворотки IgG). Затем последовательно добавляют растворы АТФ, разведенные буфером для 10  
анализа, таким образом, чтобы конечная концентрация составляла 0 и 100 мкМ, и растворы антител SW1389-ART6, SW1610-ART6 и SW1612-ART6, разведенные буфером для анализа до конечной концентрации 0, 0,001, 0,01, 0,1 и 1 мкг/мл. В итоге, 25 мкл клеток Jurkat, экспрессирующих hFcγRIIIaV (включенных в набор), разводят средой до концентрации  $3 \times 10^6$ /мл и добавляют в качестве суспензии 15  
эффекторных клеток таким образом, что в смеси общий объем составляет 75 мкл. Планшет оставляют при 37°C на 6 ч в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. Затем планшет оставляют при комнатной температуре на 15 мин и в каждую лунку добавляют по 75 мкл реагента Bio-Glo. В качестве реагента Bio-Glo используют реактив с люциферазой Bio-Glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate). 20  
Люминесценцию в каждой лунке затем измеряют с помощью планшет-ридера. Значение, полученное путем деления значения люминесценции каждой лунки на значение люминесценции лунок без антител, определяют как индукцию кратности, которую используют в качестве индекса для оценки ADCC каждого антитела. Полученные результаты представлены на фиг. 39 (SW1389-ART6), 25  
фиг. 40 (SW1610-ART6) и фиг. 41 (SW1612-ART6). На фигурах индукция кратности представлена в относительных единицах люминесценции (RLU).

Из полученных результатов было подтверждено, что ADCC активность переключающих анти-CTLA-4 антител, обладающих измененным фрагментом против клеток hCTLA-4-CHO, различается в присутствии и в отсутствие АТФ, и 30  
что присутствует АТФ-зависимая цитотоксичность против клеток hCTLA-4-CHO.

Контрольный пример 6-5. Оценка *in vitro* нейтрализующей активности анти-CTLA-4 переключающих антител

Получают измененные анти-CTLA-4 переключающие антитела, антитела человека с переменными областями SW1389, SW1610, SW1612 и SW1615.

5 Для антитела SW1389 применяют 04H1389 (SEQ ID NO: 29) в качестве переменной области тяжелой цепи и 04L1305 (SEQ ID NO: 30) в качестве переменной области легкой цепи. После связывания переменных областей с константными областями человека антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

10 Для антитела SW1610 применяют 04H1654 (SEQ ID NO: 35) и 04H1656 (SEQ ID NO: 37) в качестве переменной области тяжелой цепи и 04L1610 (SEQ ID NO: 39) в качестве переменной области легкой цепи. После связывания переменных областей с константными областями человека антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

15 Для антитела SW1612 применяют 04H1654 (SEQ ID NO: 35) и 04H1656 (SEQ ID NO: 37) в качестве переменной области тяжелой цепи и 04L1612 (SEQ ID NO: 40) в качестве переменной области легкой цепи. После связывания переменных областей с константными областями человека антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

20 Для антитела SW1615 применяют 04H1389 (SEQ ID NO: 29) в качестве переменной области тяжелой цепи и 04L1615 (SEQ ID NO: 34) в качестве переменной области легкой цепи. После связывания переменных областей с константными областями человека антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

25 Для измерения *in vitro* нейтрализующей активности применяют CTLA-4 Blockade Bioassay (фирма Promega). В каждую лунку 96-луночного планшета в качестве клеток-мишеней добавляют по 25 мкл клеток aAPC-Raji, прикрепленных к набору, приготовленных в концентрации  $1 \times 10^6$ /мл в среде, причем в качестве среды используют буфер для анализа (10% FBS в RPMI1640).  
30 Затем растворы АТФ разбавляют буфером для анализа до конечной концентрации 0 и 100 мкМ, после чего растворы антител, имеющие переменные области SW1389, SW1610, SW1612 и SW1615, последовательно разбавляют буфером для анализа до конечной концентрации 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 и 10 мкг/мл. В итоге по 25 мкл клеток IL2-luc2-CTLA-4-Jurkat (включенных в

набор), приготовленных до концентрации  $2 \times 10^6$ /мл добавлением среды, вносят в качестве суспензии эффекторных клеток таким образом, что раствор смешивают до общего объема 75 мкл. Планшет оставляют при 37°C в течение 6 ч в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. Затем планшет оставляют при комнатной температуре на 15 мин и в каждую лунку добавляют по 75 мкл реагента Bio-Glo. В качестве реагента Bio-Glo используют систему анализа люциферазы Bio-Glo (буфер и субстрат). Люминесценцию каждой лунки затем измеряют с помощью планшет-ридера. Значение, полученное путем деления значения люминесценции каждой лунки на значение люминесценции лунок без антител, определяют как индукцию кратности, которую используют в качестве показателя для оценки нейтрализующей активности каждого антитела. Полученные результаты показаны на фиг. 42 (SW1389), фиг. 43 (SW1610), фиг. 44 (SW1612) и фиг. 45 (SW1615). На фигурах индукция кратности представлена в относительных единицах люминесценции (RLU).

Из полученных результатов было подтверждено, что нейтрализующая активность переключающих анти-CTLA-4 антител против клеток, экспрессирующих hCTLA-4, различается в присутствии и в отсутствие АТФ, и что нейтрализующая активность АТФ-зависима.

Контрольный пример 6-6. Оценка *in vitro* цитотоксической активности анти-CTLA-4 переключающего антитела против CTLA-4-положительных регуляторных Т-клеток

Получают анти-CTLA-4 переключающие антитела с измененным фрагментом Fc (04H1654-KT473/04L1610-lam1//04H1656-HT451/04L1610-lam1, аббревиатура: SW1610-ART5+ACT1; 04H1654-KT473/04L1610-lam1//04H1656-HT482/04L1610-lam1, аббревиатура: SW1610-ART6+ACT1; 04H1389-Km473/04L1305-k0MT//04H1389-Hm451/04L1305-k0MT, аббревиатура: SW1389-ART5+ACT1; 04H1389-Km473/04L1305-k0MT//04H1389-Hm482/04L1305-k0MT, аббревиатура: SW1389-ART6+ACT1).

Для антитела SW1610-ART5+ACT1 применяют 04H1654-KT473 (SEQ ID NO: 184) в качестве одной тяжелой цепи, 04H1656-HT451 (SEQ ID NO: 272) применяют в качестве другой тяжелой цепи и 04L1610-lam1 (SEQ ID NO: 161) применяют в качестве легкой цепи. Антитело экспрессируют и очищают способом, известным специалистам в данной области.

Для антитела SW1610-ART6+ACT1 применяют 04H1654-KT473 (SEQ ID NO: 184) в качестве одной тяжелой цепи, 04H1656-HT482 (SEQ ID NO: 185) применяют в качестве другой тяжелой цепи и 04L1610-lam1 (SEQ ID NO: 161) применяют в качестве легкой цепи. Антитело экспрессируют и очищают  
5 способом, известным специалистам в данной области.

Для антитела SW1389-ART5+ACT1 применяют 04H1389-Km473 (SEQ ID NO: 203) в качестве одной тяжелой цепи, 04H1389-Hm451 (SEQ ID NO: 274) применяют в качестве другой тяжелой цепи и 04L1305-k0MT (SEQ ID NO: 275) применяют в качестве легкой цепи. Антитело экспрессируют и очищают  
10 способом, известным специалистам в данной области.

Для антитела SW1389-ART6+ACT1 применяют 04H1389-Km473 (SEQ ID NO: 203) в качестве одной тяжелой цепи, 04H1389-Hm482 (SEQ ID NO: 204) применяют в качестве другой тяжелой цепи и 04L1305-k0MT (SEQ ID NO: 275) применяют в качестве легкой цепи. Антитело экспрессируют и очищают  
15 способом, известным специалистам в данной области.

Оценивают *in vitro* цитотоксическую активность полученных анти-CTLA-4 антител с измененным фрагментом Fc в отношении CTLA-4-положительных регуляторных Т-клеток (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> CTLA-4<sup>+</sup>). Сначала МКПК человека (CTL Cryopreserved Human МКПК, CTL) подвергают замораживанию-оттаиванию и суспендируют в 50 ЕД/мл интерлейкина 2 (ИЛ-2)/RPMI/10% FBS, таким образом, что плотность клеток составляет  $2 \times 10^6$  клеток/мл, и культивируют при 37°C в течение 4 дней в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. Через 4 дня клетки собирают и дважды промывают смесью RPMI/10% FBS, а затем высевают по 100 мкл в каждую лунку 96-луночного планшета с U-образным дном ( $8 \times 10^5$   
20 клеток/лунку или  $5 \times 10^5$  клеток/лунку) и в каждую лунку добавляют по 25 мкл раствора KLH-G1m, доведенного с помощью RPMI/10% FBS до концентрации 8 мг/мл. Затем добавляют по 25 мкл каждого раствора антител, приготовленного для каждой концентрации (0, 2,4, 8, 24 и 80 мкг/мл или 0, 0,8, 8, 80 и 800 мкг/мл) в RPMI/10% FBS в каждую лунку 96-луночного планшета с U-образным дном.  
30 Кроме того, добавляют 50 мкл раствора АТФ, доведенного до 0 или 400 мкМ в RPMI/10% FBS, смесь тщательно суспендируют, а затем оставляют при 37°C в течение 6 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5 мкл раствора АТФ, доведенного до 0 или 4000 мкМ, добавляют каждые 2 ч (в общей сложности дважды)). Через 6 ч МКПК собирают, дважды промывают раствором для промывки auto MACS Rinsing

Solution (фирма Miltenyi), проводят реакцию со следующими антителами и анализируют присутствующие фракции иммунных клеток методом FACS: реагент для определения жизнеспособности (фирма Biolegend, Zombie Aqua), антитело к CD3 (фирма BD, клон: UCHT1), антитело к CD4 (фирма BD, клон: RPA-T4), антитело к CD8 (фирма BD, клон: SK1), антитело к CD45RA (фирма Biolegend, клон: HI100), антитело к CD25 (фирма BD, клон: 2A3), антитело к CD16 (фирма Biolegend, клон: 3G8), антитело к CD56 (фирма Biolegend, клон: HCD56), антитело к CTLA-4 (фирма Биолегенда, клон: BNI3). Анализ FACS проводили на проточном цитофлуориметре BD LSR Fortessa X-20 (фирма BD).

5 Долю CTLA-4-положительных регуляторных Т-клеток среди жизнеспособных клеток рассчитывают при каждой концентрации антитела, а относительную величину, при которой значение при концентрации антитела 0 принимают за 100%, определяют как выживаемость (%) CTLA-4- положительных регуляторных Т-клеток, что используют в качестве показателя при оценке

10 цитотоксической активности каждого антитела. Полученные результаты представлены на фиг. 46 (SW1389-ART5+ACT1), фиг. 47 (SW1389-ART6+ACT1), фиг. 48 (SW1610-ART5+ACT1) и фиг. 49 (SW1610-ART6+ACT1).

Эти результаты подтверждают, что цитотоксическая активность переключающих анти-CTLA-4 антител с измененным Fc против CTLA-4-положительных регуляторных Т-клеток различается в присутствии и в

20 отсутствие АТФ, кроме того, существует АТФ-зависимая цитотоксическая активность против CTLA-4- положительных регуляторных Т-клеток.

Контрольный пример 7. Получение вариантов области Fc с повышенной способностью связывания FcγR

25 Хотя ранее сообщалось о вариантах Fc для усиления цитотоксических эффекторных функций ADCC и ADCP, все варианты с симметрично сконструированными доменами CH2 и антителами с низким содержанием фукозы, созданными за счет модификаций сахарной цепи, все еще имели возможности для дальнейшего усиления связывания FcγR. Кроме того, хотя

30 варианты с асимметрично сконструированными доменами CH2, описанные в WO2013002362 и WO2014104165, значительно улучшают способность связывания FcγR по сравнению с симметрично сконструированными вариантами Fc-области, они имеют возможности для дальнейшего улучшения. В частности, вариант Fc-области Kn125/H1076, описанный в WO2013002362 и WO2014104165



(сокращенное название здесь: ART1), имеет значительно повышенную способность связывания с FcγRIIIa, но его способность связывать FcγRIIa была повышена лишь в несколько раз по сравнению с IgG1, поэтому дальнейшее усиление казалось необходимо продемонстрировать сильную активность ADCP.

5 Kп120/Н1068 (сокращенное название здесь: ART2) обладает усиленным связыванием как с FcγRIIa, так и с FcγRIIIa, и ожидалось, что он будет демонстрировать сильную активность ADCC и ADCP. Однако его способность связывания с ингибирующим FcγRIIb также была повышена, и поэтому его соотношение A/I, показатель проявления превосходных эффекторных функций,

10 было низким. Таким образом, существующие методы не достигают самого идеального профиля, то есть «технологии модификации антител для более сильного связывания с активирующими FcγRIIa и FcγRIIIa и подавления связывания с ингибирующим FcγRIIb». Соответственно, в настоящем изобретении изучались дополнительные комбинации модификаций и изучалось

15 получение вариантов Fc-области с превосходным профилем, которые возможно позволят преодолеть вышеупомянутые проблемы.

Существующие варианты Fc-области, которые можно использовать в качестве эталонов для сравнения, получают следующим образом: сначала получают ген тяжелой цепи антитела H240-G1d (SEQ ID NO: 279), как описано в

20 WO2014104165, который имеет переменную область тяжелой цепи против эпирегулина человека и последовательность константной области тяжелой цепи IgG1 человека. G1d представляет собой последовательность, полученную путем удаления C-концевых Lys и Gly из последовательности константной области тяжелой цепи нативного IgG1 человека. Модификации «выступ-во-впадину»

25 (*Nat. Biotechnol.*, 1998, 16, 677), которые представляют собой модификации, способствующие гетеродимеризации, вводят в домен CH3 H240-G1d, а модификации для усиления связывания FcγR асимметрично вводят в домен CH2 для получения вариантов Fc-области, которые предназначены для использования в качестве эталонов для сравнения, ART1 и ART2. ART1, вариант Fc-области с

30 усиленным связыванием FcγRIIIa, описанный в WO2013002362 и WO2014104165, получают следующим образом: модификации для усиления связывания FcγR, L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A, вводят в домен CH2 H240-G1d и Y349C/T366W вводят в домен CH3 с получением H240-Kп125 (SEQ ID NO: 280). Кроме того, D270E/K326D/A330M/K334E вводят в

домен CH2 H240-G1d, а D356C/T366S/L368A/Y407V вводят в домен CH3 с получением H240-H1076 (SEQ ID NO: 281). Плазмиды, содержащие H240-Kn125, H240-H1076 и ген легкой цепи антитела против эпирегулина человека, L73-k0 (SEQ ID NO: 282), смешивают и вводят в клеточную линию Expi293, 5 полученную из клеток эмбриональной почки человека (фирма Invitrogen), путем липофекции. После 4 дней культивирования супернатант подвергают очистке методом, известным специалистам в данной области техники, с использованием rProtein A Sepharose™ Fast Flow (фирма Amersham Biosciences) для получения варианта Fc-антитела против эпирегулина человека (H240-Kn125/L73-k0/ /H240- 10 H1076/L73-k0, сокращенное название антитела: EGL-ART1). Поглощение раствора очищенного антитела при 280 нм измеряют с помощью спектрофотометра. Концентрацию очищенного антитела рассчитывают на основе полученного значения измерения с использованием коэффициента экстинкции, рассчитанного методом PACE (*Protein Science* 1995; 4: 2411-2423).

15 Аналогичным образом получают вариант Fc-области с усиленным связыванием как с FcγRIIa, так и с FcγRIIIa, описанный в WO2013002362 и WO2014104165, EGL-ART2 (H240-Kn120/L73-k0//H240-H1068/L73-k0). Кроме того, различные комбинации модификаций, усиливающих связывание FcγR, G236A, S239D, A330L и I332E, вводят симметрично в домен CH2 для получения 20 известных антител с усиленным связыванием FcγR, EGL-SDALIE (H240-Kn032/L73-k0//H240-H1032/L73-k0), EGL-GASDIE (H240-Kn037/L73-k0//H240-H1036/L73-k0) и EGL-GASDALIE (H240-GASDALIE/L73-k0). В дополнение к этому в качестве эталона для сравнения получают афукозилированное антитело EGL-афукозил, которое, как сообщается, обладает усиленным связыванием с 25 FcγRIIIa (*Glycobiol.* 2006, 17(1), 104-118 и т.п.). В клетках, в которых экспрессия гена переносчика фукозы искусственно подавлена на обеих гомологичных хромосомах, функция переносчика фукозы ингибируется. Эти клетки можно использовать для получения антител с дефицитом фукозы (WO2006/067913 и т.п.). Антитела с дефицитом фукозы также можно получить, продуцируя 30 антитела в клетках, вынужденных экспрессировать бета-1, 4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III и альфа-маннозидазу Гольджи II (*Biotechnol, Bioeng.* 2006, 93(5), 851-861). Используя эти способы, известные специалистам в данной области, был получен EGL-афукозил (H240-G1d/L73-k\_гликомаб).

Для получения вариантов Fc-области, превосходящих эти существующие варианты, получают новые варианты Fc-области, показанные в табл. 44, а именно ART3, ART4, ART5, ART6, ART8, ART10, ART11 и ART12. Все эти варианты имеют L234F, L235Q, G236W, S239M, H268D, D270E и S298A, введенные в одну из тяжелых цепей, и D270E, S298A, K326D и I334E, введенные в другую тяжелую цепь; их получают путем введения, помимо основных асимметричных модификаций, комбинации модификаций для изменения связывания FcγR. В частности, для цепи, в которую вводят L234F/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A, исследуют дальнейшее введение K326D, A330M и I332E. Для цепи, в которую были введены D270E/S298A/K326D/K334E, было рассмотрено дальнейшее введение G236A, I332E, I332D и A330M. В дополнение к этим модификациям, усиливающим связывание FcγR, в обе цепи ART4, ART5, ART6, ART8, ART10, ART11 и ART12 вводят T250V и T307P, которые представляют собой модификации для улучшения стабильности антител, как описано в WO2013118858.

В настоящем описании название каждой константной области тяжелой цепи соответствует следующим последовательностям: SEQ ID NO: G1d (SEQ ID NO: 307), Kn125 (SEQ ID NO: 308), H1076 (SEQ ID NO: 309), k0 (SEQ ID NO: 310), Kn120 (SEQ ID NO: 311), H1068 (SEQ ID NO: 312), Kn443 (SEQ ID NO: 313), H1408 (SEQ ID NO: 314), Kn456 (SEQ ID NO: 315), H1446 (SEQ ID NO: 316), Kn462 (SEQ ID NO: 317), H1441 (SEQ ID NO: 318), Kn462 (SEQ ID NO: 319), H1445 (SEQ ID NO: 320), Kn461 (SEQ ID NO: 319). ID NO: 321), H1443 (SEQ ID NO: 322), Kn494 (SEQ ID NO: 323), H1514 (SEQ ID NO: 324), Kn496 (SEQ ID NO: 325), H1516 (SEQ ID NO: 326), Kn498 (SEQ ID NO: 327), H1518 (SEQ ID NO: 328), GASDALIE (SEQ ID NO: 329), Kn032 (SEQ ID NO: 330), H1032 (SEQ ID NO: 331), Kn037 (SEQ ID NO: 331), Kn037 (SEQ ID NO: 330). NO: 332), H1036 (SEQ ID NO: 333), G4d (SEQ ID NO: 334).

Таблица 44. Полученные варианты Fc-области и введенные модификации

Антитело	Тяжелая цепь	SEQ ID NO:	Модификации, внедренные в CH2-домен G1d	Модификации, внедренные в CH3-домен G1d
EGL-G1d	H240-G1d	279		
EGL-ART1	H240-Kn125	280	L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A	Y349C/T366W

Антигено	Тяжелая цепь	SEQ ID NO:	Модификации, внедренные в CH2-домен G1d	Модификации, внедренные в CH3-домен G1d
	H240-H1076	28 1	D270E/K326D/A330M/K334E	D356C/T366S/L368A/Y407V
EGL-ART2	H240-Kn120	28 3	L234Y/L235Y/G236W/S239M/H268D/S298A/A327D	Y349C/T366W
	H240-H1068	28 4	D270E/K326D/A330K/K334E	D356C/T366S/L368A/Y407V
EGL-ART3	H240-Kn443	28 5	L234F/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A/K326D	Y349C/T366W
	H240-H1408	28 6	G236A/D270E/S298A/K326D/ K334E	D356C/T366S/L368A/Y407V
EGL-ART4	H240-Kn456	28 7	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/A330M/I332E/	Y349C/T366W
	H240-H1446	28 8	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/A330M/I332E/K334E	D356C/T366S/L368A/Y407V
EGL-ART5	H240-Kn462	28 9	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K326D	Y349C/T366W
	H240-H1441	29 0	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/K334E	D356C/T366S/L368A/Y407V
EGL-ART6	H240-Kn462	29 1	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K326D	Y349C/T366W
	H240-H1445	29 2	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/A330K/I332D/K334E	D356C/T366S/L368A/Y407V
EGL-ART8	H240-Kn461	29 3	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/K326D/I332E	Y349C/T366W
	H240-H1443	29 4	G236A/T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/I332E/K334E	D356C/T366S/L368A/Y407V
EGL-ART10	H240-Kn494	29 5	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/I332E	Y349C/T366W
	H240-H1514	29 6	T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/I332E/K334E	D356C/T366S/L368A/Y407V
EGL-ART11	H240-Kn496	29 7	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P	Y349C/T366W
	H240-H1516	29 8	T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/K334E	D356C/T366S/L368A/Y407V
EGL-ART12	H240-Kn498	29 9	L234F/L235Q/G236W/S239M/T250V/H268D/D270E/S298A/T307P/A330M	Y349C/T366W
	H240-H1518	30 0	T250V/D270E/S298A/T307P/K326D/A330M/K334E	D356C/T366S/L368A/Y407V
EGL-GASDALIE	H240-GASDALIE	30 1	G236A/S239D/A330L/I332E	
EGL-SDALIE	H240Kn032	30 2	S239D/A330L/I332E	Y349C/T366W
	H240H1032	30 3	S239D/A330L/I332E	D356C/T366S/L368A/Y407V
EGL-GASDIE	H240-Kn037	30 4	G236A/S239D/I332E	Y349C/T366W
	H240-H1036	30 5	G236A/S239D/I332E	D356C/T366S/L368A/Y407V
EGL-afucosyl	H240-G1d	1		

Контрольный пример 8. Оценка связывания FcγR и вариантов Fc-области

Внеклеточные домены FcγR были получают методом, описанным в WO2014104165. Взаимодействие между продуцируемыми антителами и FcγR человека анализируют с использованием Biacore 8K+ по методу, указанному ниже. В качестве рабочего буфера используют 50 mM Na-фосфат, 150 mM NaCl и 0,05% Tween20 (pH 7,4), измерения проводят при 25°C. В качестве сенсорного чипа используют чип Series S SA (фирма GE Healthcare), на котором иммобилизован конъюгат биотина CaptureSelect Human Fab-kappa Kinetics (фирма Thermo Fisher Scientific). Исследуемое антитело захватывается на этом чипе, и каждому FcγR, разведенному рабочим буфером, позволено взаимодействовать с ним. Чип регенерируют с использованием 10 mM глицин-HCl (pH 1,5) и повторно используют для захвата антител и проведения измерений. Константы диссоциации  $K_D$  (моль/л) каждого антитела для FcγR рассчитывают с использованием программного обеспечения Biacore Insight Evaluation Software с применением стационарной модели аффинности для константы диссоциации для FcγRIIb и модели связывания Ленгмюра 1:1 для констант диссоциации для других FcγR (табл. 45).

Таблица 45. Измерение связывания между продуцируемыми вариантами и FcγR человека

Константные области	Антитела	K <sub>D</sub> (M) для hFcγR						Относительное значение KD между G1d и hFcγR						Соотношение A/I (K <sub>D</sub> для FcγRIIb, поделенное на K <sub>D</sub> для каждого FcγR)			
		hFcγR Ia	hFcγR IIa H	hFcγR IIaR	hFcγR IIb	hFcγR IIIa F	hFcγR IIIa V	hFcγR Ia	hFcγR IIa H	hFcγR IIaR	hFcγR IIb	hFcγR IIIa F	hFcγR IIIa V	hFcγR IIa H	hFcγR IIaR	hFcγR IIIa F	hFcγR IIIa V
G1d	H240-G1d/L73-k0	9,01E-11	1,12E-06	1,66E-06	1,01E-05	2,96E-06	3,58E-07	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	8,9	6,1	3,4	28,1
ART1	H240-Kn125/L73-k0// H240-HI076/L73-k0	3,02E-11	2,64E-07	1,01E-06	1,25E-05	2,53E-09	1,11E-09	3,0	4,3	1,6	0,8	1170,2	322,8	47,4	12,4	4947,2	11261,3
ART2	H240-Kn120/L73-k0// H240-HI068/L73-k0	2,64E-11	7,64E-08	3,38E-08	4,40E-07	6,43E-09	1,67E-09	3,4	14,7	49,0	22,8	459,6	214,6	5,8	13,0	68,4	263,7
ART3	H240-Kn443/L73-k0// H240-HI408/L73-k0	1,72E-10	3,50E-08	1,21E-07	6,33E-06	1,60E-08	3,16E-09	0,5	32,1	13,7	1,6	185,2	113,5	180,7	52,4	396,1	2003,7
ART4	H240-Kn456/L73-k0// H240-HI446/L73-k0	3,05E-11	1,79E-07	5,18E-07	1,17E-05	1,17E-09	7,75E-10	2,9	6,3	3,2	0,9	2519,9	462,2	65,2	22,5	9943,2	15047,3
ART5	H240-Kn462/L73-k0// H240-HI441/L73-k0	1,69E-10	3,32E-08	1,60E-07	7,96E-06	2,00E-08	3,86E-09	0,5	33,9	10,4	1,3	148,1	92,9	240,1	49,9	398,8	2064,8
ART6	H240-Kn462/L73-k0// H240-HI445/L73-k0	7,37E-11	9,52E-09	6,89E-08	2,92E-06	3,00E-09	1,11E-09	1,2	118,0	24,1	3,4	986,7	321,9	307,0	42,4	975,5	2625,7
ART8	H240-Kn461/L73-k0// H240-HI443/L73-k0	2,08E-11	7,49E-08	1,26E-07	3,53E-06	1,50E-09	5,16E-10	3,2	15,0	13,2	2,8	1966,7	694,9	47,2	28,1	2350,3	6852,0
ART10	H240-Kn494/L73-k0// H240-HI514/L73-k0	2,67E-11	4,20E-07	1,10E-06	7,25E-06	2,29E-09	6,34E-10	3,4	2,7	1,5	1,4	1289,2	565,5	17,3	6,6	3159,9	11436,1
ART11	H240-Kn496/L73-k0// H240-HI516/L73-k0	3,81E-11	2,31E-07	1,27E-06	1,46E-05	2,10E-08	3,67E-09	2,4	4,9	1,3	0,7	140,6	97,5	63,3	11,5	694,1	3974,6
ART12	H240-Kn498/L73-k0// H240-HI518/L73-k0	2,61E-11	3,66E-07	1,72E-06	2,21E-05	5,12E-09	2,27E-09	3,4	3,1	1,0	0,5	577,5	157,9	60,3	12,8	4309,9	9721,0
GASDA-LIE	H240-GASDALIE/ L73-k0	4,23E-12	1,62E-07	1,61E-07	2,67E-06	2,98E-08	1,52E-08	21,3	6,9	10,3	3,8	99,1	23,6	16,5	16,5	89,3	175,7
SDALIE	H240-Kn032/L73-k0 H240-HI032/L73-k0	1,66E-12	1,18E-06	9,35E-07	2,59E-06	2,62E-08	9,73E-09	54,3	1,0	1,8	3,9	112,7	36,8	2,2	2,8	98,7	266,1
GASDIE	H240-Kn037/L73-k0// H240-HI036/L73-k0	1,45E-11	6,86E-08	6,70E-08	1,25E-06	6,61E-08	2,38E-08	6,2	16,4	24,7	8,0	44,7	15,1	18,2	18,6	18,9	52,6
Afucosyl glycomab	H240-G1d/L73-k_	6,51E-11	9,99E-07	9,46E-07	5,65E-06	1,23E-07	1,90E-08	1,4	1,1	1,8	1,8	24,0	18,9	5,7	6,0	46,0	298,1

В таблице «Относительное значение  $K_D$  между G1d и hFcγR» представляет собой значение, полученное путем деления значения  $K_D$  G1d для каждого FcγR на значение  $K_D$  каждого антитела для каждого FcγR, указывающее, насколько

5 каждое антитело было усилено по сравнению с G1d. «Отношение A/I» представляет собой значение, полученное путем деления  $K_D$  каждого антитела для FcγRIIb на  $K_D$  для каждого FcγR, указывающее, насколько избирательно усиливается связывание с активирующими FcγR по сравнению со связыванием с ингибирующим FcγR.

10 ART3, ART4, ART5, ART6, ART8, ART10, ART11 и ART12, полученные в настоящем изобретении, улучшены по сравнению с G1d для FcγRIIIaF и FcγRIIIaV. Эти варианты также более усиленные, чем существующие симметрично модифицированные антитела, усиленные FcγR, GASDALIE, SDALIE, GASDIE и антитело Afucosyl как для FcγRIIIaF, так и для FcγRIIIaV.

15 Более того, связывание FcγRIIIaF ART4 (в 2519,9 раз), ART6 (в 986,7 раз), ART8 (в 1966,7 раз), ART10 (в 1289,2 раза) и ART12 (в 577,5 раз) более усиленное, чем у ART2 (в 459,6 раза), что описано в WO2014104165. Более того, связывание FcγRIIIaF ART4, ART8 и ART10 более усиленное даже по сравнению с ART1 (в 1170,2 раза), которое сильнее связывается с FcγRIIIaF, чем ART2. Аналогичным

20 образом, для FcγRIIIaV связывание ART4 (в 462,2 раза), ART6 (в 321,9 раза), ART8 (в 694,9 раза) и ART10 (в 565,5 раз) более усиленное, чем у ART2 (в 214,6 раза), а связывание ART4, ART8 и ART10 более эффективны даже по сравнению с ART1 (в 322,8 раза). Связывание ART6 с FcγRIIIaV сопоставимо со связыванием ART1.

25 ART3 (в 32,1 раза), ART4 (в 6,3 раза), ART5 (в 33,9 раза), ART6 (в 118,0 раза), ART8 (в 15,0 раза), ART10 (в 2,7 раза), ART11 (в 4,9 раза) и ART12 (в 3,1 раза) все усилены по сравнению с G1d в отношении FcγRIIIaH. В частности, ART3, ART5, ART6 и ART8 более усилены даже по сравнению с ART2 (в 14,7 раз), антителом, усиленным FcγRIIIa, с асимметрично модифицированными

30 доменами CH2, как описано в WO2014104165. Более того, ART3, ART5 и ART6 более усилены даже по сравнению с существующим симметрично модифицированным антителом GASDIE, усиленным FcγRIIIa (в 16,4 раза), и поэтому ожидается, что они будут демонстрировать более сильную активность ADCP, чем любые существующие варианты. Для связывания с FcγRIIIaR все

ART3 (в 13,7 раза), ART4 (в 3,2 раза), ART5 (в 10,4 раза), ART6 (в 24,1 раза), ART8 (в 13,2 раза), ART10 (в 1,5 раза) и ART11 (в 1,3 раза) усилены по сравнению с G1d, но существующие варианты GASDIE (в 24,7 раза) и ART2 (в 49,0 раза) усилены больше, чем перечисленные варианты. Однако в настоящем изобретении следует отметить селективность активации FcγR. Поскольку ингибирующий рецептор FcγRIIb индуцирует внутриклеточные сигналы, которые подавляют иммунные ответы в отличие от активации FcγR, ожидается, что он будет ингибировать сигналы активации FcγR. Фактически сообщалось, что противоопухолевые эффекты антител усиливаются у мышей с нокаутом по FcγRIIb (*Nature Medicine* 2000, 6, 443-436). Кроме того, наблюдают корреляцию между противоопухолевыми эффектами и соотношениями связывания с активирующим FcγR и ингибирующим FcγR (соотношение A/I) в каждом подклассе IgG мыши (*Science* 2005, 310, 1510-1512). Таким образом, для реализации более сильных эффекторных функций может потребоваться антитело с усиленным связыванием с активирующими FcγR и сниженным связыванием с FcγRIIb. Однако высокая гомология последовательностей FcγRIIaR с FcγRIIb затрудняет обеспечение селективности, и действительно трудно утверждать, что ранее описанные варианты обладают превосходной селективностью. Было показано, что новые варианты, полученные по настоящему изобретению, ART10 (соотношение A/I: 6,6), ART11 (соотношение A/I: 11,5), ART12 (соотношение A/I: 12,8), ART4 (соотношение A/I: 12,8), ART4 (соотношение A/I: 22,5), ART8 (соотношение A/I: 28,1), ART6 (соотношение A/I: 42,4), ART5 (соотношение A/I: 49,9) и ART3 (соотношение A/I: 52,4) превосходили G1d (Соотношение A/I: 6,1) с точки зрения соотношения A/I для FcγRIIaR, и среди них ART4, ART8, ART6, ART5 и ART3 превосходили ART2 (соотношение A/I: 13,0) и GASDIE (A/I соотношение: 18,6). Аналогичным образом, с точки зрения соотношения A/I для FcγRIIaH, ART10 (соотношение A/I: 17,3), ART8 (соотношение A/I: 47,2), ART12 (соотношение A/I: 60,3), ART11 (соотношение A/I: 60,3), ART11 (соотношение A/I: 63,3), ART4 (соотношение A/I: 65,2), ART3 (соотношение A/I: 180,7), ART5 (соотношение A/I: 240,1) и ART6 (соотношение A/I: 307,0) превосходили G1d (A/I соотношение: 8,9), и среди них ART8, ART12, ART11, ART4, ART3, ART5 и ART6 показали лучшие соотношения A/I, чем ART2 (соотношение A/I: 5,8) и GASDIE (соотношение A/I: 18,2). Из приведенных выше результатов можно сказать, что ART4, ART8, ART3, ART5 и ART6 представляют собой антитела,



которые имеют лучшие соотношения A/I, чем существующие антитела, усиленные FcγRIIIaR. Кроме того, можно сказать, что ART3, ART5 и ART6 представляют собой антитела, которые обладают лучшей связывающей способностью и соотношением A/I, чем существующие антитела, усиленные FcγRIIIaH.

Для FcγRIIIaF соотношение A/I ART3 (соотношение A/I: 396,1), ART5 (соотношение A/I: 398,8), ART11 (соотношение A/I: 694,1), ART6 (соотношение A/I: 975,5), ART8 (соотношение A/I: 2350,3), ART10 (соотношение A/I: 3159,9), ART12 (соотношение A/I: 4309,9) и ART4 (соотношение A/I: 9943,2) превосходят таковые у G1d (соотношение A/I: 3,4). Среди них ART4 показал лучшее соотношение A/I, чем ART1 (соотношение A/I: 4947,2), специфичный для FcγRIIIa улучшенный вариант, описанный в WO2014104165. Аналогичным образом, для FcγRIIIaV соотношения A/I для ART3 (соотношение A/I: 2003,7), ART5 (соотношение A/I: 2064,8), ART6 (соотношение A/I: 2625,7), ART11 (соотношение A/I: 3974,6), ART8 (соотношение A/I: 6852,0), ART12 (соотношение A/I: 9721,0), ART10 (соотношение A/I: 11436,1) и ART4 (соотношение A/I: 15047,3) все были лучше, чем у G1d (A Соотношение /I: 28,1) и существующий улучшенный вариант Афукозил (соотношение A/I: 298,1). Среди них ART4 и ART10 показывают лучшие соотношения A/I, чем ART1 (соотношение A/I: 11261,3), специфичный для FcγRIIIa усиленный вариант, описанный в WO2014104165. Из приведенных выше результатов можно сказать, что ART4 представляет собой антитело, которое имеет более превосходную связывающую способность и соотношение A/I как для FcγRIIIaF, так и для FcγRIIIaV по сравнению с существующим улучшенным антителом ART1.

Контрольный пример 9. Оценка антител, содержащих модифицированные Fc-области, с помощью биоанализа репортера ADCC

Пример 9-1. Получение клеток, экспрессирующих эписрегулин человека (Hera1-6/hEREG)

Линия клеток гепатомы грызунов Hera1-6 приобретена в Американской коллекции типовых культур (ATCC). Ген EREG человека (hEREG) вводят в клетки путем трансфекции и отбирают конститутивно экспрессирующие клоны. Ген hEREG отбирают с помощью зеоцина. Клетки Hera1-6/hEREG поддерживают и пассируют в среде D-MEM (с высоким содержанием глюкозы) (фирма SIGMA), содержащей 10% FBS (фирма SIGMA) и 400 мкг/мл зеоцина.

Пример 9-2. Биоанализ по оценка репортера ADCC

Для измерения активности ADCC *in vitro* используют hFcγRIIIaV ADCC Reporter Bioassay, эффекторные клетки, модель распространения (фирма Promega). В качестве клеток-мишеней в каждую лунку 384-луночного планшета добавляют 10 мкл клеток Heral-6/hEREG, доведенных до концентрации  $5 \times 10^5$  клеток/мл с помощью культуральной среды. В качестве среды используют аналитический буфер (96% RPMI, 4% FBS). Затем антитела, полученные в контрольном примере 7, и EGL-G4d (тяжелая цепь SEQ ID NO: 306, легкая цепь SEQ ID NO: 282) в качестве отрицательного контроля, который имеет последовательность IgG4 человека, каждое разбавляют буфером для анализа для получения 11 серийных разведений при общем коэффициенте 10, начиная с конечной концентрации 1 мкг/мл, а затем добавляют по 10 мкл каждого. В конце в качестве раствора эффекторных клеток добавляют 10 мкл hFcγRIIIaV-экспрессирующих клеток Jurkat, доведенных до концентрации  $3 \times 10^6$  клеток/мл с помощью среды, и в общей сложности смешивают 30 мкл. Смеси оставляют в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в течение ночи. Затем планшет оставляют при комнатной температуре в течение 15 мин и в каждую лунку добавляют по 30 мкл реагента Bio-Glo. В качестве реагента Bio-Glo используют систему анализа люциферазы Bio-Glo (буфер и субстрат). Впоследствии люминесценцию каждой лунки измеряют с помощью планшет-ридера.

Значение кратной индукции определяют путем деления значения люминесценции каждой лунки на значение люминесценции лунки без добавления антитела и используют в качестве индекса для оценки ADCC каждого антитела. Полученные результаты показаны на фиг. 50. Значение EC50 для каждого образца рассчитано с использованием JMP 11.2.1 (SAS Institute Inc.) и показано в табл. 46.

Таблица 46. Значение EC50 hFcγRIIIaV-опосредованной индукционной активности репортерного гена каждого модифицированного Fc-содержащего антитела

Сокращенное обозначение антитела	Величина EC50 (мкг/мл)
EGL-G1d	4,63E-02
EGL-ART1	7,16E-04
EGL-ART2	1,35E-03
EGL-ART3	1,53E-03
EGL-ART4	7,89E-04

Сокращенное обозначение антитела	Величина EC50 (мкг/мл)
EGL-ART5	1,67E-03
EGL-ART6	1,50E-03
EGL-ART8	1,07E-03
EGL-ART10	1,07E-04
EGL-ART11	4,13E-04
EGL-ART12	3,04E-04
EGL-GASDALIE	2,08E-03
EGL-SDALIE	1,78E-03
EGL-GASDIE	3,70E-03
EGL-G4d	N/A
EGL-афукозил	5.16E-03

Эти результаты показывают, что антитела с модифицированным Fc, полученные в этот раз, проявляют более сильную активность по индукции репортерного гена против клеток Hera1-6/hEREG, чем константная область IgG1 человека дикого типа. Результаты табл. 36 также показывают, что все эти варианты проявляли активность при более низких концентрациях, чем варианты с симметрично сконструированными доменами CH2 и антителами с низким содержанием фукозы, продуцируемыми модификацией сахарной цепи. Было показано, что среди вариантов, произведенных на этот раз, ART3, ART4, ART5, ART6, ART8, ART10, ART11 и ART12 обладают активностью примерно в той же или более низкой концентрации, чем ART2. В частности, ART4, ART10, ART11 и ART12 проявляли активность при более низких концентрациях даже по сравнению с ART1, который имеет более усиленное связывание hFcγRIIIaV, чем ART2.

15 Контрольный пример 10. Оценка антител, имеющих модифицированные области Fc, с помощью биоанализа репортера ADCP

Для измерения активности ADCP *in vitro* используют hFcγRIIIaH ADCP Reporter Bioassay, Core Kit (фирма Promega). В качестве клеток-мишеней в каждую лунку 384-луночного планшета добавляют 10 мкл клеток Hera1-6/hEREG, доведенных до концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл с помощью культуральной среды. В качестве культуральной среды используют аналитический буфер (96% RPMI, 4% ФСБ). Затем каждое антитело, полученное в контрольном примере 7, разводят буфером для анализа до конечных концентраций 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 и 10 мкг/мл, после чего добавляют по 10 мкл каждого. В итоге, в качестве суспензии эффекторных клеток добавляют 10 мкл

клеток Jurkat, экспрессирующих hFcγRIIaH, прилагаемых к набору, и в общей сложности смешивают 30 мкл. Затем смеси оставляют стоять в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в течение 6 ч. Плотность клеток Jurkat, экспрессирующих hFcγRIIaH, составляет  $9,68 \times 10^5$  клеток/мл. Затем планшеты оставляют при комнатной температуре на 15 мин и в каждую лунку добавляют по 30 мкл реагента Bio-Glo. В качестве реагента Bio-Glo используют систему анализа люциферазы Bio-Glo (буфер и субстрат). Затем люминесценцию в каждой лунке измеряют с помощью планшет-ридера. Значение кратной индукции определяют путем деления значения люминесценции в каждой лунке на значение люминесценции в лунке без добавления антитела и используют в качестве индекса для оценки ADCP каждого антитела. Полученные результаты показаны на фиг. 51. Значение EC50 для каждого образца рассчитывают с использованием JMP 11.2.1 (SAS Institute Inc.), значения представлены в табл. 47.

Таблица 47. Значение EC50 hFcγRIIaH-опосредованной индукционной активности репортерного гена каждого модифицированного Fc-содержащего антитела

Сокращенное обозначение антитела	Величина EC50 (мкг/мл)
EGL-G1d	N/A
EGL-ART1	3,53E-02
EGL-ART2	2,18E-02
EGL-ART3	1,58E-02
EGL-ART4	4,32E-02
EGL-ART5	2,45E-02
EGL-ART6	1,92E-02
EGL-ART8	1,71E-02
EGL-ART10	4,19E-02
EGL-ART11	3,67E-02
EGL-ART12	8,50E-02
EGL-GASDALIE	3,24E-02
EGL-SDALIE	N/A
EGL-GASDIE	1,49E-02
EGL-G4d	N/A
EGL-афукозил	N/A

Эти результаты показывают, что продуцируемые антитела с модификацией Fc, на этот раз, проявляют более сильную активность по индукции репортерного гена против клеток Hera1-6/hEREG, чем константная область IgG1 человека дикого типа. Результаты в табл. 47 также показывают, что они проявляли активность при более низких концентрациях, чем варианты с симметрично

сконструированными доменами CH2 и антителами с низким содержанием фукозы, продуцируемыми модификацией сахарной цепи. Более того, среди вариантов, полученных на этот раз, показано, что ART2, ART3, ART5, ART6 и ART8 обладают активностью в более низкой концентрации, чем ART1. В частности, ART3, ART6 и ART8 проявляют активность при более низких концентрациях даже по сравнению с ART2, который имеет повышенное связывание hFcγRIIaH.

Контрольный пример 11. Оценка противоопухолевого эффекта антител, имеющих модифицированные Fc-области, на модели трансплантации сингенных опухолевых клеток с использованием трансгенных мышей с FcγR человека

Пример 11-1. Линия клеток

Клетки Hera1-6/hEREG, полученные в контрольном примере 9-1, сохраняют и пассируют в среде D-MEM (с высоким содержанием глюкозы) (фирма SIGMA), содержащей 10% FBS (фирма SIGMA) и 400 мкг/мл зеоцина.

Пример 11-2. Получение мышинной модели трансплантата сингенной линии опухоли

Для теста на эффективность используют трансгенных мышей по FcγR человека (*Proc Natl Acad Sci USA* 2012, 109, 6181-6186). Мышам-самцам в возрасте 16 недель внутрибрюшинно вводят анти-асиало GM1 антитело (aGM1, WAKO) в дозе 100 мкл/животное, чтобы улучшить скорость приживания клеток. На следующий день после введения aGM1 подкожно вводят клеточную суспензию, в которой клетки Hera1-6/hEREG и матригель (фирма CORNING) смешаны в соотношении 1:1, для трансплантации  $1 \times 10^7$  клеток. Модель рассматривают как сформировавшуюся, когда средний объем пересаженной опухоли достигает примерно 300–500 мм<sup>3</sup>. Объем пересаженной опухоли рассчитывали по следующей формуле:

Объем опухоли = большой диаметр × короткий диаметр × короткий диаметр / 2

Пример 11-3. Подготовка агентов к введению

Ожидалось, что EGL-ART6, полученный в настоящем изобретении, обладает наиболее мощной противоопухолевой активностью с учетом результатов соотношения A/I в контрольном примере 8 и силы индукционной активности репортерного гена в контрольных примерах 9 и 10. Таким образом, агентами для введения в модель трансплантата клеток Hera1-6/hEREG являются

контрольное антитело против hEREG (EGL-G1d) и антитела против hEREG, имеющие Fc с усиленным связыванием Fc $\gamma$ R (EGL-афукозил и EGL-ART6), полученные одним и тем же способом, описанным в контрольном примере 7, каждое из которых готовят в концентрации 1 мг/мл с использованием буфера His (150 mM NaCl, 20 mM буфера His-HCl, pH 6,0).

Пример 11-4. Введение агента для измерения противоопухолевого эффекта

Через 7 дней после трансплантации EGL-G1d, EGL-афукозил и EGL-ART6 вводят в дозе 10 мг/кг через хвостовую вену.

10 Подробная информация о лечении агентом при измерении противоопухолевого эффекта представлена в табл. 48.

Таблица 48. Измерение противоопухолевого эффекта на модели клеточного трансплантата Нера1-6/hEREG

Группа	Число животных	Агент	Доза	Способ введения	Дата введения
1	5	His-буфер	-	В хвостовую вену	Через 7 дней после трансплантации
2	5	EGL-G1d	10 мг/кг		
3	5	EGL- афукозил	10 мг/кг		
4	5	EGL-ART6	10 мг/кг		

Пример 11-5. Оценка противоопухолевого эффекта

15 Противоопухолевый эффект оценивают по объему опухоли, рассчитанному по формуле, приведенной в примере 11-2.

Значения TGI (tumor growth inhibition – ингибирование роста опухоли) рассчитывают по следующей формуле:

20 
$$TGI = (1 - (\text{Средний объем опухоли исследуемой группы на момент измерения} - \text{Средний объем опухоли до введения антител}) / (\text{Средний объем опухоли контрольной группы на момент измерения} - \text{Средний объем опухоли до введения антител})) \times 100$$

25 В результате оба антитела, с усиленным связыванием Fc $\gamma$ R, EGL-афукозил и EGL-ART6, введенные в дозе 10 мг/кг, показывают эффективность TGI=80 или выше на 19 день после введения. С другой стороны, контрольное антитело EGL-G1d показало TGI=31 (фиг. 52). Это подтверждает, что противоопухолевый эффект EGL-ART6, полученный по настоящему изобретению, *in vivo* также усиливается по сравнению с EGL-афукозил, как и ожидалось.

30 Контрольный пример 12. Оценка C1q-связывающей активности антител с модифицированными Fc-областями

Хотя сообщалось, что активность CDC антител способствует противоопухолевым эффектам (*Nat. Immunol.*, 2017, 18, 889), известно, что она вызывает побочные эффекты, обусловленные активностью CDC, что представлено инфузионной реакцией (*J. Immunol* 2008, 180, 2294-2298 и *Br. J. Haematol.* 2001, 115, 807-811). Поэтому даже при разработке фармацевтических препаратов на основе антител с повышенной активностью ADCC и активностью ADCP предпочтительно, чтобы степень активности CDC можно было выбирать в зависимости от подвергаемого лечению заболевания. Взаимодействие между комплементом и Fc опосредовано C1q. Согласно сообщениям об анализе взаимодействия между C1q и Fc (*Science*, 2018, 359, 794-797 и *Molecular Immunology* 2012, 51, 66-72), сайты взаимодействия Fc $\gamma$ R и C1q в Fc-области, по-видимому, частично перекрываются. В этих статьях сообщается, что остатки в позициях нумерации ЕС 329, 330 и 331 на Fc важны для взаимодействия с C1q, и, кроме того, остатки в позициях нумерации ЕС 268, 270 и 298 также способствуют связыванию с C1q. Эти положения и окружающие их остатки модифицированы в настоящем изобретении для усиления связывания Fc $\gamma$ R. Следовательно, полученные варианты Fc-области, вероятно, также будут иметь повышенное или пониженное связывание с C1q, и, следовательно, можно будет контролировать активность CDC при разработке фармацевтических препаратов на основе антител. Соответственно, оценивают связывание полученных вариантов Fc-области с C1q.

Антитела против эпирегулина человека, полученные в контрольных примерах 7 и 9, анализируют методом ELISA. Кроме того, при необходимости готовят буферы, показанные в табл. 49. В качестве антигена используют белок C1q человека (hC1q).

Таблица 49. Состав буферов, используемых в анализе C1q человека методом ELISA

Буфер	Состав
Буфер для блокирования/ разведения	TBS, 0,1% Tween20, 0,5% БСА, 1 × блокирующий порошок
Буфер для промывки	PBST, pH 7,4
Стоп-буфер	0,5 моль/л серной кислоты

Сначала на 96-луночный планшет maxisorp (фирма Thermo Fisher) на ночь при 4°C наносят 50 мкл растворов, содержащих каждое антитело,

приготовленное в концентрации 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 и 0,03 мкг/мл в PBS. Каждую лунку планшета промывают буфером промывки для промывки для удаления антитела, не связавшегося с планшетом, а затем лунки блокируют 200 мкл буфера для блокирования/разведения при комнатной температуре в течение 2 ч или дольше. После удаления буфера для блокирования/разведения из каждой лунки, раствор hC1q (фирма Calbiochem), приготовленный таким образом, чтобы конечная концентрация составляла 3 мкг/мл, добавляют в буфер для блокирования/разведения по 50 мкл на лунку. Затем планшет оставляют при комнатной температуре на 1 ч, чтобы позволить hC1q связаться с антителом в каждой лунке. После промывания буфером для промывки в каждую лунку добавляют 50 мкл конъюгированного с HRP анти-hC1q антитела (фирма AbDSerotec), разведенного буфером для блокирования/разведения, и планшет инкубируют в течение 1 ч. После промывки буфером для промывки добавляют только раствор ТМВ (фирма Invitrogen). Реакцию развития окраски раствора в каждой лунке останавливают добавлением стоп-буфера, а затем развивавшуюся окраску измеряют по поглощению при 450 нм и 690 нм. Состав используемых буферов показаны в табл. 49. Результаты измерений показаны на фиг. 53 и фиг. 54.

Как показано на фиг. 53 и фиг. 54, среди рассмотренных вариантов ART3, ART5 и ART11 имеют повышенную способность связывания C1q по сравнению с G1d. Связывающая способность афукозила и ART8 сопоставима со способностью G1d. Кроме того, связывание C1q ART1, ART2, ART4, ART6, ART10, ART12, GASDALIE, SDALIE и GASDIE снижено по сравнению с G1d. Из них способность связывания C1q ART1, ART2, ART4, ART6, ART12, GASDALIE, SDALIE и GASDIE снижена до того же уровня, что и у G4d, который имеет последовательность IgG4 человека. Поскольку считают, что IgG4 человека обладает низкой активностью CDC (*J. Immunol. Methods* 2005, 306, 151-160), эти варианты, связывание которых с C1q снижено до того же уровня, что и у G4d, будут иметь небольшую активность CDC как IgG4. Общие модификации аминокислот, общие для этих вариантов со значительно сниженным связыванием C1q, включают модификацию Ala330 или модификацию Ile332. Эти области, в частности Ala330, являются очень важными областями для взаимодействия с C1q. Это позволяет сделать вывод, что именно модификация, введенная в этот сайт, значительно снижает связывание с C1q. С другой



5 стороны, ART3, ART5 и ART11, которые имеют усиленное связывание C1q по сравнению с G1d, не имеют модификации, введенной в положение 330 или 332, что позволяет предположить, что повышенное связывание обусловлено эффектом модификации S298A или модификации в положении 326, которая предположительно улучшает связывание с C1q (*Science*, 2018, 359, 794-797).

10 Хотя вышеупомянутые изобретения подробно описаны со ссылками на иллюстрации и примеры с целью содействия ясному пониманию, приведенное описание настоящего изобретения и примеры не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения. Описание всех патентных и научных публикаций, цитируемых в настоящем описании, прямо включены в настоящий документ посредством ссылки.

#### Промышленная применимость

15 Анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению и способы их применения могут быть использованы при разработке, производстве, обеспечении, применении и т.п. фармацевтических препаратов с небольшими побочными эффектами, поскольку антитела по настоящему изобретению обладают активностью, активирующей иммунные клетки, цитотоксической активностью и/или противоопухолевой активностью, оказывают слабое влияние на неопухолевые ткани, такие как здоровые ткани. Кроме того, полипептиды, 20 содержащие вариант Fc-области по настоящему изобретению, способы их получения и применения могут быть использованы при разработке, производстве, обеспечении, применении фармацевтических препаратов, которые обладают высокой активностью ADCC/ADCP и/или противоопухолевым действием за счет сильного связывания с активирующими FcγRIIa и FcγRIIIa и 25 снижения связывания с ингибирующим FcγRIIb.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИ

1. Анти-CTLA-4 антитело для применения в лечении опухоли, причем указанное анти-CTLA-4 антитело содержит:

5 (а) переменную область, обладающую CTLA-4-связывающей активностью, которая зависит от концентрации аденозинсодержащего соединения; и

(б) вариант Fc-области, содержащий несколько изменений аминокислотной последовательности в исходной Fc-области,

10 где исходная Fc-область состоит из двух полипептидных цепей и вариант Fc-области содержит изменения аминокислотной последовательности в следующих положениях:

(в) 234, 235, 236, 239, 268, 270, 298 и 330 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области; и

15 (г) положениях 270, 298, 326, 330 и 334 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

2. Анти-CTLA-4 антитело для применения по п. 1, в котором опухоль представляет собой солидную опухоль, в которую инфильтрированы регуляторные Т-клетки (Treg).

20 3. Анти-CTLA-4 антитело для применения по п.п. 1 или 2, в которых анти-CTLA-4 антитело смешивают и используют с одним или несколькими любыми фармацевтически приемлемыми носителями.

25 4. Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из п.п. 1-3, в которых анти-CTLA-4 антитело применяют в комбинации по крайней мере с одним дополнительным терапевтическим агентом.

30 5. Анти-CTLA-4 антитело для применения по п. 4, в котором дополнительный терапевтический агент представляет собой по крайней мере один из следующих терапевтических агентов: ингибитор иммунных контрольных точек, ингибитор EGFR, ингибитор HER2, химиотерапевтического агента.

6. Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из п.п. 1-5, в котором переменная область обладает по крайней мере одним признаком, выбранным из приведенных ниже подпунктов (а) – (и):

5 (а) связывающая активность в присутствии 100 мкМ аденозинсодержащего соединения больше в два раза или более чем в отсутствие аденозинсодержащего соединения;

(б) значение  $K_D$  в присутствии 100 мкМ аденозинсодержащего соединения составляет  $5 \times 10^{-7}$  М или меньше;

10 (в) значение  $K_D$  в отсутствие аденозинсодержащего соединения составляет  $1 \times 10^{-6}$  М или более;

(г) образование троичного комплекса с аденозинсодержащим соединением и CTLA-4;

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

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

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

20 (з) проявление цитотоксической активности в отношении CTLA-4-экспрессирующих клеток; и

(и) связывание с CTLA-4, происходящего от человека и мыши.

7. Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из п.п. 1-6, причем анти-

25 CTLA-4 антитело содержит: (а) HVR-H1 (SEQ ID NO: 223), содержащую

аминокислотную последовательность SX1TMN, где X1 означает H, A, R или K; (б)

HVR-H2 (SEQ ID NO: 224), содержащую аминокислотную последовательность

SISX1X2SX3YIYYAX4SVX5G, где X1 означает S или T, X2 означает R или Q, X3

означает G или H, X4 означает D, E или R и X5 означает K или R; и (в) HVR-H3 (SEQ

ID NO: 225), содержащую аминокислотную последовательность

30 YGX1REDMLWVFDY, где X1 означает K или A.

8. Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из п. 7, причем анти-CTLA-

4 антитело дополнительно содержит: (а) HVR-L1 (SEQ ID NO: 226), содержащую

аминокислотную последовательность X1GX2STX3VGDYX4X5VX6, где X1 означает T,

D, Q или E, X2 означает T или P, X3 означает D или G, X4 означает N или T, X5 означает Y или W и X6 означает S или H; (б) HVR-L2 (SEQ ID NO: 227), содержащую аминокислотную последовательность X1TX2X3KPX4, где X1 означает E, F или Y, X2 означает S или I, X3 означает K или S и X4 означает S, E или K; (в) HVR-L3 (SEQ ID NO: 228), содержащую аминокислотную последовательность X1TYAAPLGPX2, где X1 означает S или Q и X2 означает M или T.

9. Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из п.п. 1-8, причем анти-CTLA-4 антитело содержит: (а) последовательность VH, которая по меньшей мере на 95% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 83-86, 98 и 135-141; (б) последовательность VL, которая по меньшей мере на 95% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 88-95, 97, 99, 134 и 144-149; или (в) последовательность VH, содержащую любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 83-86, 98, 135-141, и последовательность VL, содержащую любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 88-95, 97, 99, 134, 144-149.

10. Анти-CTLA-4 антитело для применения по п. 9, причем анти-CTLA-4 антитело содержит:

- (1) последовательность VH SEQ ID NO: 98 и последовательность VL SEQ ID NO: 99;
- (2) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 88;
- (3) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 89;
- (4) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 90;
- (5) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 91;
- (6) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 92;
- (7) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 93;

- (8) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 94;
- (9) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;
- 5 (10) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 95;
- (11) последовательность VH SEQ ID NO: 84 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;
- (12) последовательность VH SEQ ID NO: 85 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;
- 10 (13) последовательность VH SEQ ID NO: 86 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;
- (14) последовательность VH SEQ ID NO: 86 и последовательность VL SEQ ID NO: 134;
- 15 (15) последовательность VH SEQ ID NO: 136 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;
- (16) последовательность VH SEQ ID NO: 135 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;
- (17) последовательность VH SEQ ID NO: 136 и последовательность VL SEQ ID NO: 95;
- 20 (18) последовательность VH SEQ ID NO: 137 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;
- (19) последовательность VH SEQ ID NO: 138 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;
- 25 (20) последовательность VH SEQ ID NO: 138 и последовательность VL SEQ ID NO: 144;
- (21) последовательность VH SEQ ID NO: 138 и последовательность VL SEQ ID NO: 145;
- (22) последовательность VH SEQ ID NO: 138 и последовательность VL SEQ ID NO: 146;
- 30 (23) последовательность VH SEQ ID NO: 139 и последовательность VL SEQ ID NO: 146;
- (24) последовательность VH SEQ ID NO: 140 и последовательность VL SEQ ID NO: 146;

(25) последовательность VH SEQ ID NO: 141 и последовательность VL SEQ ID NO: 146;

(26) последовательность VH SEQ ID NO: 140 и последовательность VL SEQ ID NO: 147;

5 (27) последовательность VH SEQ ID NO: 141 и последовательность VL SEQ ID NO: 147;

(28) последовательность VH SEQ ID NO: 140 и последовательность VL SEQ ID NO: 148;

10 (29) последовательность VH SEQ ID NO: 141 и последовательность VL SEQ ID NO: 148;

(30) последовательность VH SEQ ID NO: 136 и последовательность VL SEQ ID NO: 149;

(31) первую переменную область, включающую последовательность VH SEQ ID NO: 140 и последовательность VL SEQ ID NO: 146, и вторую переменную область, включающую последовательность VH SEQ ID NO: 141 и последовательность VL SEQ ID NO: 146; или

15 (32) первую переменную область, включающую последовательность VH SEQ ID NO: 140 и последовательность VL SEQ ID NO: 147, и вторую переменную область, включающую последовательность VH SEQ ID NO: 141 и последовательность VL SEQ ID NO: 147.

25 11. Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из п.п. 1-10, в котором вариант Fc-области дополнительно содержит изменения аминокислотной последовательности в положениях 250 и 307 по нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области.

30 12. Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из п.п. 1-11, в котором вариант Fc-области дополнительно содержит изменения аминокислотной последовательности в положениях 250 и 307 по нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

13. Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из п.п. 1-12, которое содержит константную область тяжелой цепи, содержащую вариант исходной Fc-области.

14. Анти-CTLA-4 антитело для применения по п. 13, в котором константная область тяжелой цепи содержит

- 5           (1) первый полипептид SEQ ID NO: 350 и второй полипептид SEQ ID NO: 351,  
или  
          (2) первый полипептид SEQ ID NO: 343 и второй полипептид SEQ ID NO: 344.

15. Анти-CTLA-4 антитело для применения в лечении опухоли, причем указанное анти-CTLA-4 антитело содержит:

- 10           (1) полипептид первой цепи H SEQ ID NO: 352, полипептид второй цепи H SEQ  
ID NO: 353 и полипептид цепи L SEQ ID NO: 161; или  
          (2) полипептид первой цепи H SEQ ID NO: 335, полипептид второй цепи H SEQ  
ID NO: 336 и полипептид цепи L SEQ ID NO: 161.

## РЕФЕРАТ

Настоящая заявка относится к анти-CTLA-4 антителам и способам получения и применения этих антител. В заявке также предусматривают  
5 нуклеиновые кислоты, кодирующие анти-CTLA-4 антитела, и клетки-хозяева, содержащие эти нуклеиновые кислоты. Кроме того, в настоящей заявке предусматривают полипептиды, содержащие вариант Fc-области, включающий изменения аминокислотной последовательности в исходной Fc-области, и способы получения и применения этих полипептидов.



## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИ

1. Анти-CTLA-4 антитело для применения в лечении опухоли, причем указанное анти-CTLA-4 антитело содержит:

5 (а) переменную область, обладающую CTLA-4-связывающей активностью, которая зависит от концентрации аденозинсодержащего соединения; и

(б) вариант Fc-области, содержащий несколько изменений аминокислотной последовательности в исходной Fc-области,

10 где исходная Fc-область состоит из двух полипептидных цепей и вариант Fc-области содержит изменения аминокислотной последовательности в следующих положениях:

(в) 234, 235, 236, 239, 268, 270, 298 и 330 согласно нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области; и

15 (г) положениях 270, 298, 326, 330 и 334 согласно нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

2. Анти-CTLA-4 антитело для применения по п. 1, в котором опухоль представляет собой солидную опухоль, в которую инфильтрированы регуляторные Т-клетки (Treg).

20 3. Анти-CTLA-4 антитело для применения по п.п. 1 или 2, в которых анти-CTLA-4 антитело смешивают и используют с одним или несколькими любыми фармацевтически приемлемыми носителями.

25 4. Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из п.п. 1-3, в которых анти-CTLA-4 антитело применяют в комбинации по крайней мере с одним дополнительным терапевтическим агентом.

30 5. Анти-CTLA-4 антитело для применения по п. 4, в котором дополнительный терапевтический агент представляет собой по крайней мере один из следующих терапевтических агентов: ингибитор иммунных контрольных точек, ингибитор EGFR, ингибитор HER2, химиотерапевтического агента.

6. Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из п.п. 1-5, в котором переменная область обладает по крайней мере одним признаком, выбранным из приведенных ниже подпунктов (а) – (и):

- 5 (а) связывающая активность в присутствии 100 мкМ аденозинсодержащего соединения больше в два раза или более чем в отсутствие аденозинсодержащего соединения;
- (б) значение  $K_D$  в присутствии 100 мкМ аденозинсодержащего соединения составляет  $5 \times 10^{-7}$  М или меньше;
- 10 (в) значение  $K_D$  в отсутствие аденозинсодержащего соединения составляет  $1 \times 10^{-6}$  М или более;
- (г) образование троичного комплекса с аденозинсодержащим соединением и CTLA-4;
- (д) связывание с областью от аминокислоты в положении 97 до аминокислоты в положении 106 CTLA-4 человека (внеклеточный домен, SEQ ID NO: 28);
- 15 (е) конкурирование с АВАМ004 (VH, SEQ ID NO: 10; и VL, SEQ ID NO: 11) за связывание с CTLA-4;
- (ж) связывание с тем же эпитопом, который связывается АВАМ004 (VH, SEQ ID NO: 10; и VL, SEQ ID NO: 11);
- (з) проявление цитотоксической активности в отношении CTLA-4-экспрессирующих клеток; и
- 20 (и) связывание с CTLA-4, происходящего от человека и мыши.

7. Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из п.п. 1-6, причем анти-CTLA-4 антитело содержит: (а) HVR-H1 (SEQ ID NO: 223), содержащую

25 аминокислотную последовательность SX1TMN, где X1 означает H, A, R или K; (б) HVR-H2 (SEQ ID NO: 224), содержащую аминокислотную последовательность SISX1X2SX3YIYYAX4SVX5G, где X1 означает S или T, X2 означает R или Q, X3 означает G или H, X4 означает D, E или R и X5 означает K или R; и (в) HVR-H3 (SEQ ID NO: 225), содержащую аминокислотную последовательность

30 YGX1REDMLWVFDY, где X1 означает K или A.

8. Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из п. 7, причем анти-CTLA-4 антитело дополнительно содержит: (а) HVR-L1 (SEQ ID NO: 226), содержащую аминокислотную последовательность X1GX2STX3VGDYX4X5VX6, где X1 означает T,

D, Q или E, X2 означает T или P, X3 означает D или G, X4 означает N или T, X5 означает Y или W и X6 означает S или H; (б) HVR-L2 (SEQ ID NO: 227), содержащую аминокислотную последовательность X1TX2X3KPX4, где X1 означает E, F или Y, X2 означает S или I, X3 означает K или S и X4 означает S, E или K; (в) HVR-L3 (SEQ ID NO: 228), содержащую аминокислотную последовательность X1TYAAPLGPX2, где X1 означает S или Q и X2 означает M или T.

9. Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из п.п. 1-8, причем анти-CTLA-4 антитело содержит: (а) последовательность VH, которая по меньшей мере на 95% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 83-86, 98 и 135-141; (б) последовательность VL, которая по меньшей мере на 95% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 88-95, 97, 99, 134 и 144-149; или (в) последовательность VH, содержащую любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 83-86, 98, 135-141, и последовательность VL, содержащую любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 88-95, 97, 99, 134, 144-149.

10. Анти-CTLA-4 антитело для применения по п. 9, причем анти-CTLA-4 антитело содержит:

- (1) последовательность VH SEQ ID NO: 98 и последовательность VL SEQ ID NO: 99;
- (2) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 88;
- (3) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 89;
- (4) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 90;
- (5) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 91;
- (6) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 92;
- (7) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 93;

- (8) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 94;
- (9) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;
- 5 (10) последовательность VH SEQ ID NO: 83 и последовательность VL SEQ ID NO: 95;
- (11) последовательность VH SEQ ID NO: 84 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;
- (12) последовательность VH SEQ ID NO: 85 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;
- 10 (13) последовательность VH SEQ ID NO: 86 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;
- (14) последовательность VH SEQ ID NO: 86 и последовательность VL SEQ ID NO: 134;
- 15 (15) последовательность VH SEQ ID NO: 136 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;
- (16) последовательность VH SEQ ID NO: 135 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;
- (17) последовательность VH SEQ ID NO: 136 и последовательность VL SEQ ID NO: 95;
- 20 (18) последовательность VH SEQ ID NO: 137 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;
- (19) последовательность VH SEQ ID NO: 138 и последовательность VL SEQ ID NO: 97;
- 25 (20) последовательность VH SEQ ID NO: 138 и последовательность VL SEQ ID NO: 144;
- (21) последовательность VH SEQ ID NO: 138 и последовательность VL SEQ ID NO: 145;
- (22) последовательность VH SEQ ID NO: 138 и последовательность VL SEQ ID NO: 146;
- 30 (23) последовательность VH SEQ ID NO: 139 и последовательность VL SEQ ID NO: 146;
- (24) последовательность VH SEQ ID NO: 140 и последовательность VL SEQ ID NO: 146;

(25) последовательность VH SEQ ID NO: 141 и последовательность VL SEQ ID NO: 146;

(26) последовательность VH SEQ ID NO: 140 и последовательность VL SEQ ID NO: 147;

5 (27) последовательность VH SEQ ID NO: 141 и последовательность VL SEQ ID NO: 147;

(28) последовательность VH SEQ ID NO: 140 и последовательность VL SEQ ID NO: 148;

10 (29) последовательность VH SEQ ID NO: 141 и последовательность VL SEQ ID NO: 148;

(30) последовательность VH SEQ ID NO: 136 и последовательность VL SEQ ID NO: 149;

(31) первую переменную область, включающую последовательность VH SEQ ID NO: 140 и последовательность VL SEQ ID NO: 146, и вторую переменную область, включающую последовательность VH SEQ ID NO: 141 и последовательность VL SEQ ID NO: 146; или

15 (32) первую переменную область, включающую последовательность VH SEQ ID NO: 140 и последовательность VL SEQ ID NO: 147, и вторую переменную область, включающую последовательность VH SEQ ID NO: 141 и последовательность VL SEQ ID NO: 147.

20 11. Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из п.п. 1-10, в котором вариант Fc-области дополнительно содержит изменения аминокислотной последовательности в положениях 250 и 307 по нумерации EU в первом полипептиде исходной Fc-области.

12. Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из п.п. 1-11, в котором вариант Fc-области дополнительно содержит изменения аминокислотной последовательности в положениях 250 и 307 по нумерации EU во втором полипептиде исходной Fc-области.

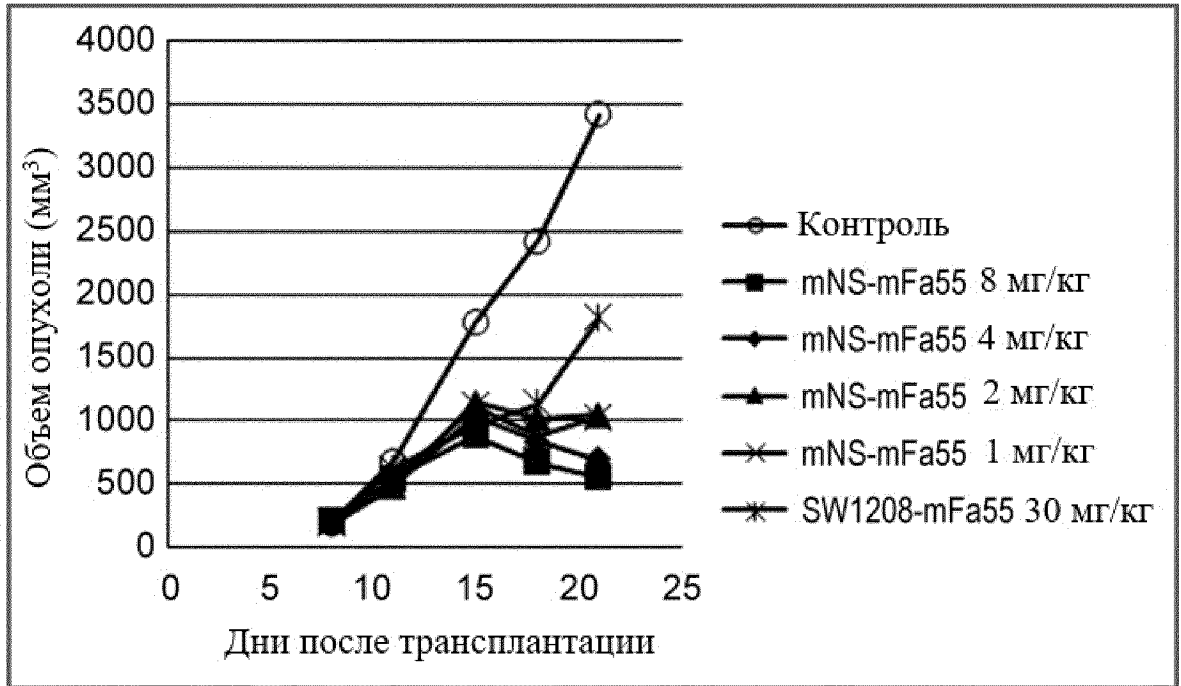
30 13. Анти-CTLA-4 антитело для применения по любому из п.п. 1-12, которое содержит константную область тяжелой цепи, содержащую вариант исходной Fc-области.

14. Анти-CTLA-4 антитело для применения по п. 13, в котором константная область тяжелой цепи содержит

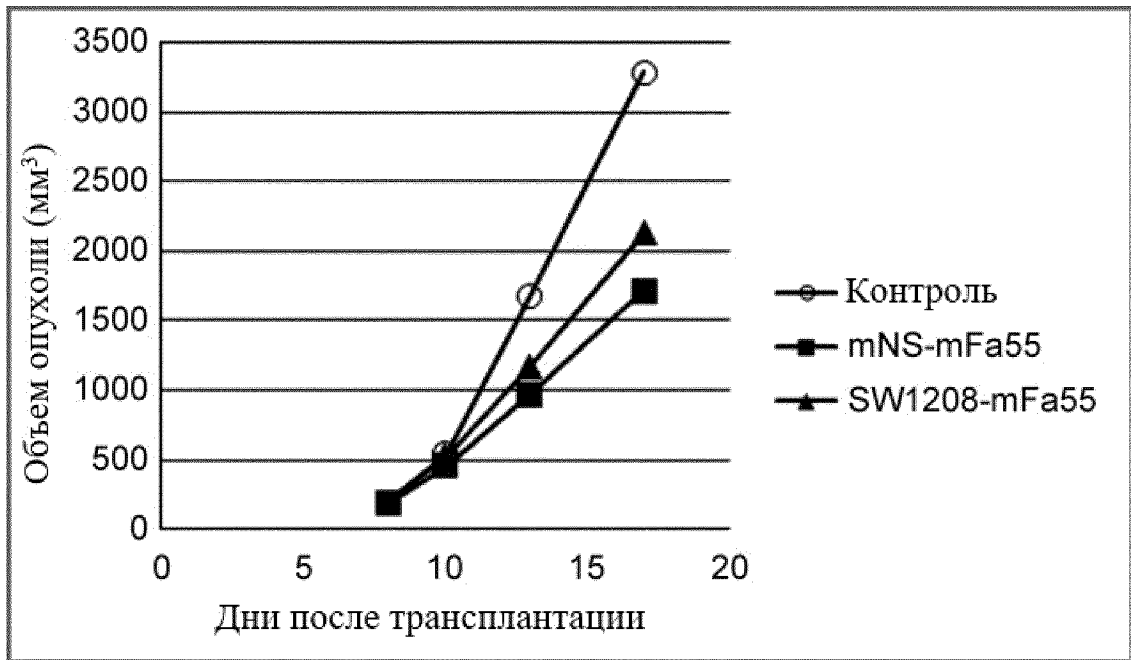
- 5           (1) первый полипептид SEQ ID NO: 350 и второй полипептид SEQ ID NO: 351,  
или  
          (2) первый полипептид SEQ ID NO: 343 и второй полипептид SEQ ID NO: 344.

15. Анти-CTLA-4 антитело для применения в лечении опухоли, причем указанное анти-CTLA-4 антитело содержит:

- 10           (1) полипептид первой цепи H SEQ ID NO: 352, полипептид второй цепи H SEQ  
ID NO: 353 и полипептид цепи L SEQ ID NO: 161; или  
          (2) полипептид первой цепи H SEQ ID NO: 335, полипептид второй цепи H SEQ  
ID NO: 336 и полипептид цепи L SEQ ID NO: 161.

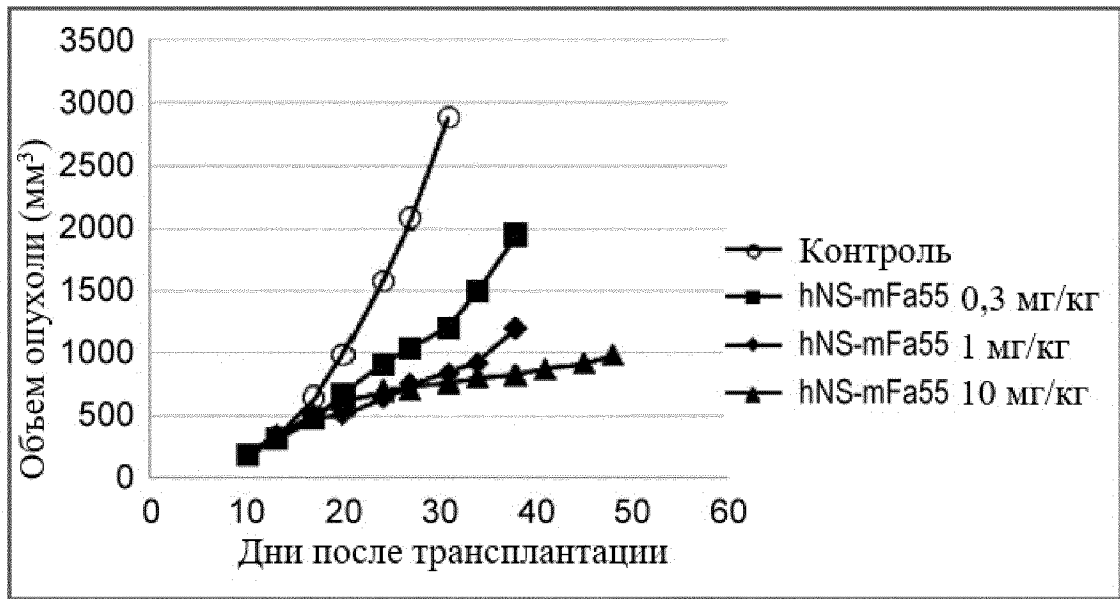


Фигура 1

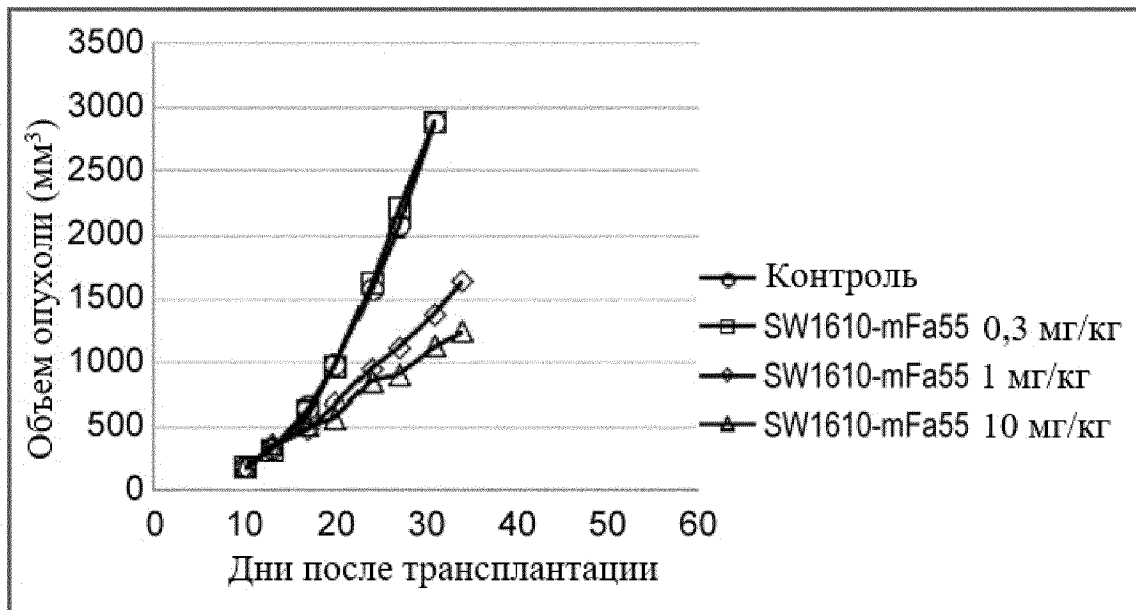


Фигура 2

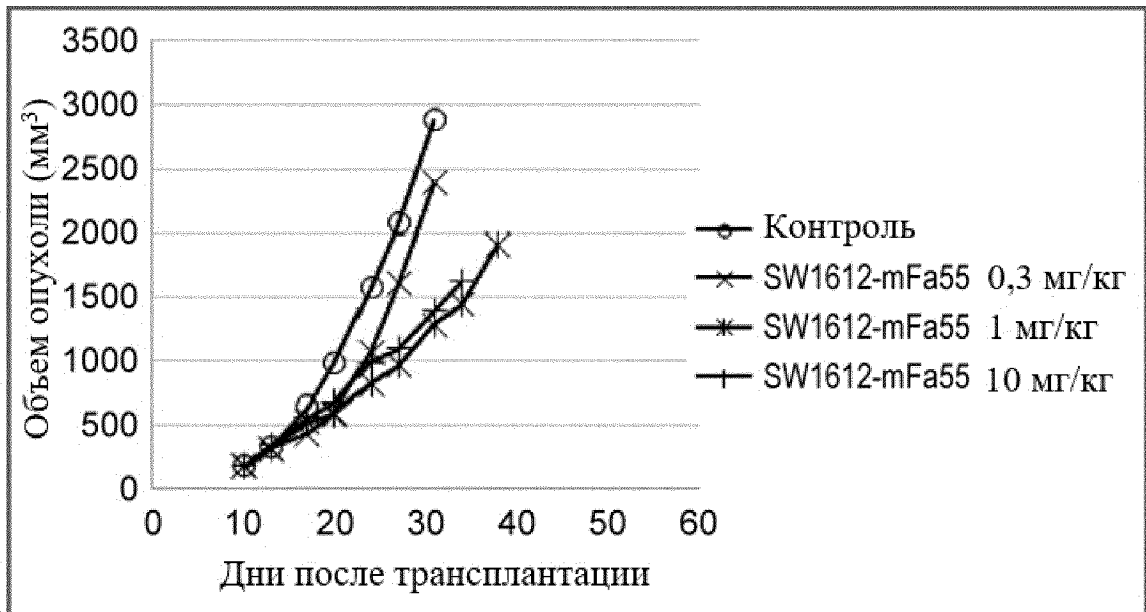




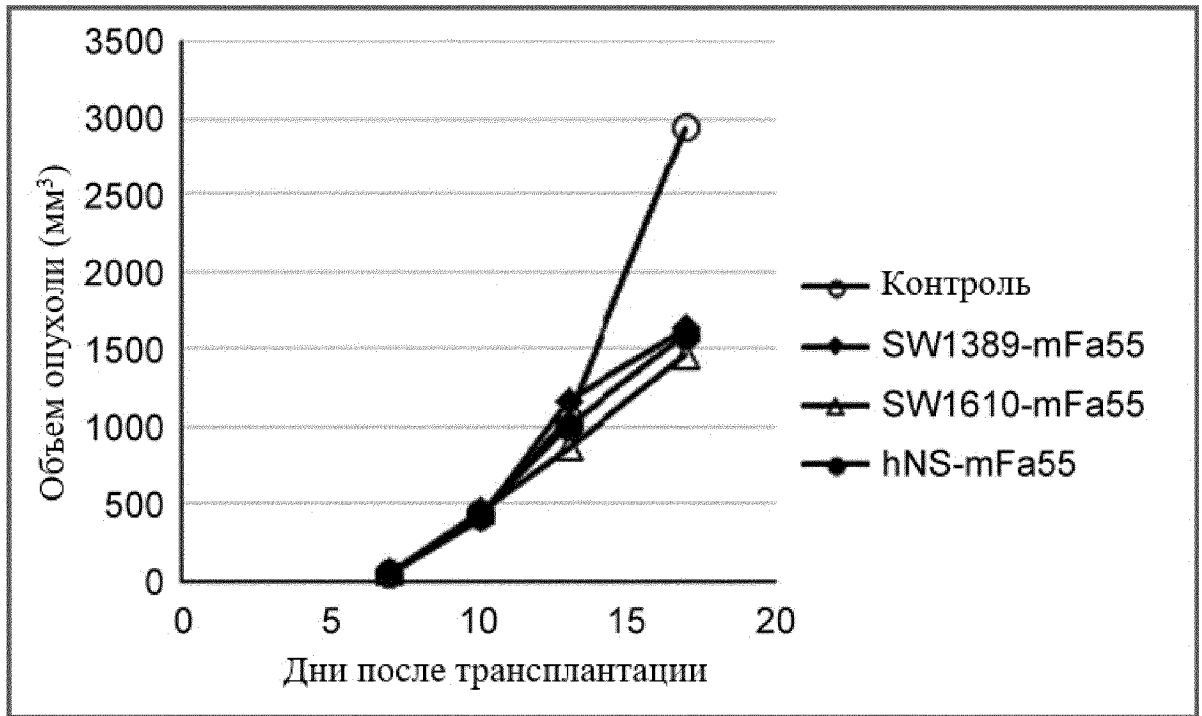
Фигура 3



Фигура 4



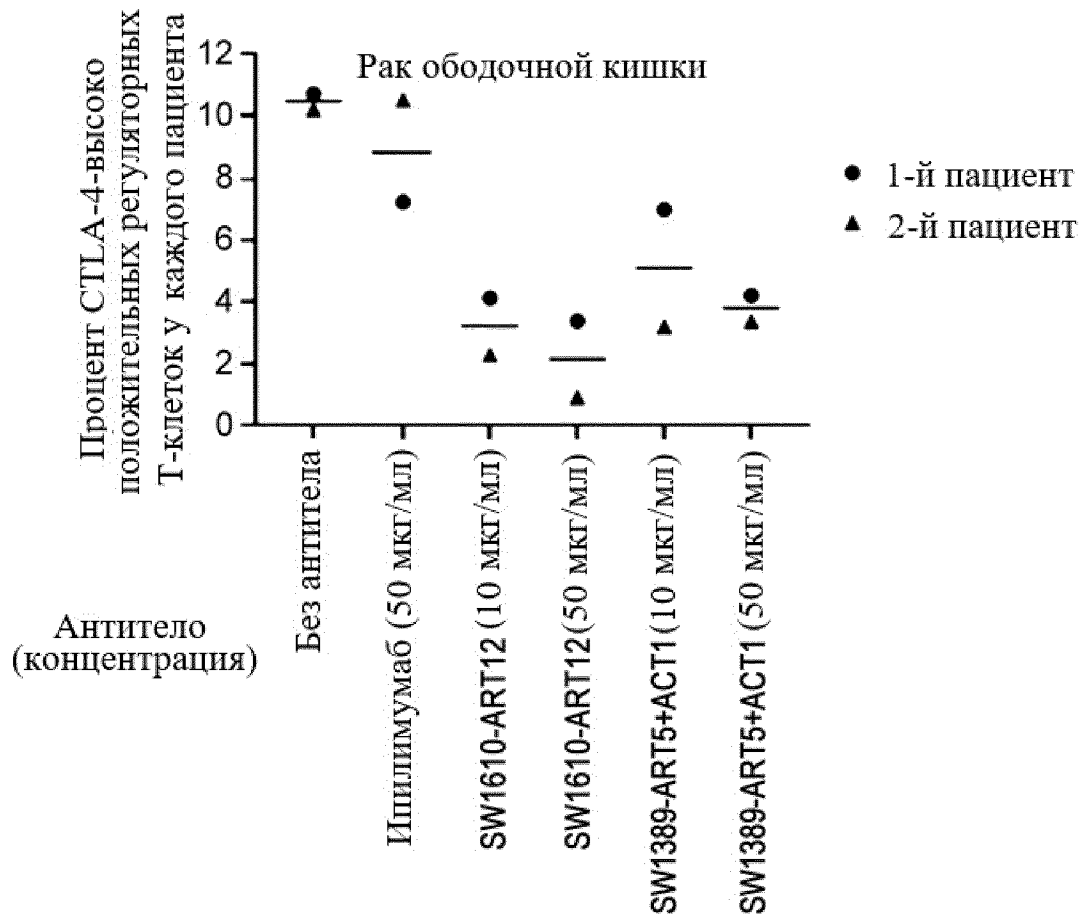
Фигура 5



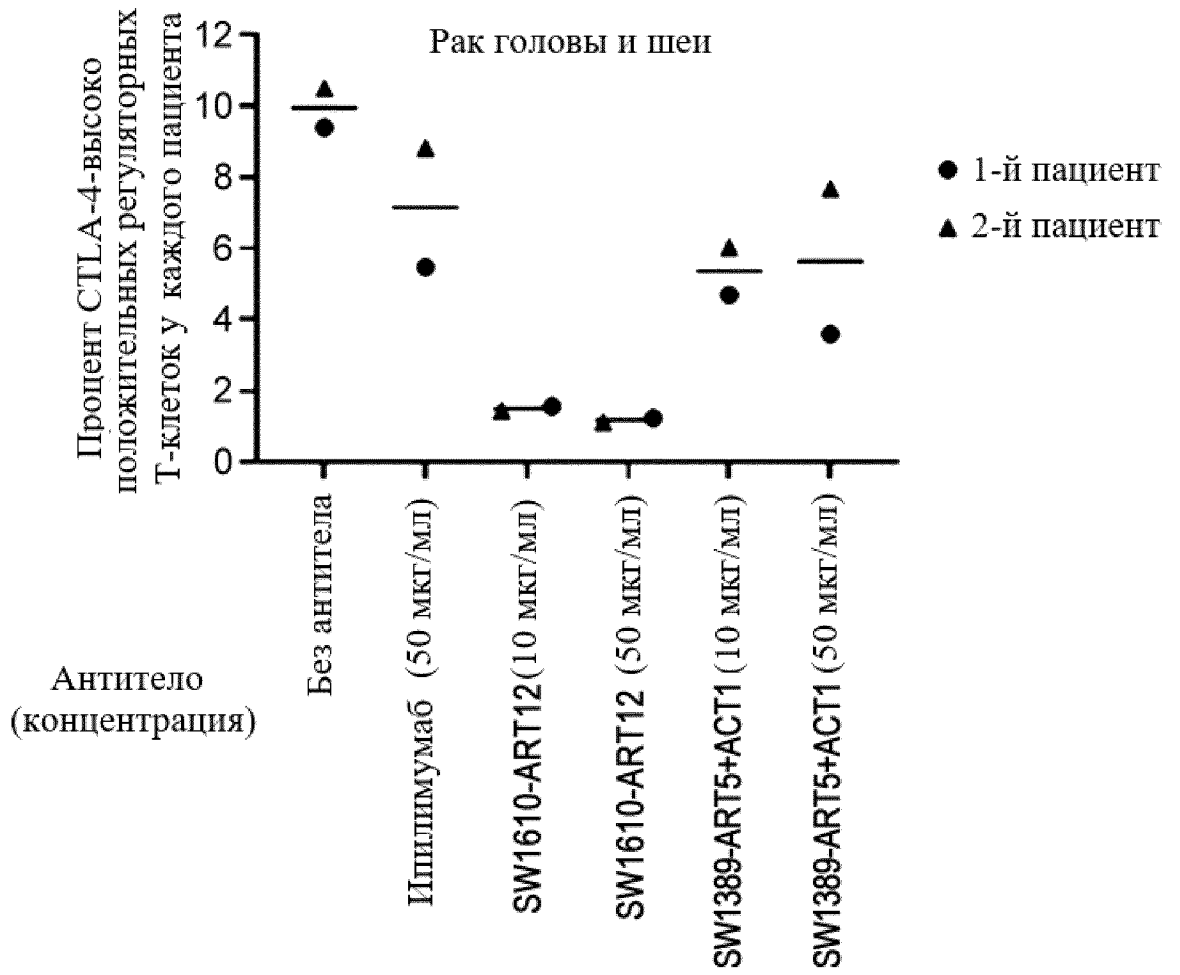
Фигура 6



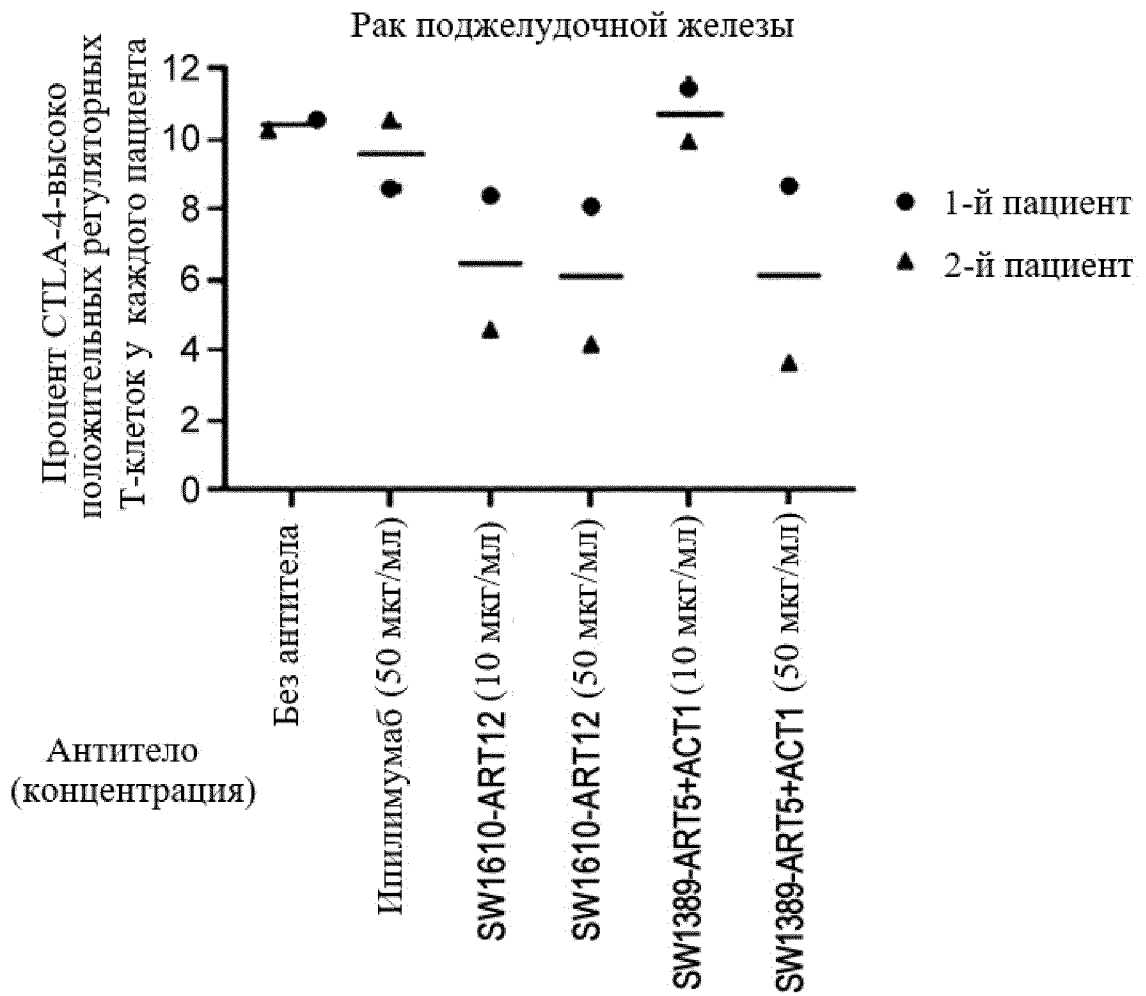
Фигура 7



Фигура 8

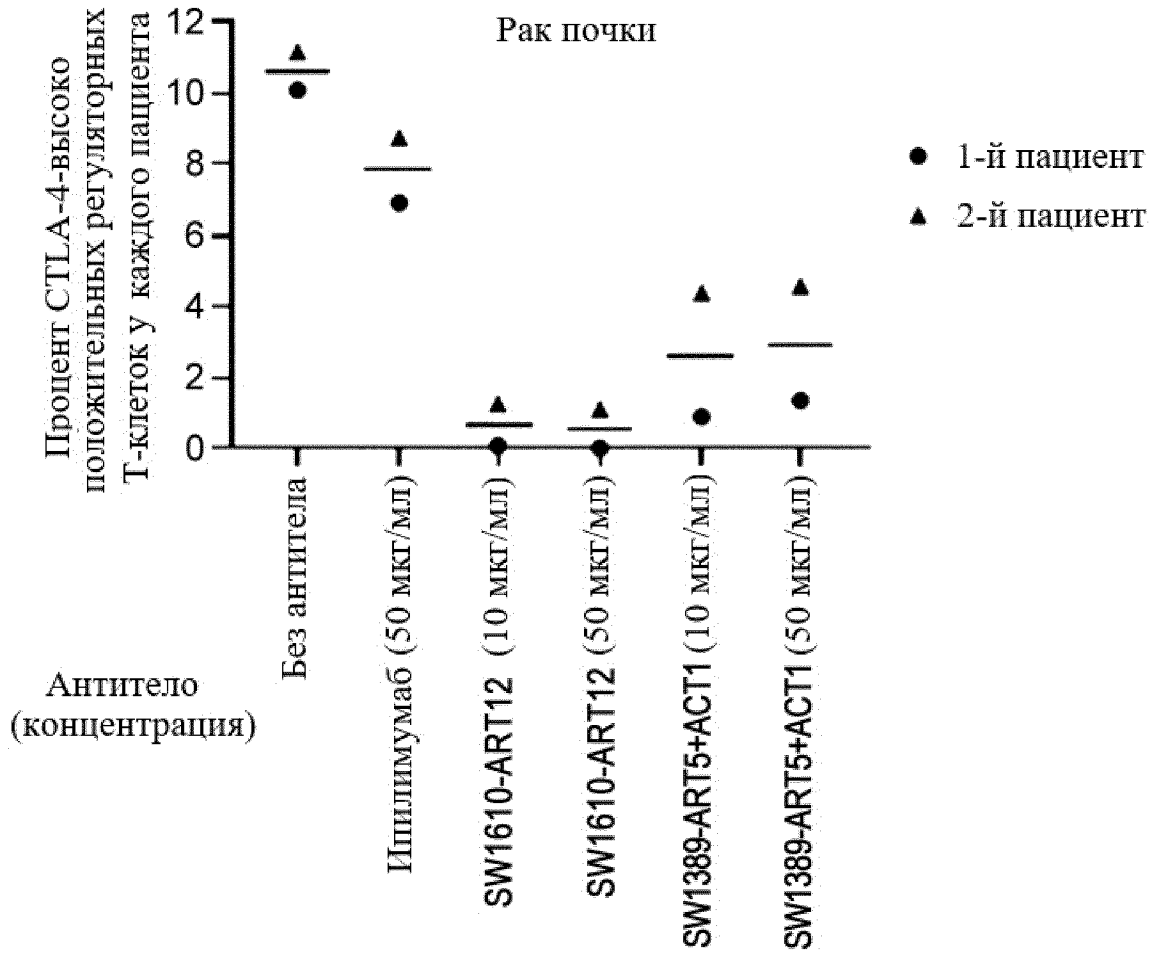


Фигура 9

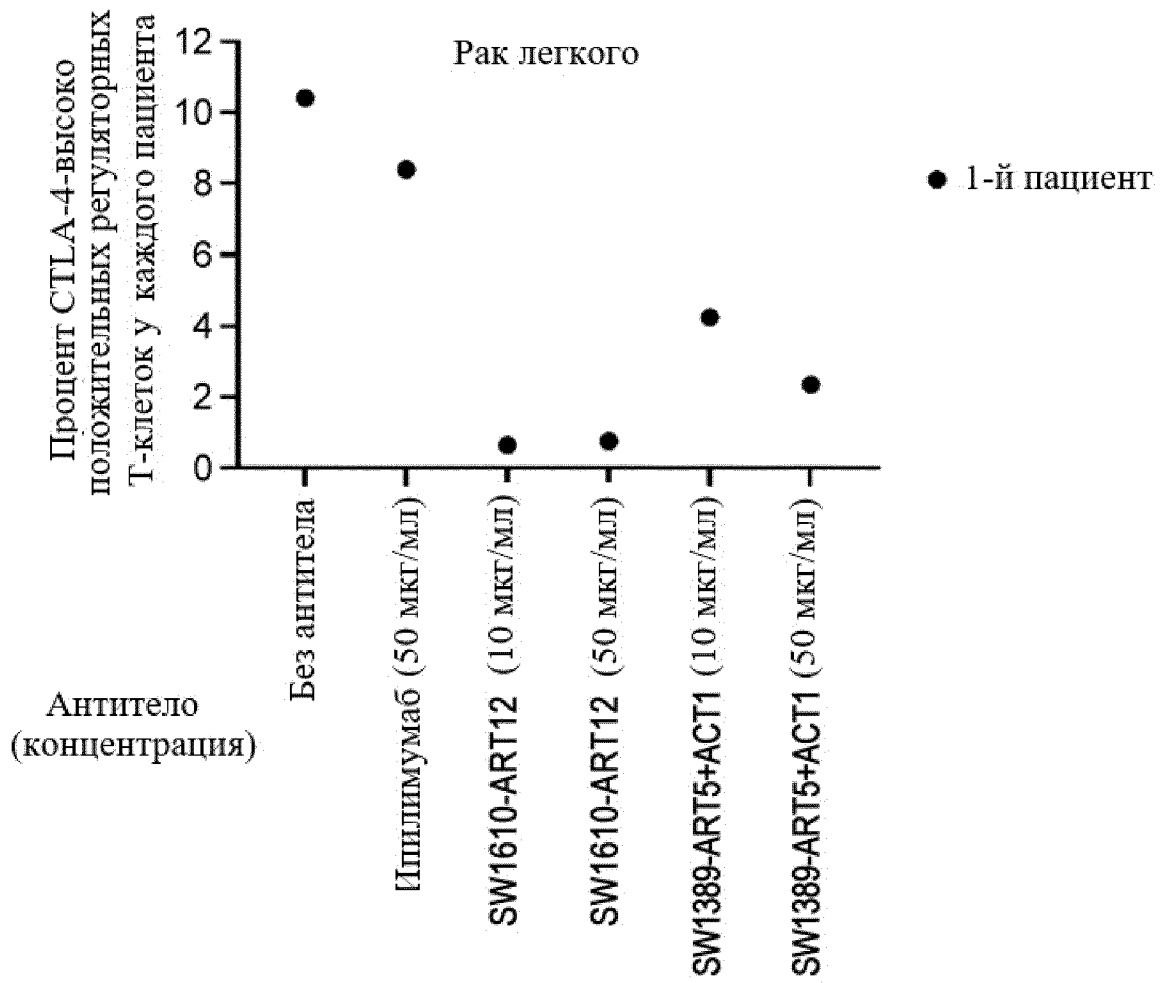


Фигура 10

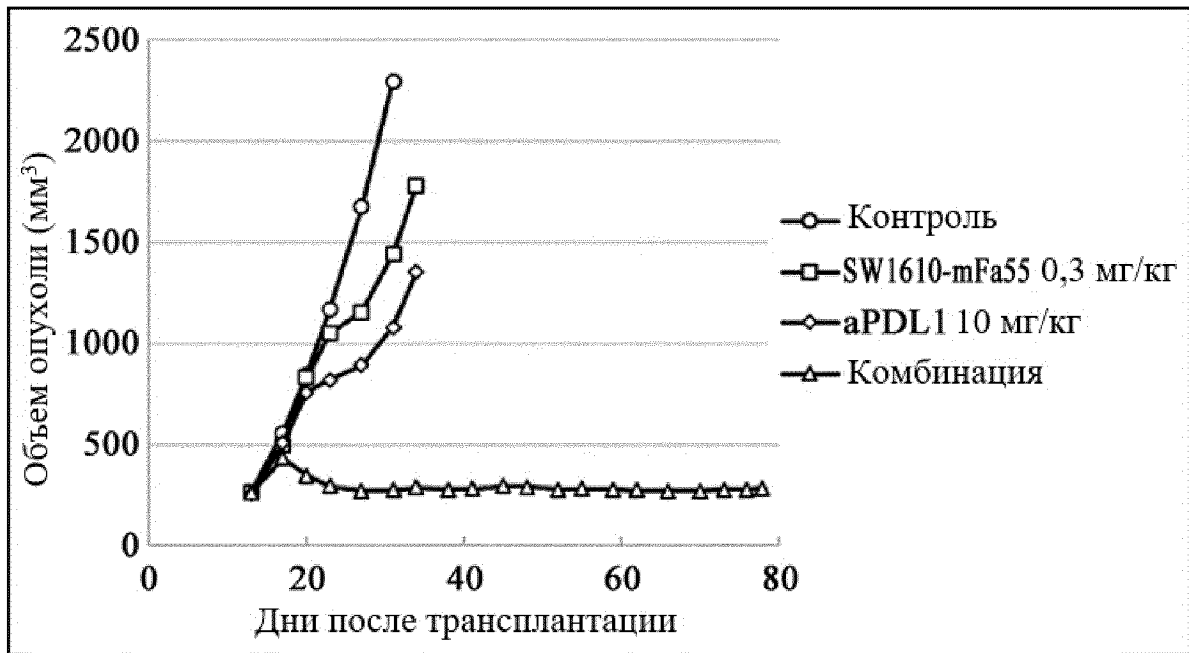




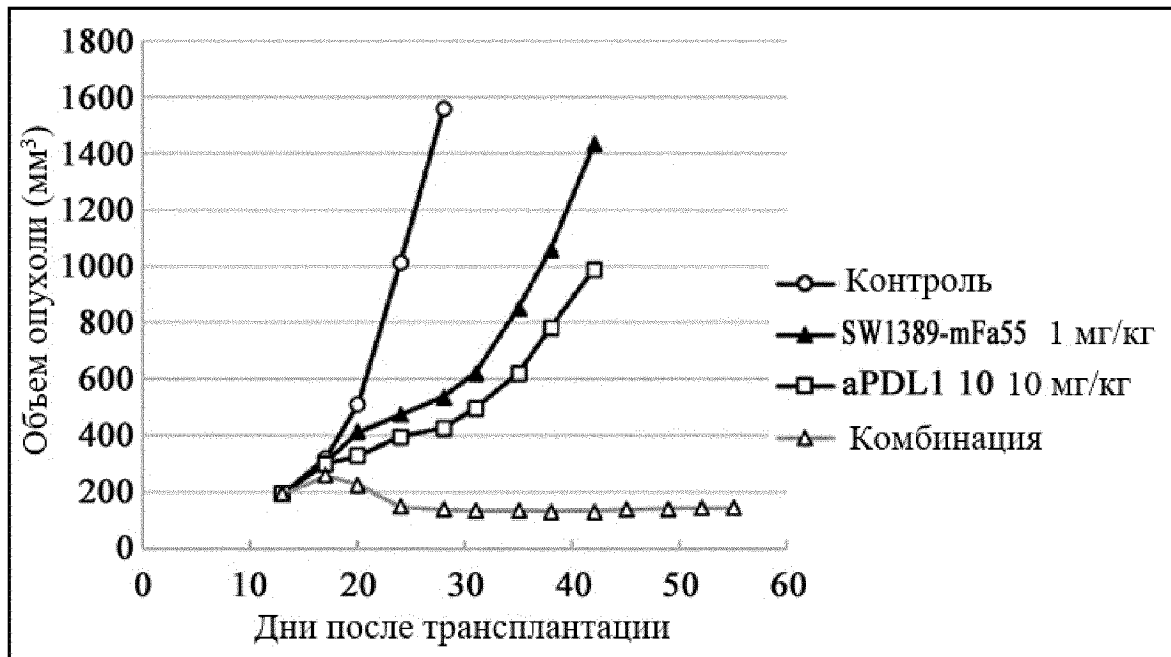
Фигура 11



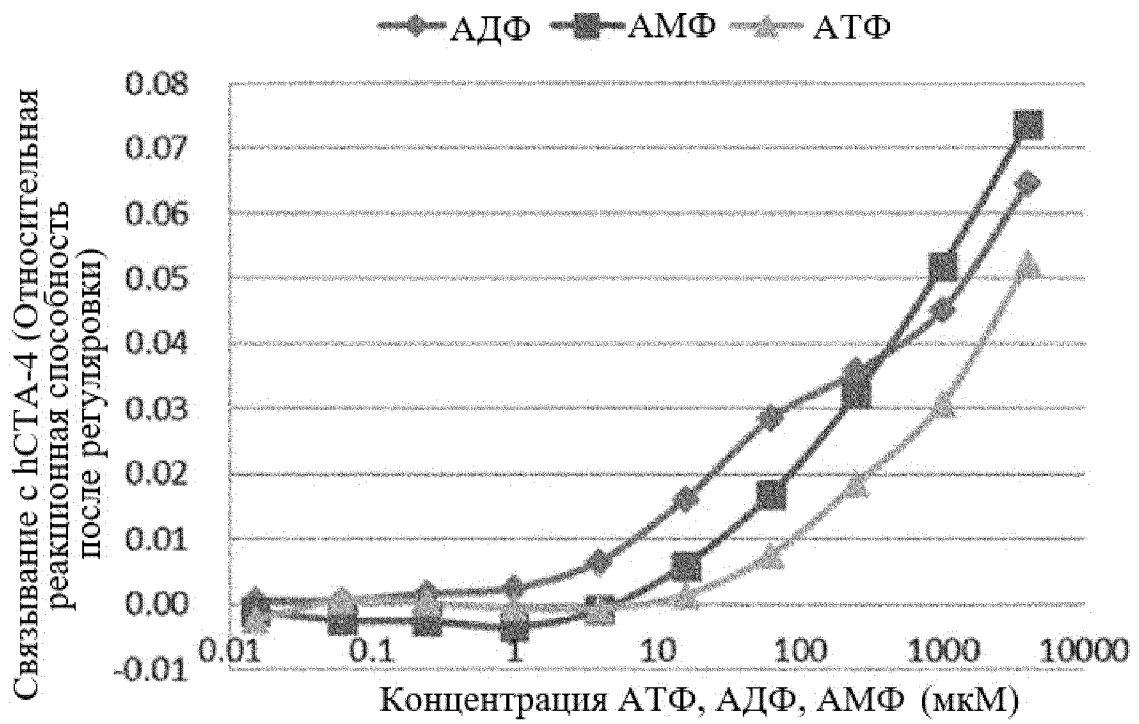
Фигура 12



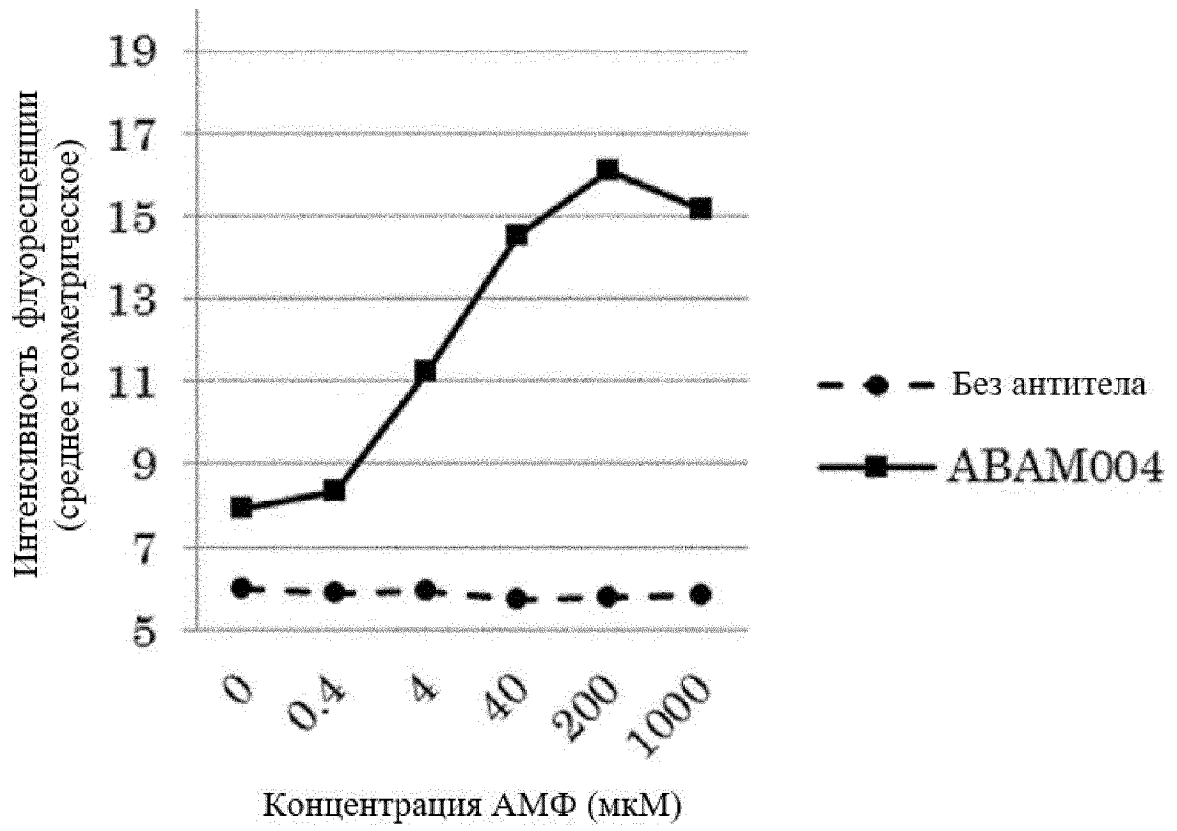
Фигура 13



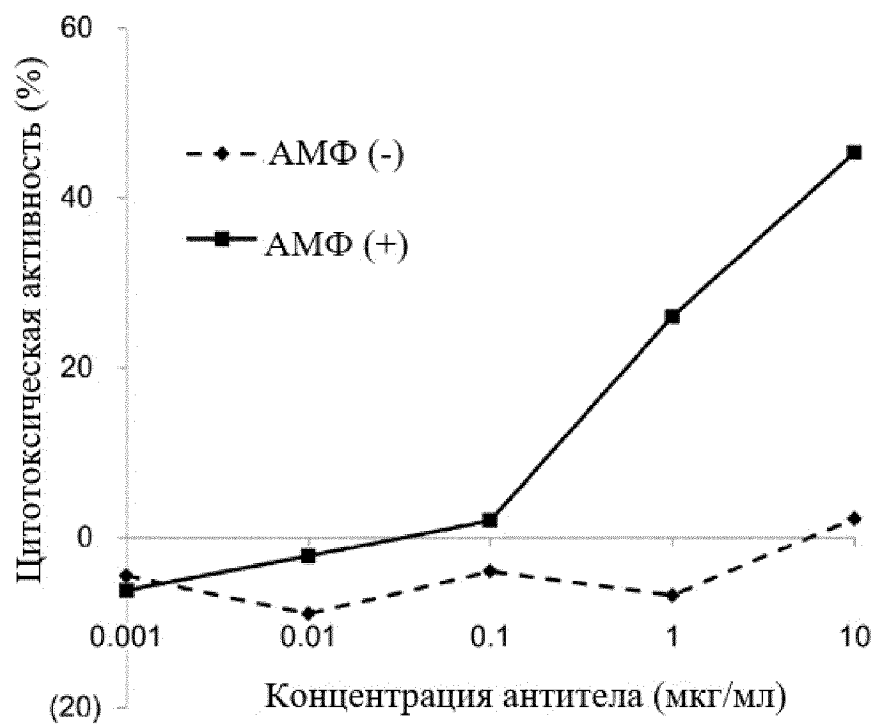
Фигура 14



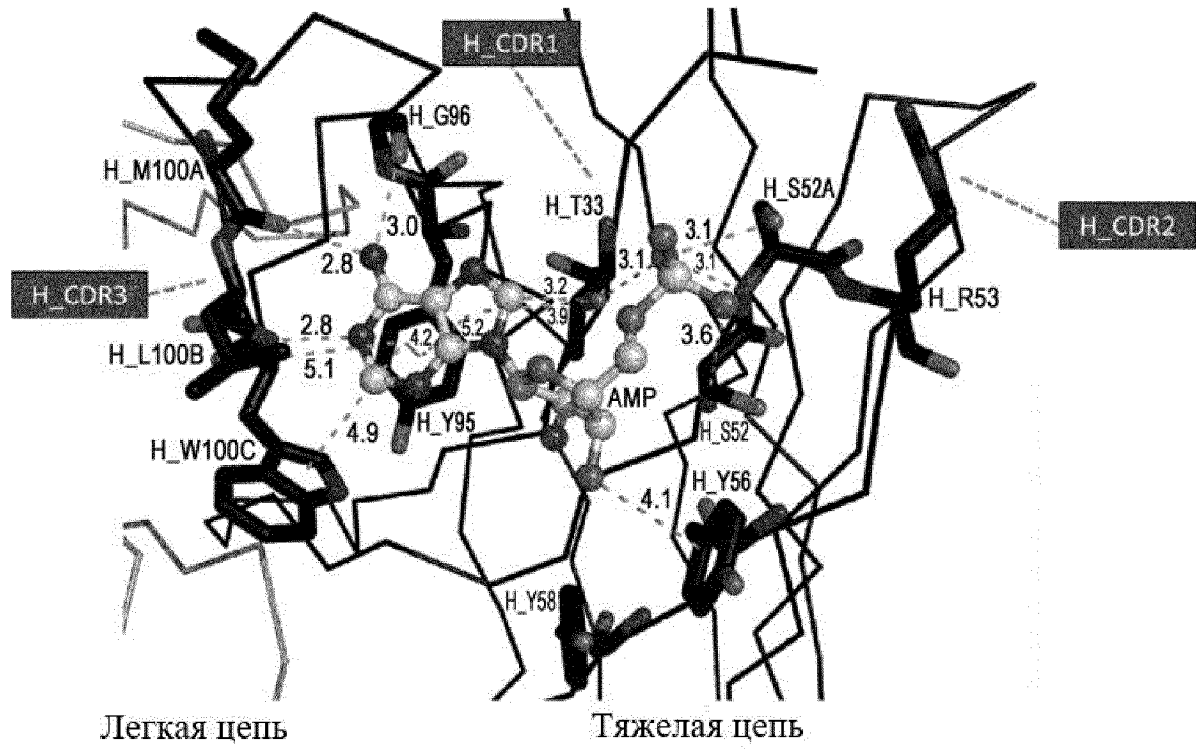
Фигура 15



Фигура 16

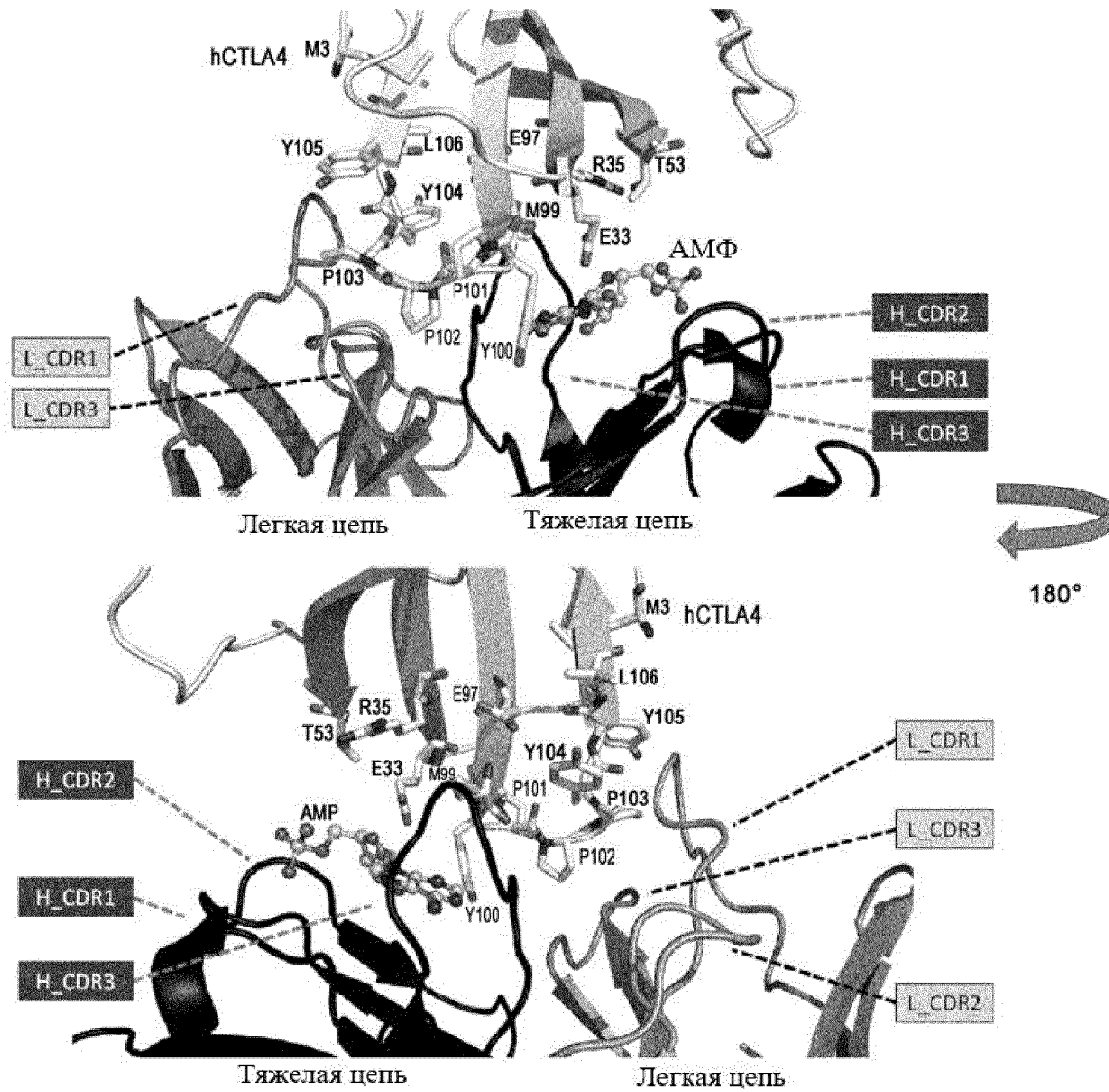


Фигура 17

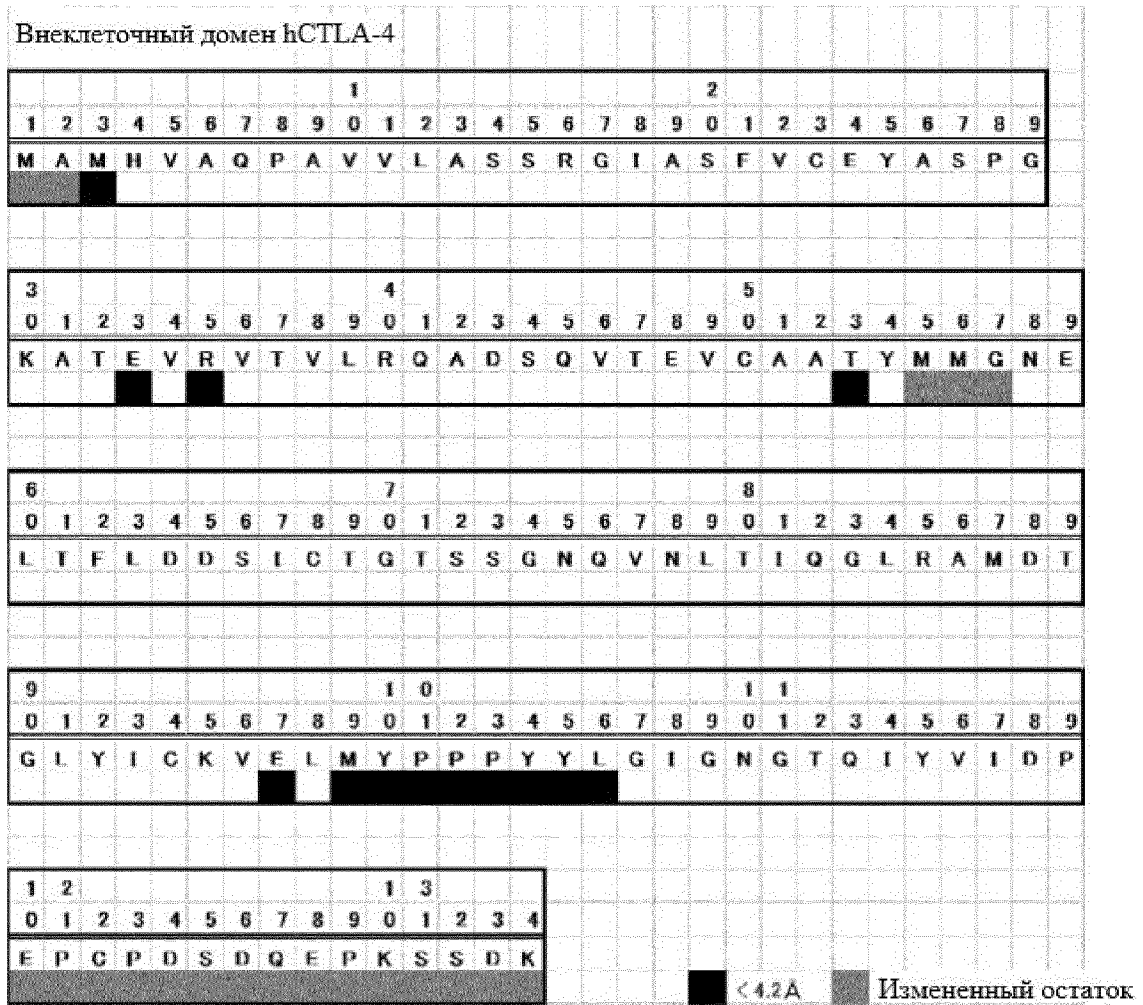


Фигура 18

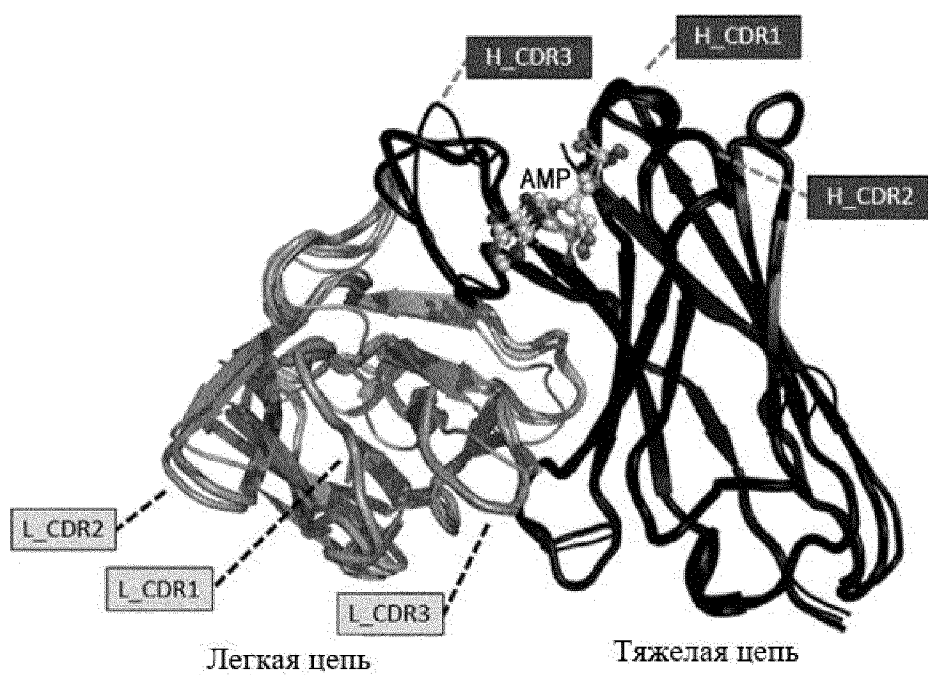




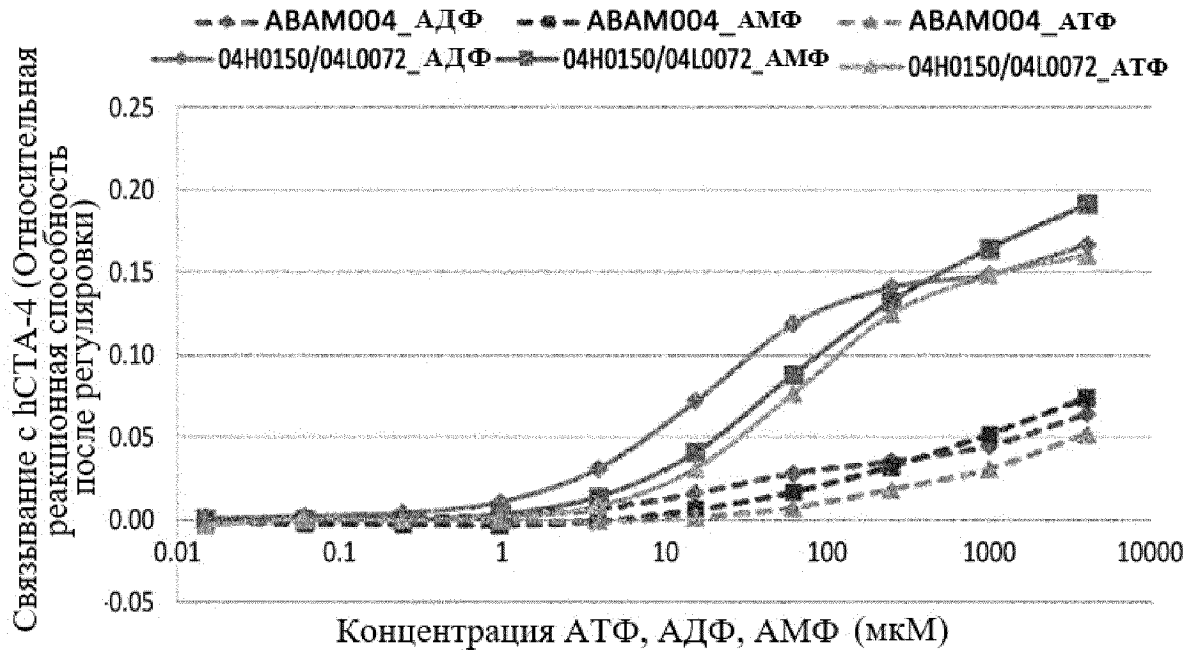
Фигура 19



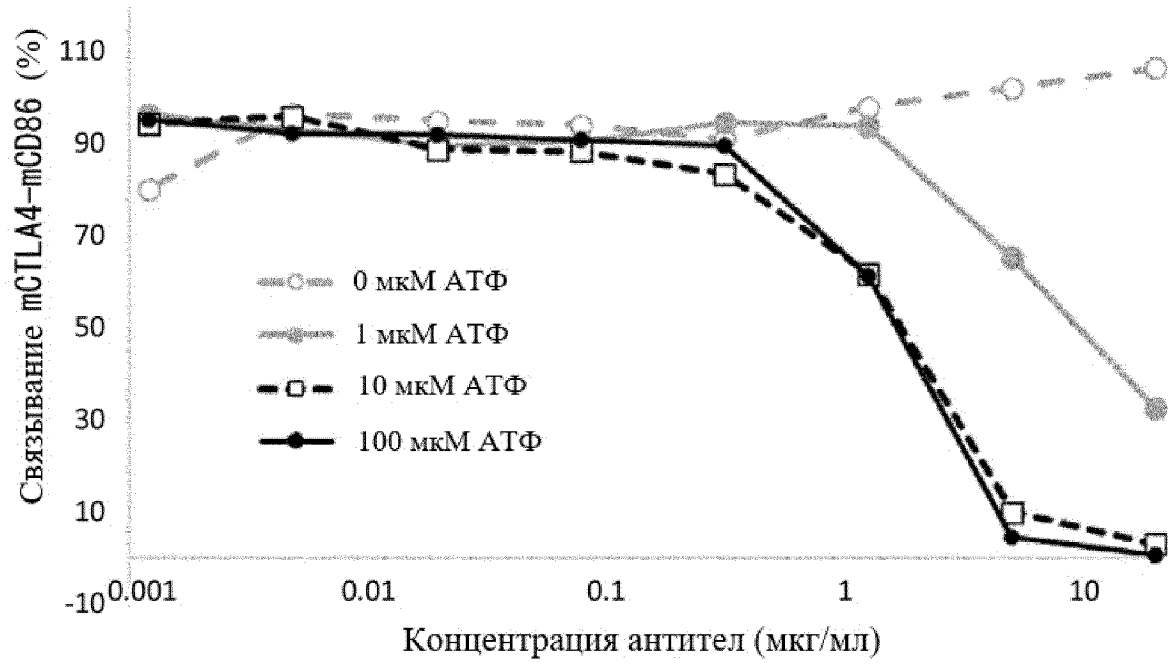
Фигура 20



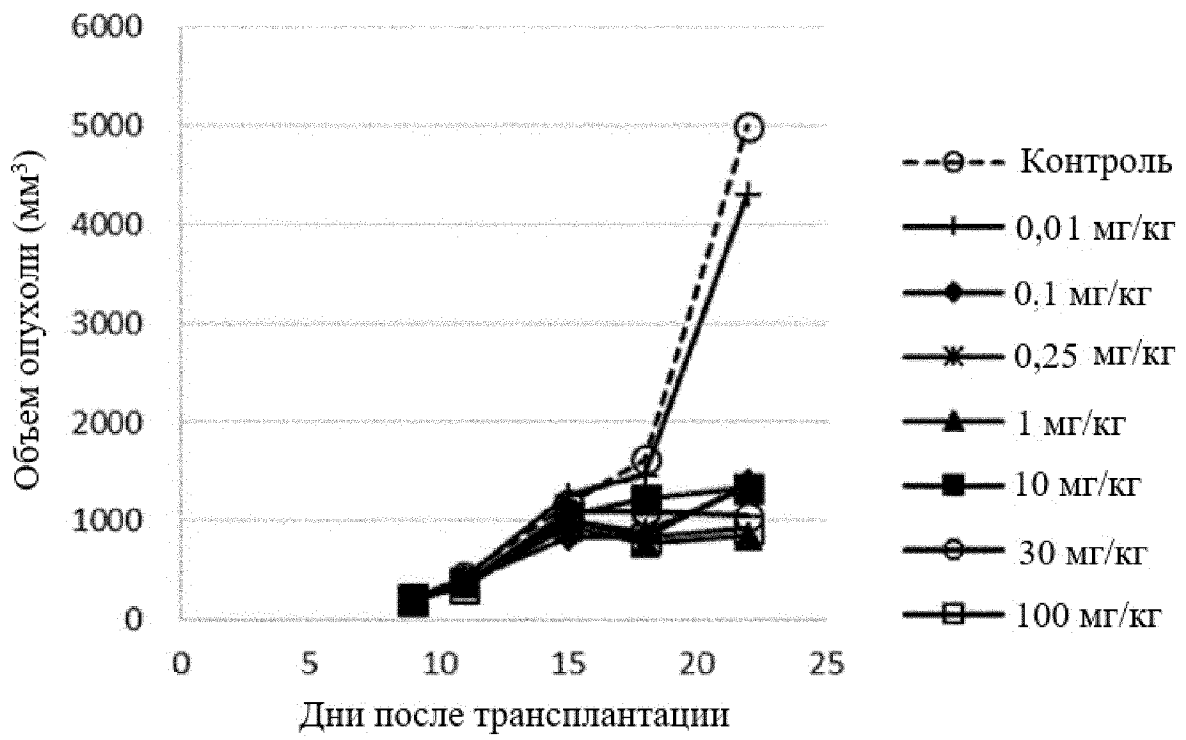
Фигура 21



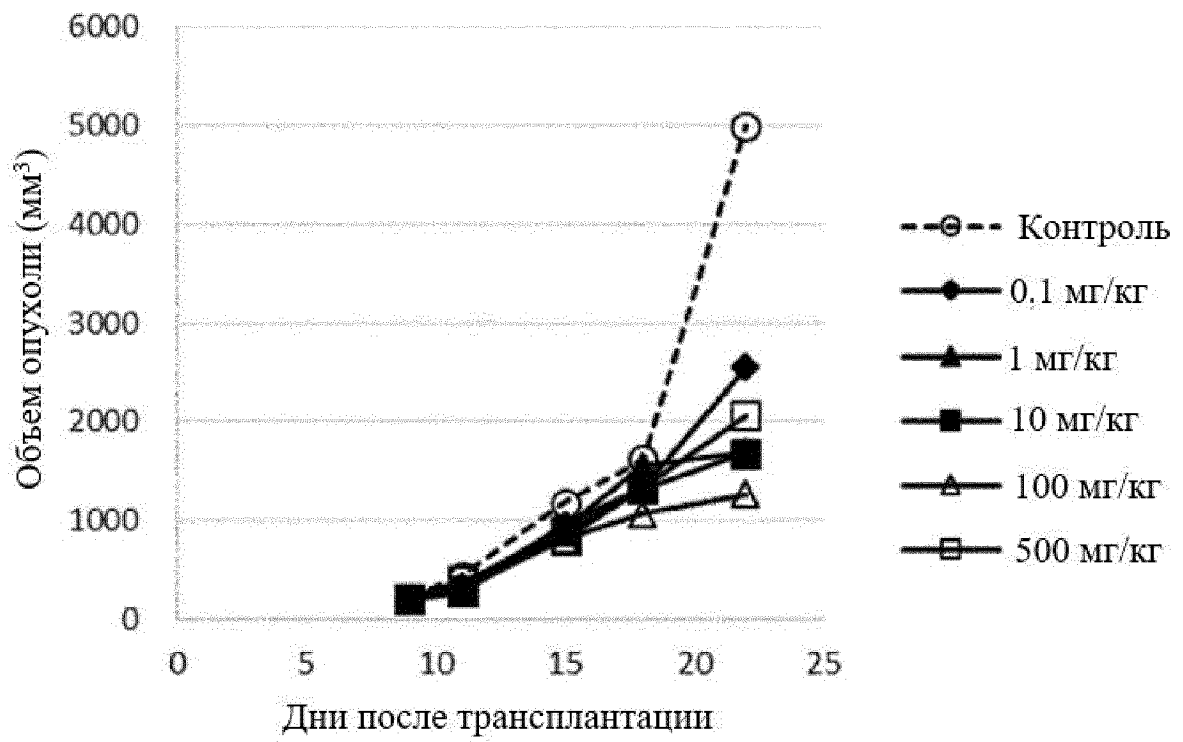
Фигура 22



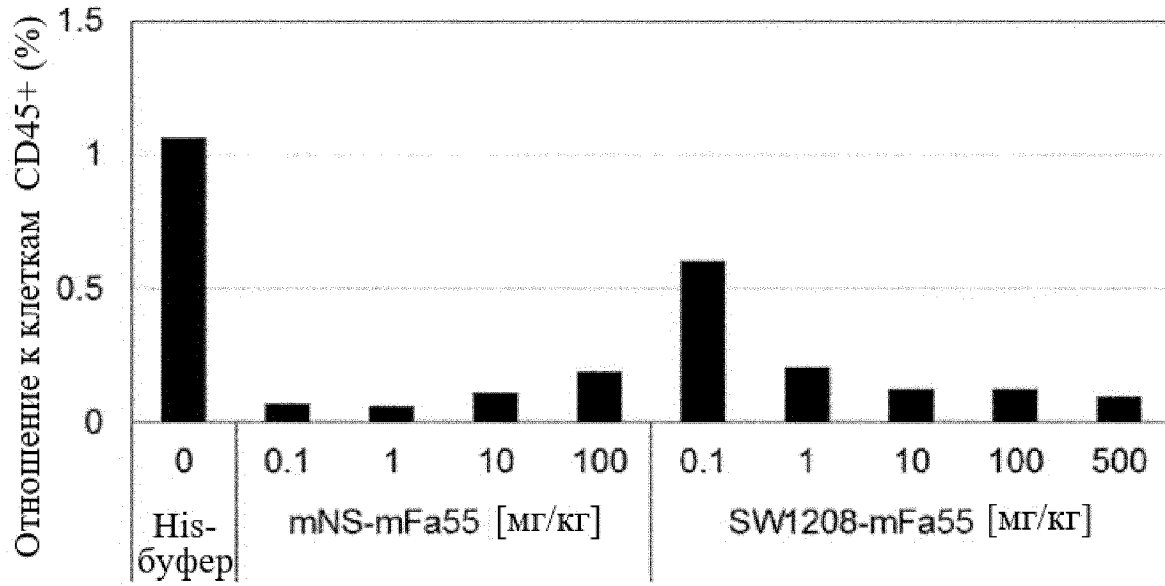
Фигура 23



Фигура 24

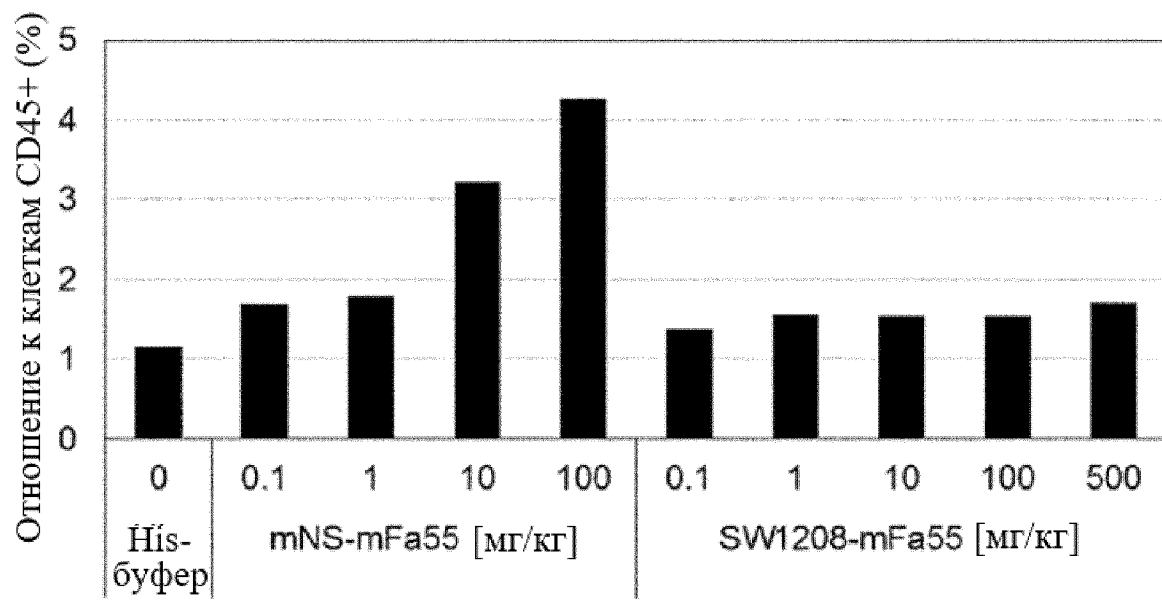


Фигура 25

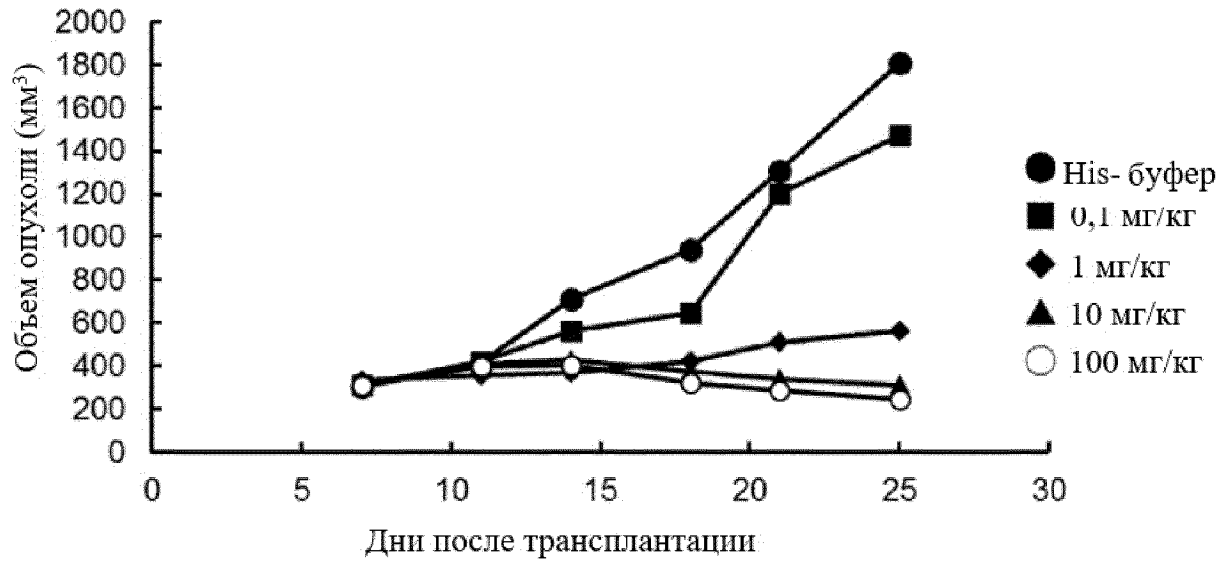


Фигура 26

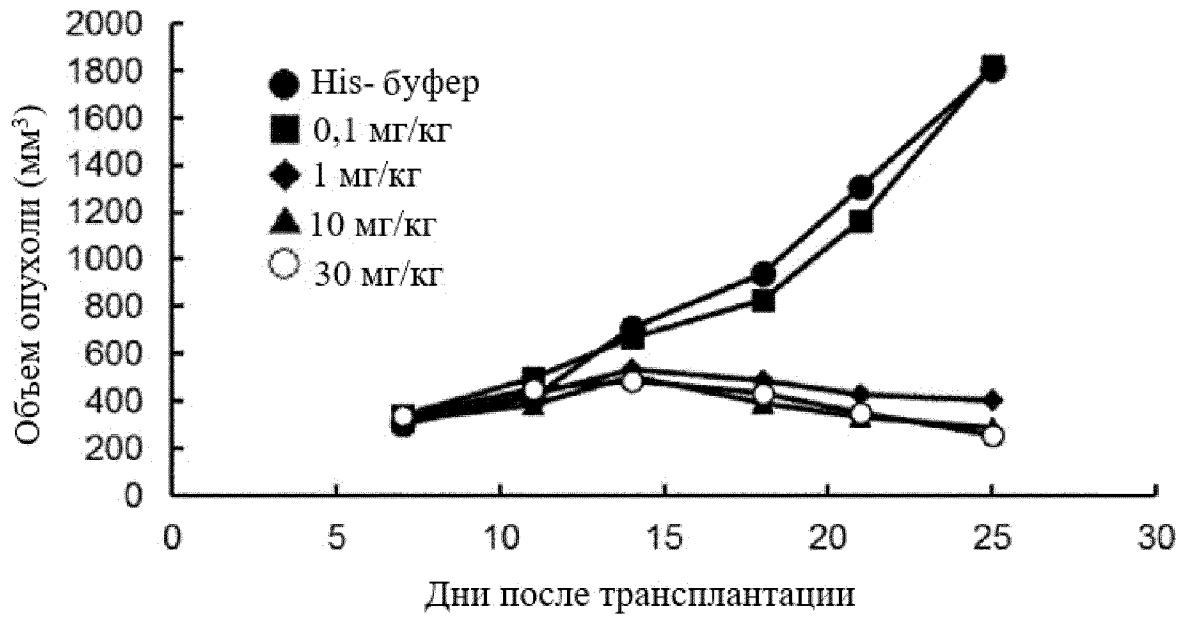




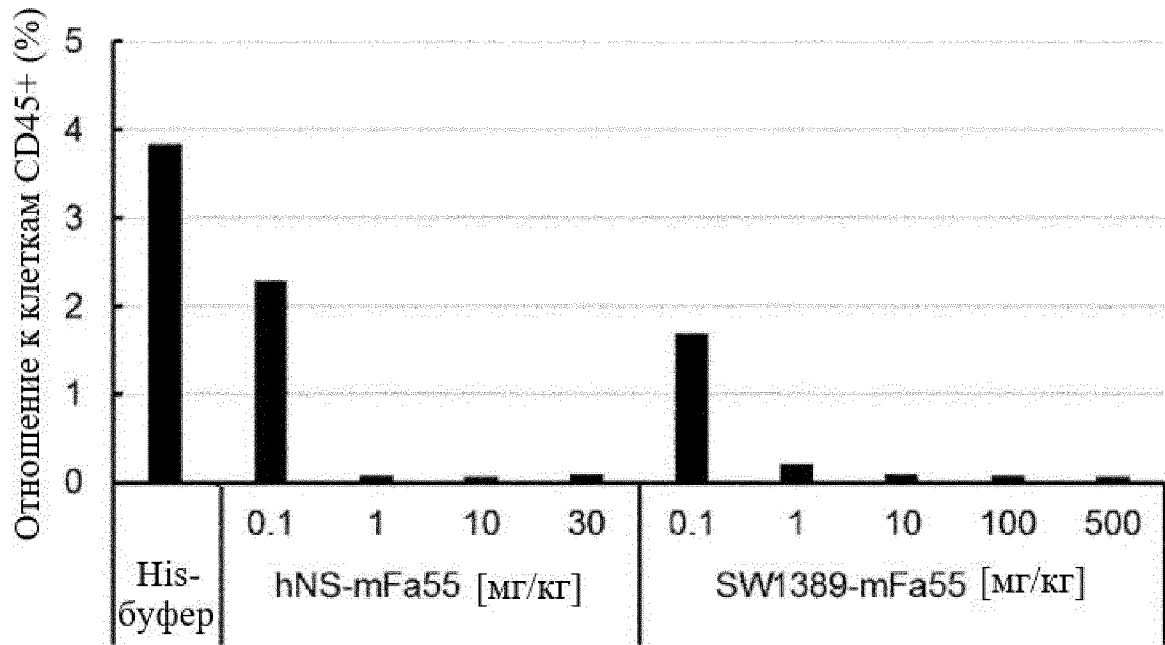
Фигура 27



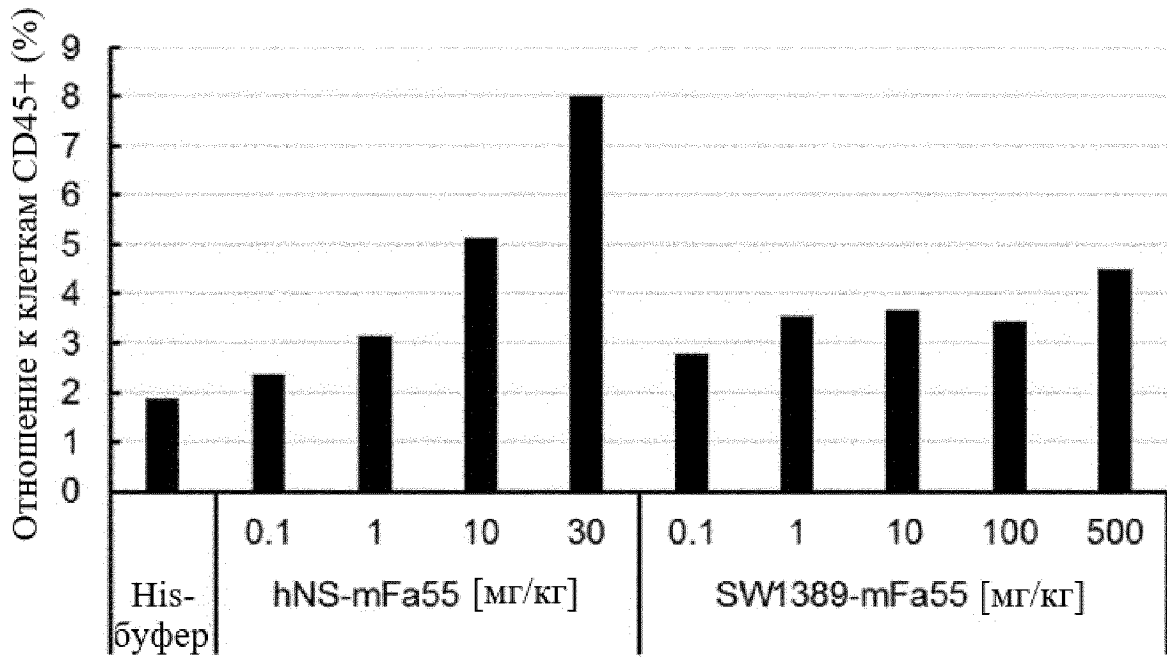
Фигура 28



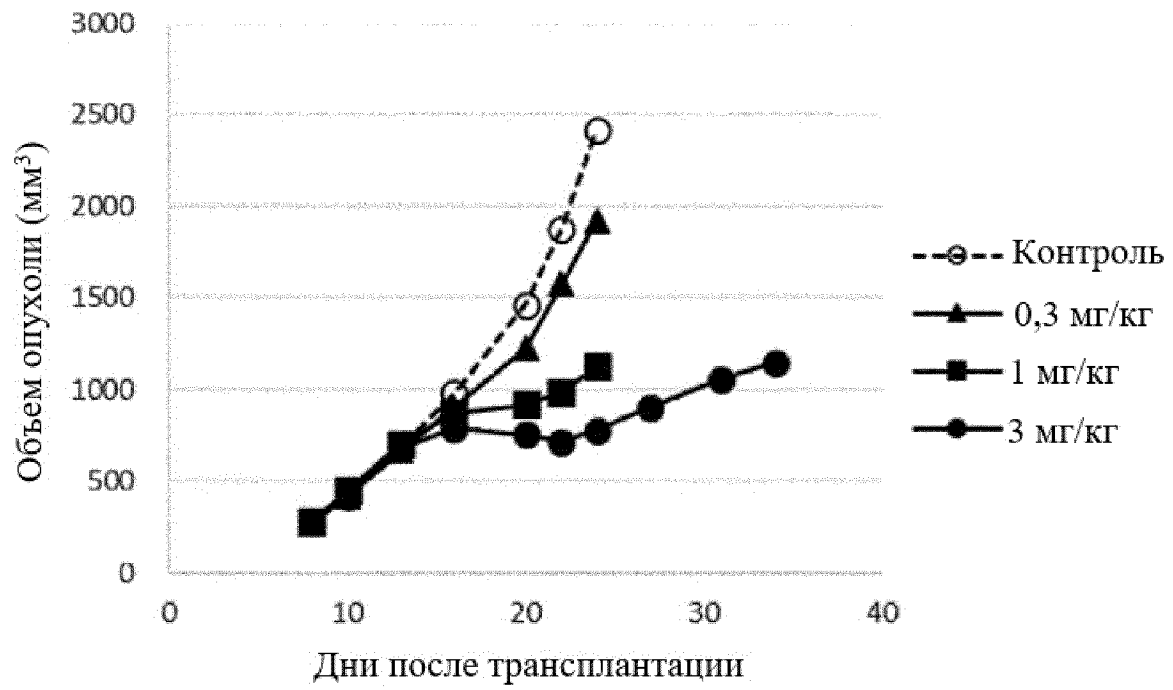
Фигура 29



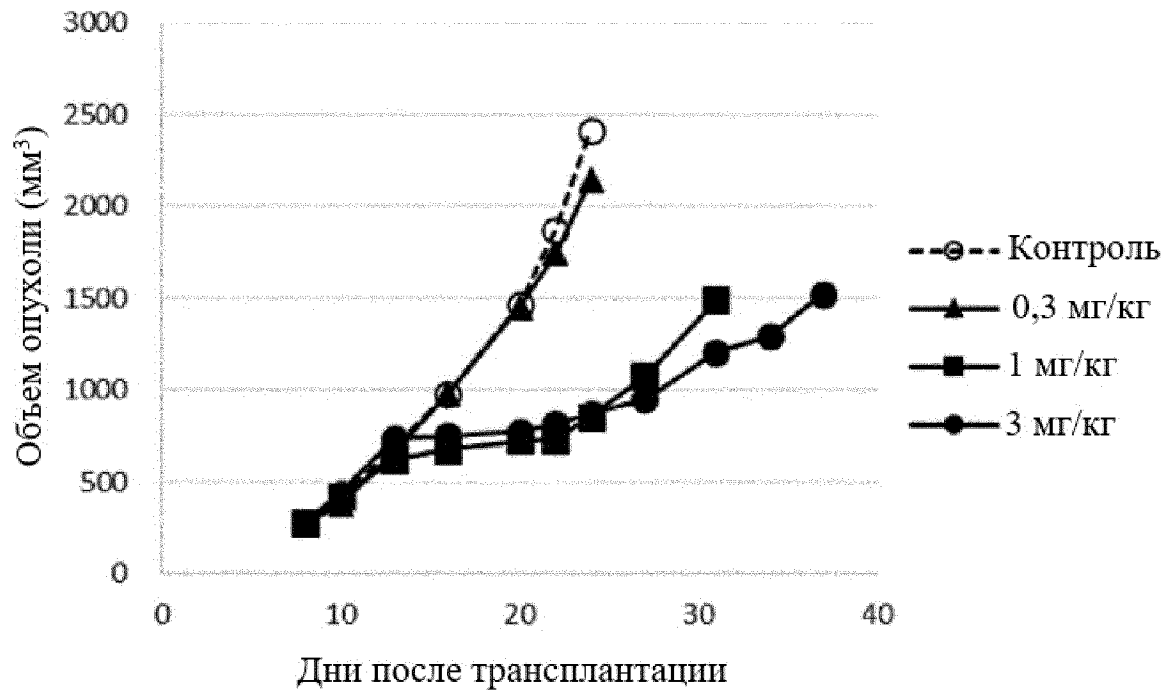
Фигура 30



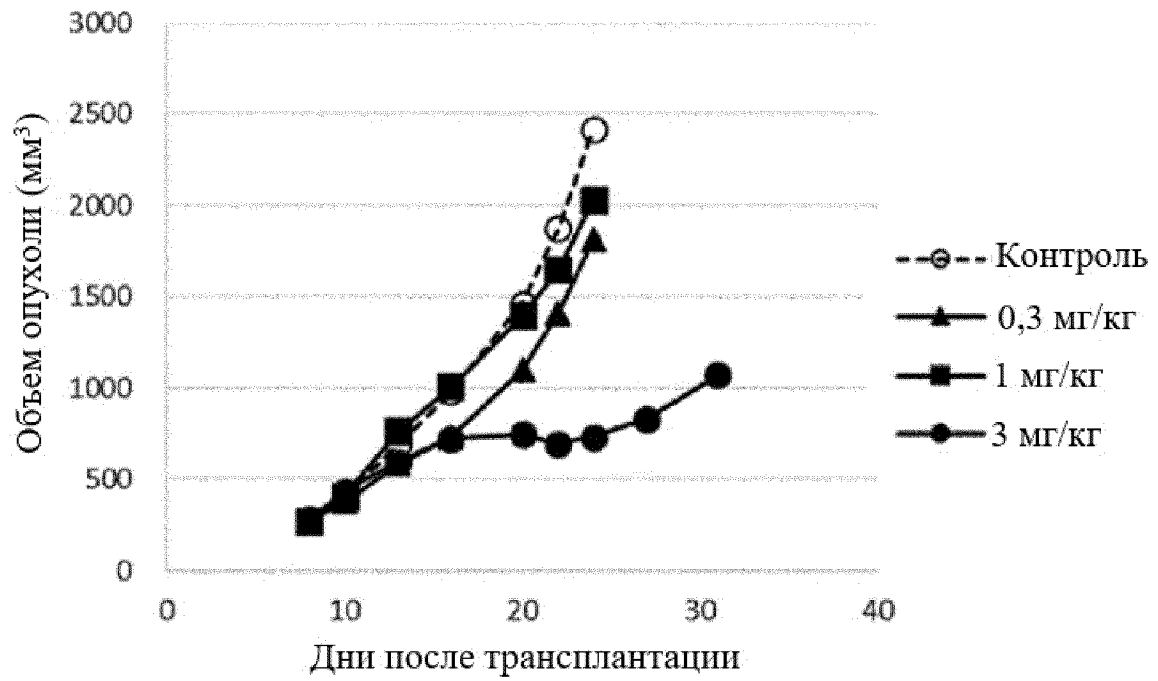
Фигура 31



Фигура 32

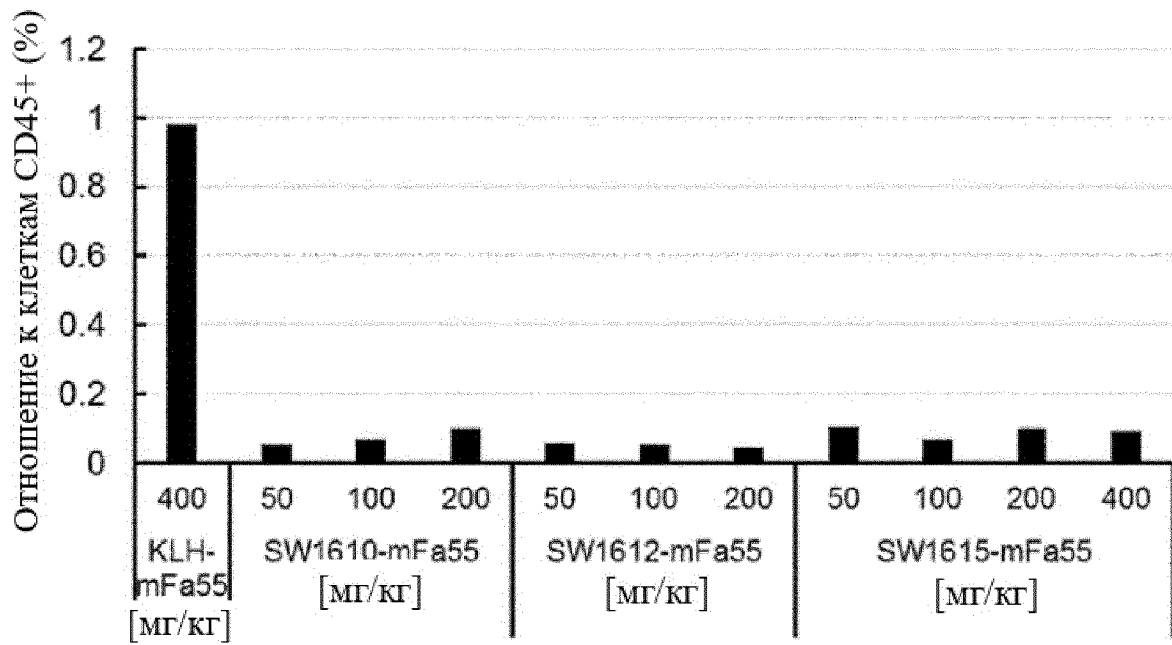


Фигура 33

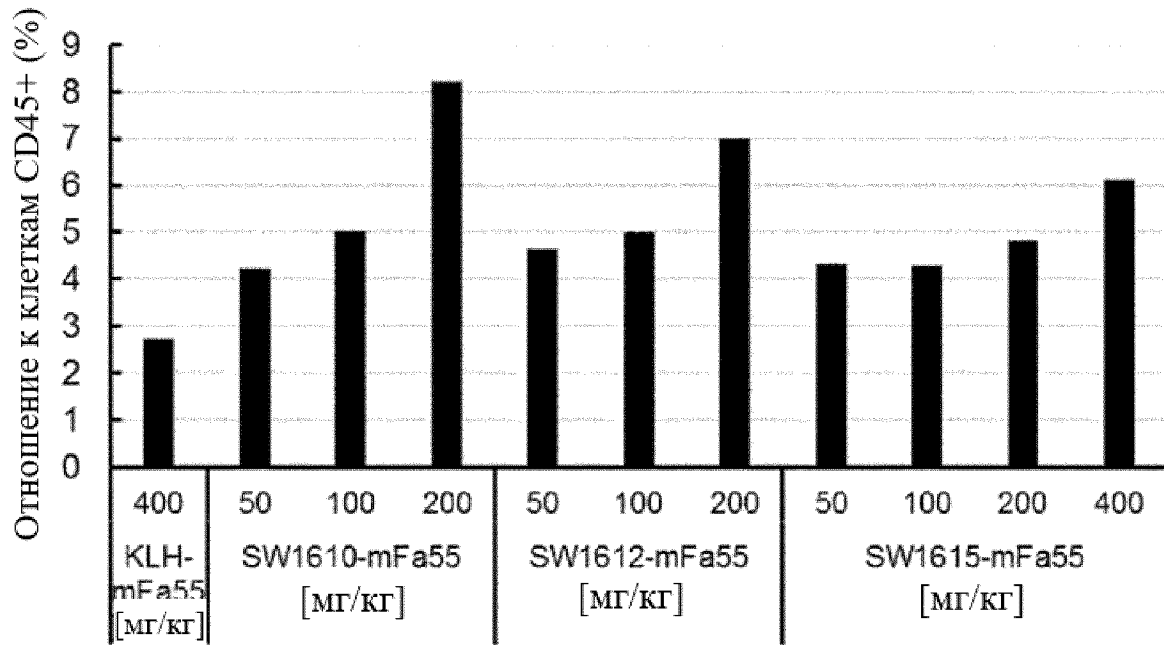


Фигура 34

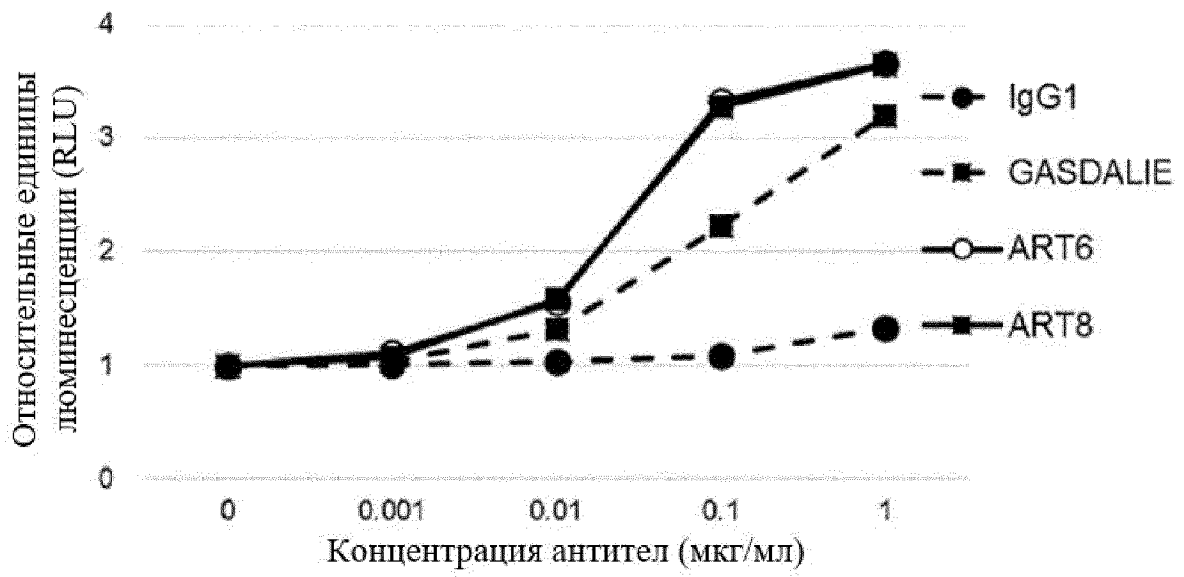




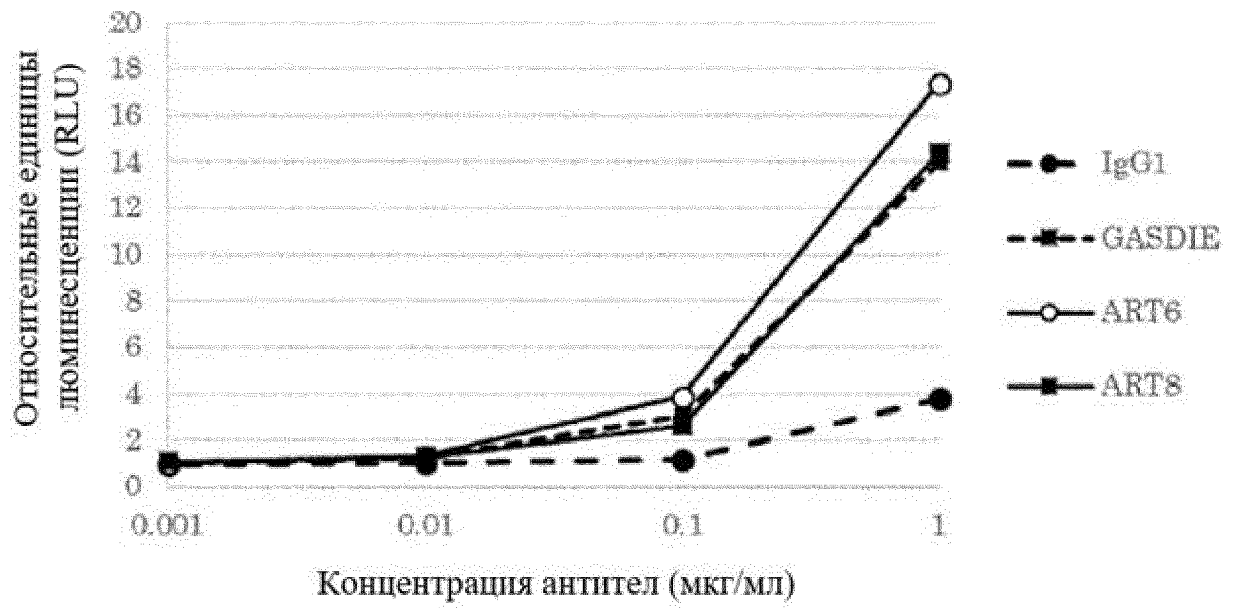
Фигура 35



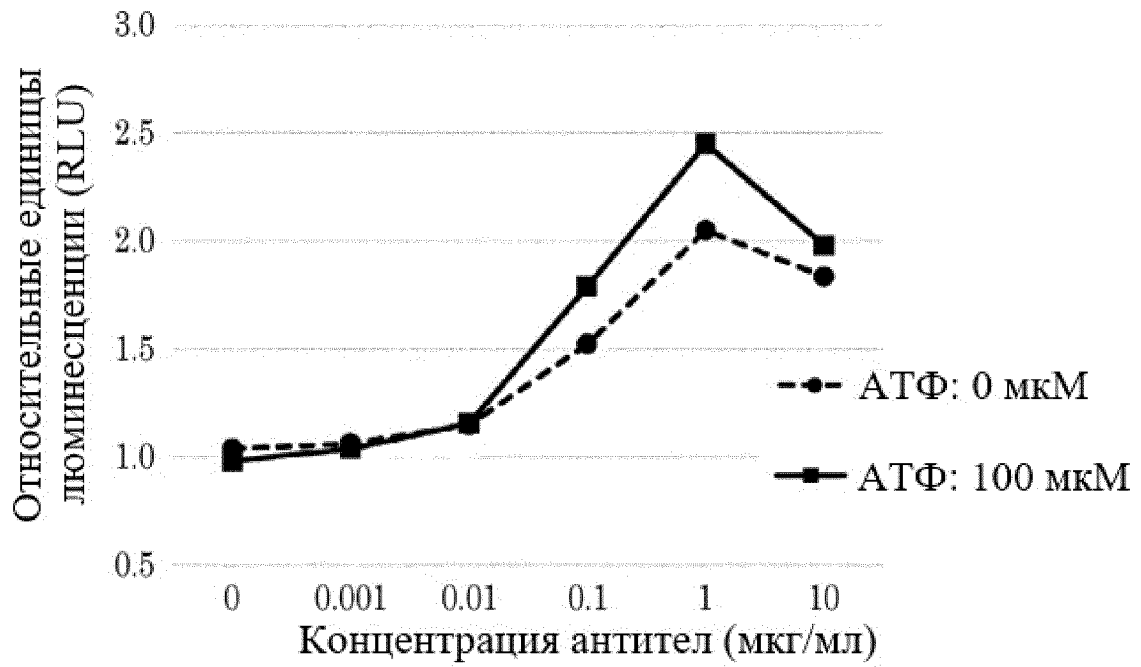
Фигура 36



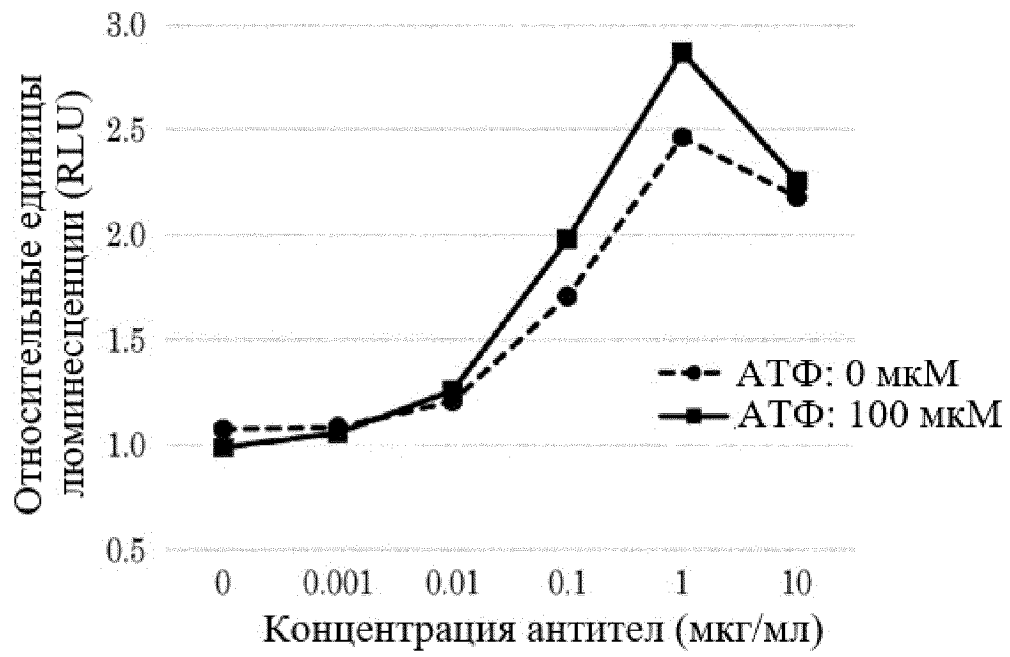
Фигура 37



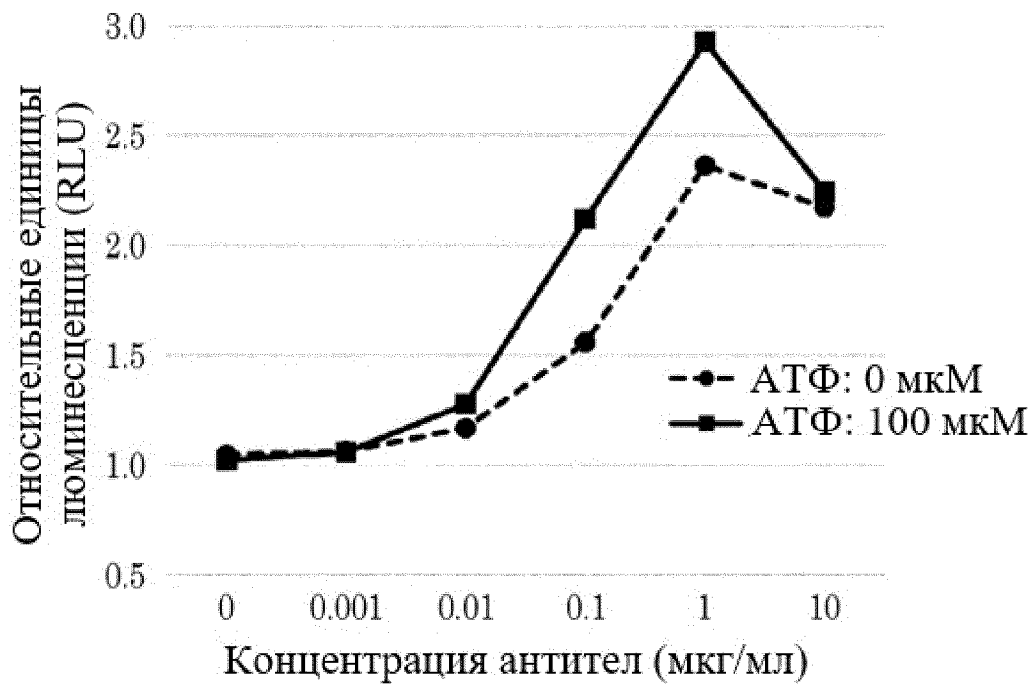
Фигура 38



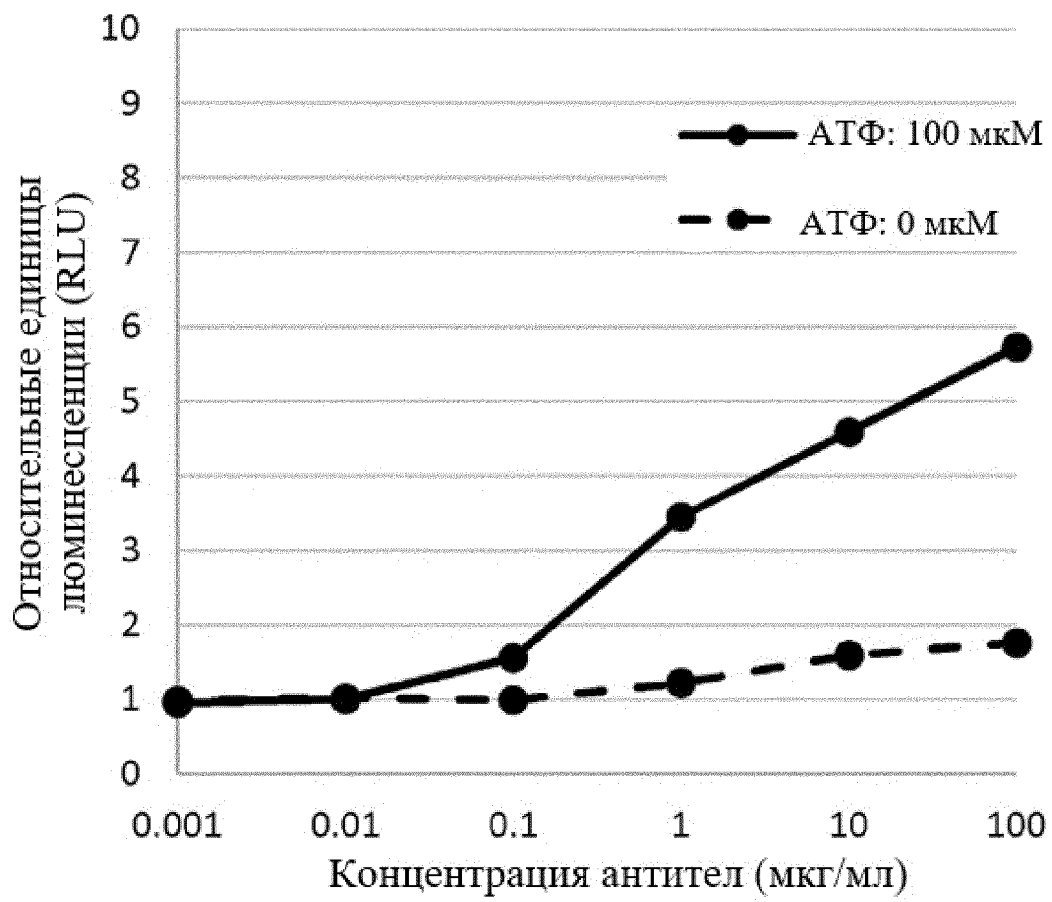
Фигура 39



Фигура 40

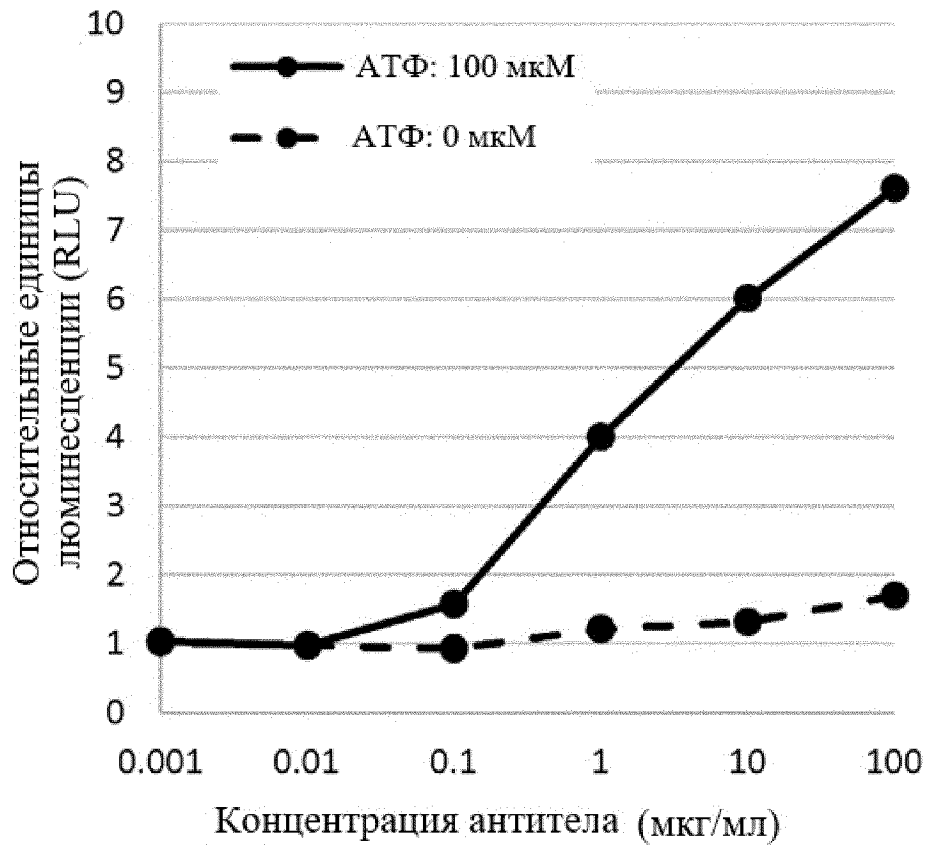


Фигура 41

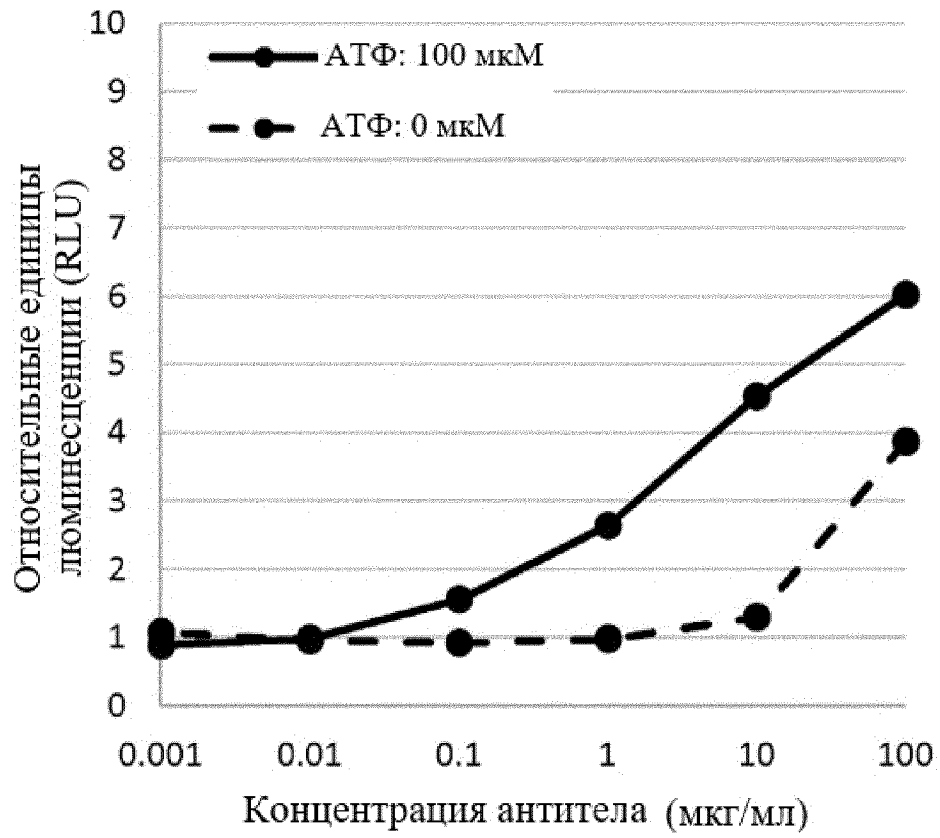


Фигура 42

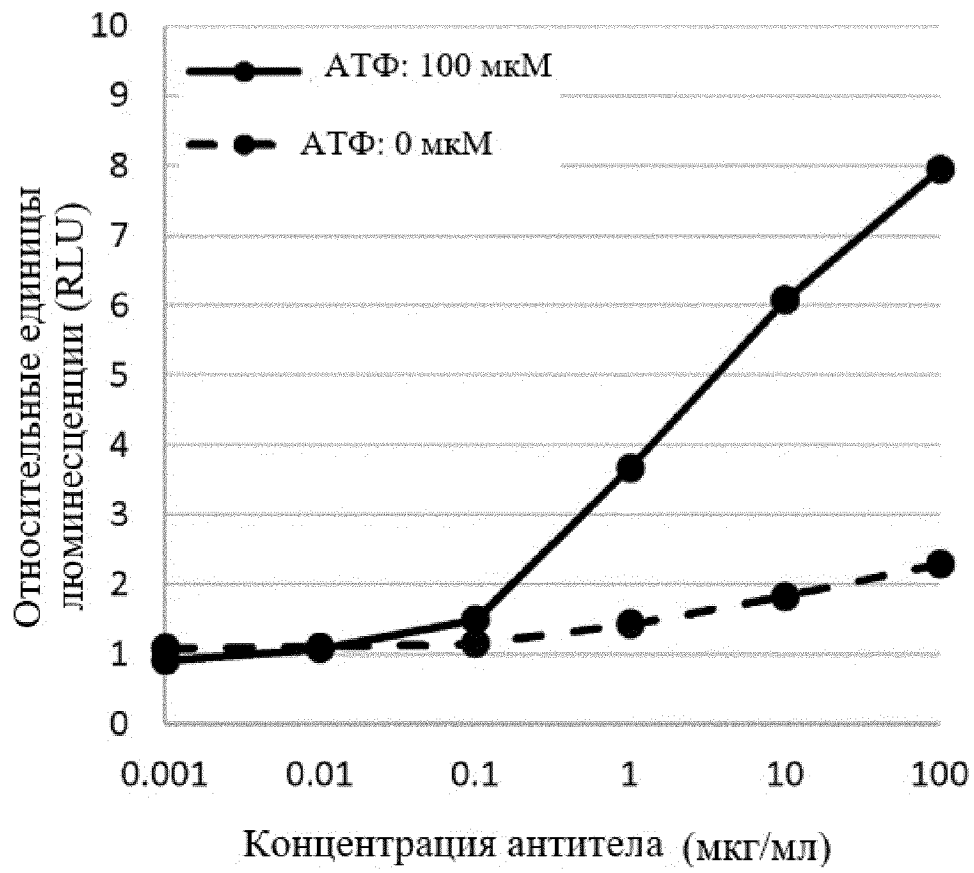




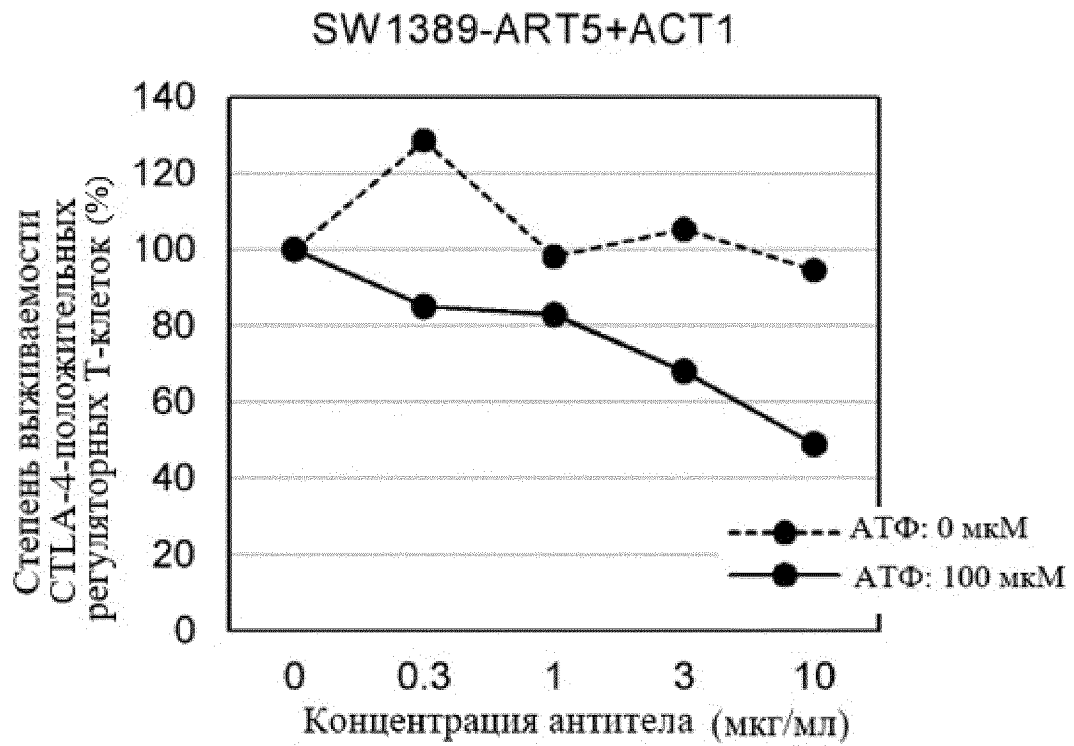
Фигура 43



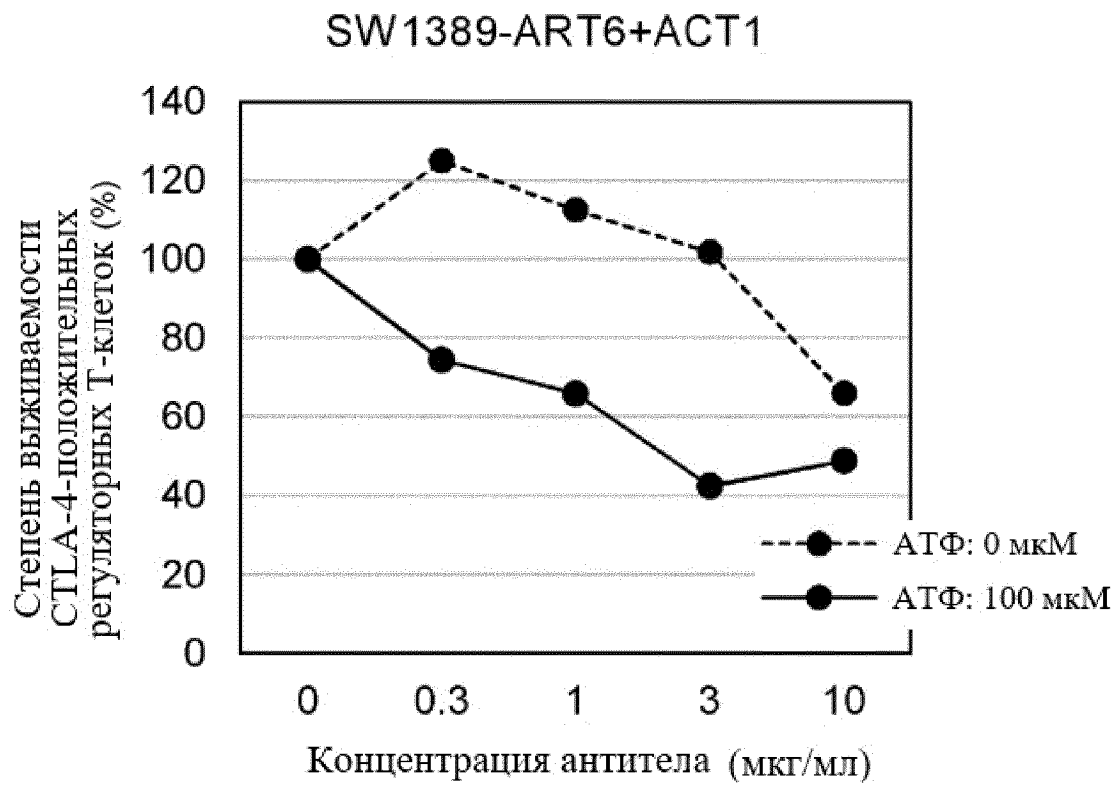
Фигура 44



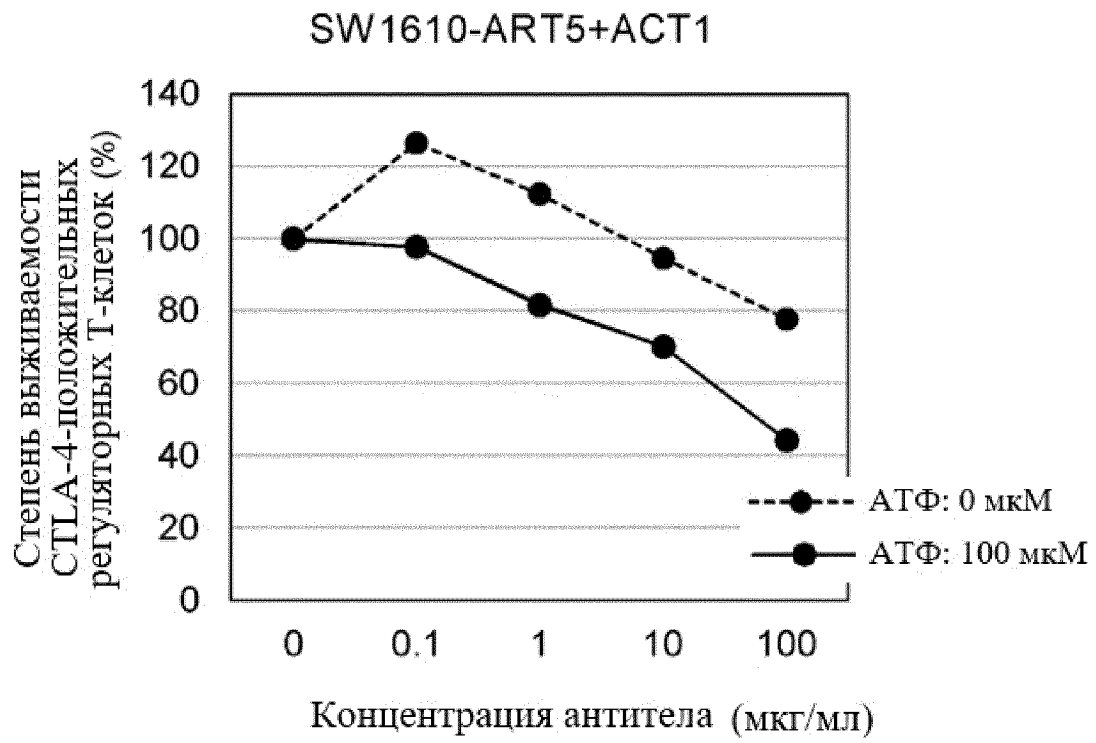
Фигура 45



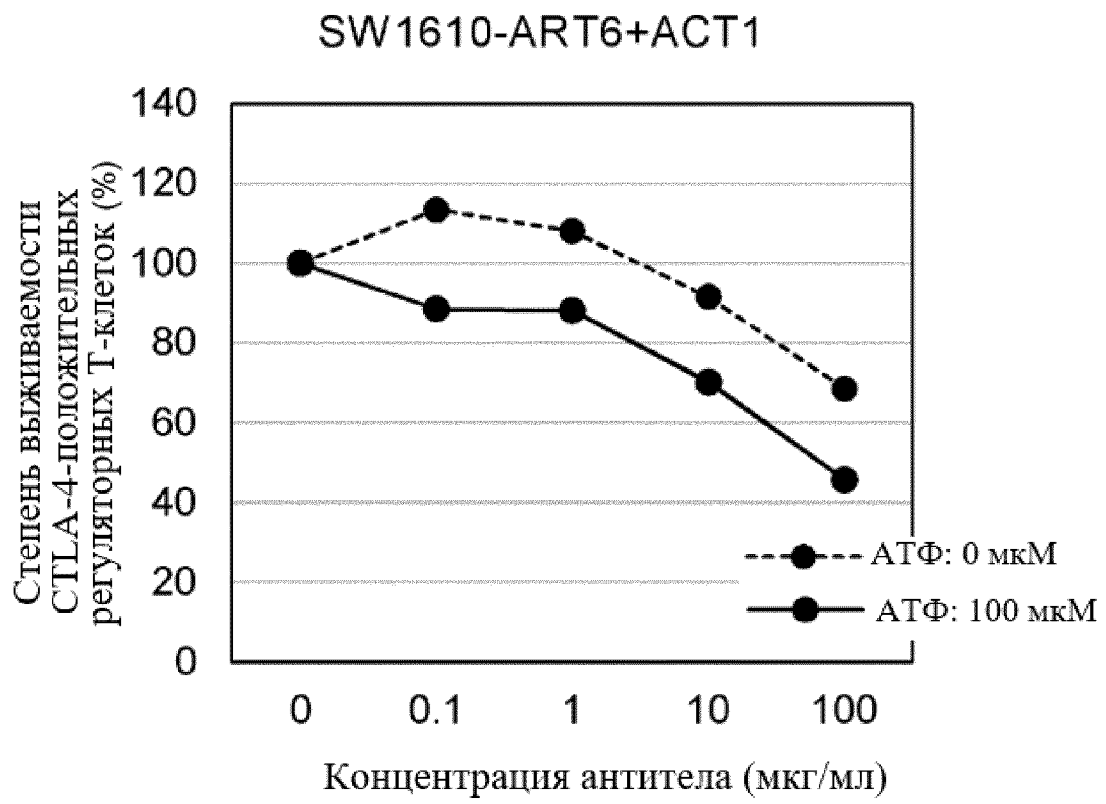
Фигура 46



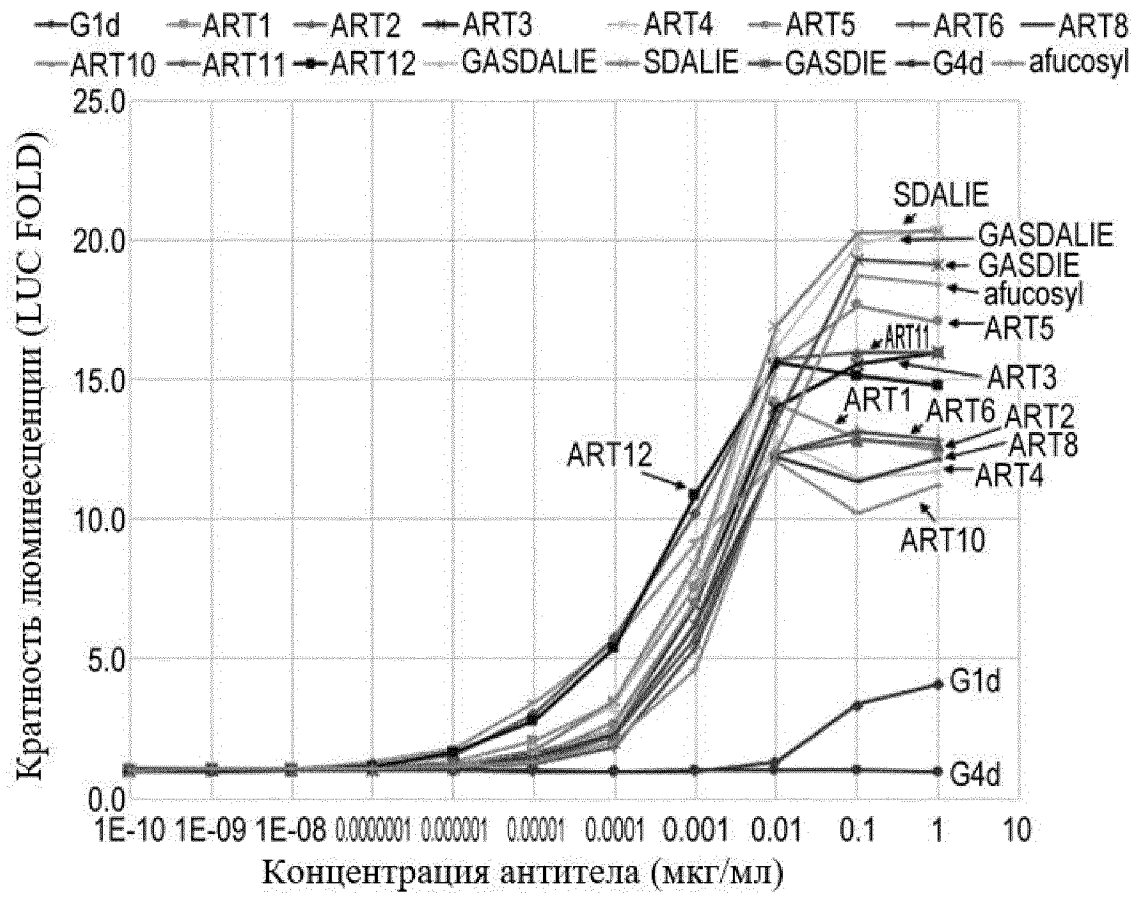
Фигура 47



Фигура 48

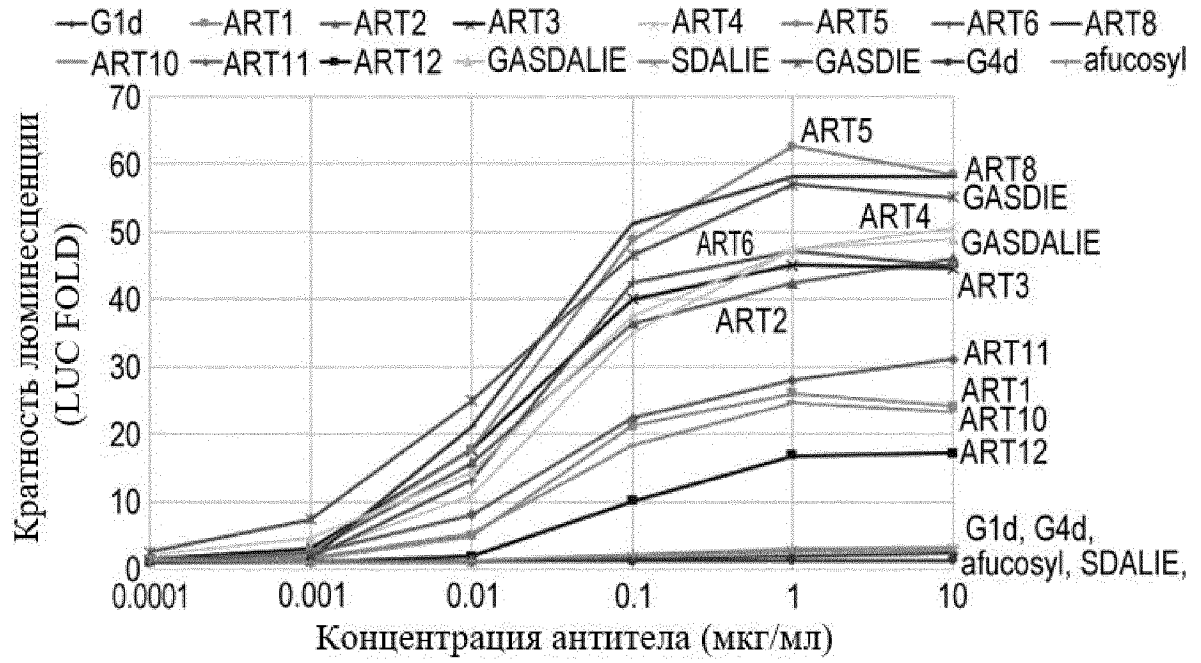


Фигура 49

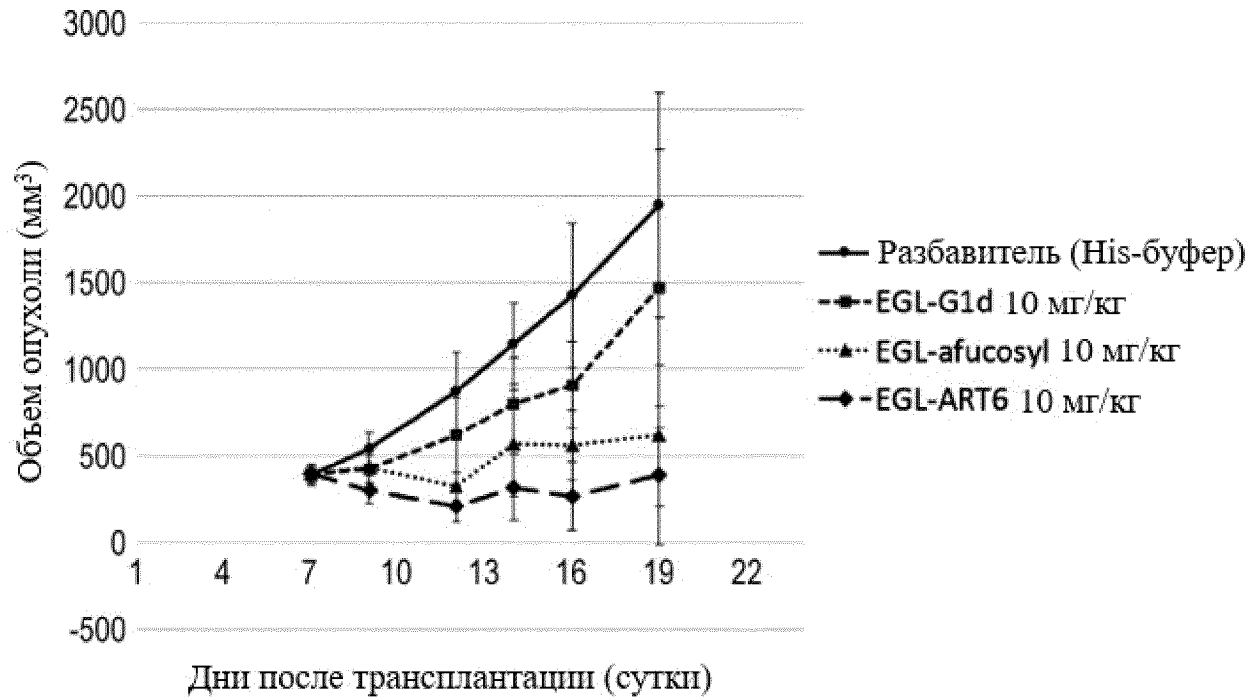


Фигура 50

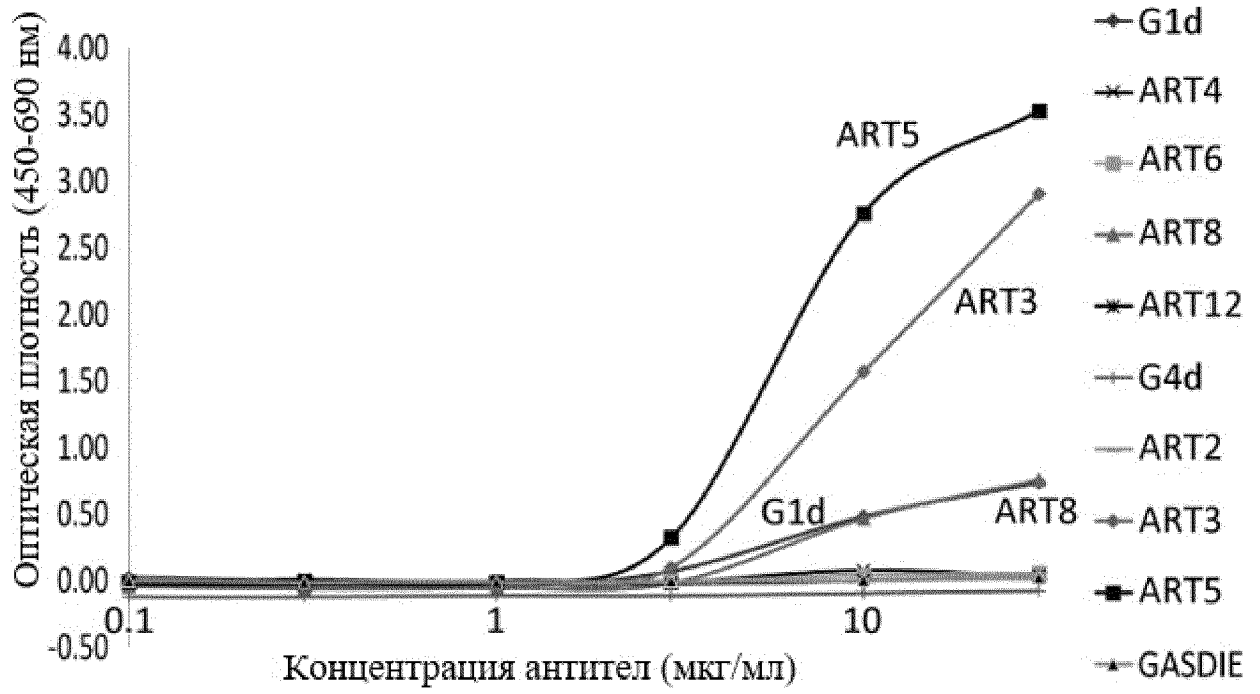




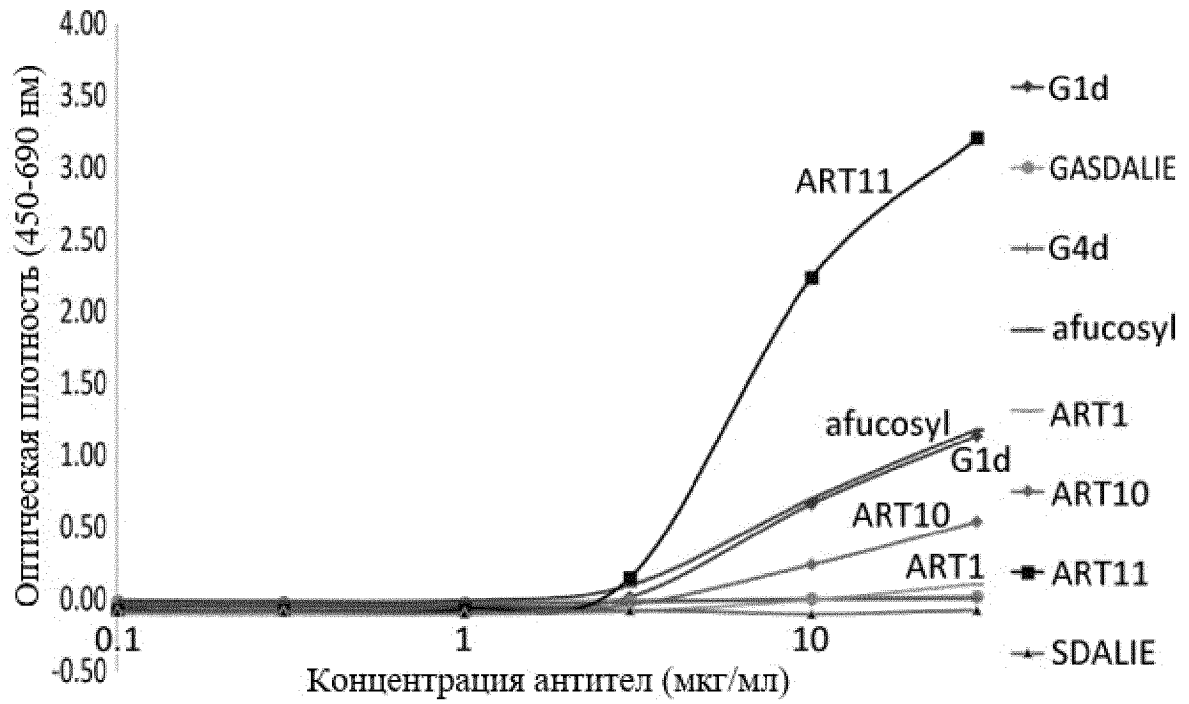
Фигура 51



Фигура 52



Фигура 53



Фигура 54