



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **106050** (13) **C2**
(51) МПК (2014.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2011 03619**
(22) Дата подання заявки: **25.08.2009**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.07.2014**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/091,709, 61/091,694, 61/091,705, 61/211,697**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **25.08.2008, 25.08.2008, 25.08.2008, 02.04.2009**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, US, US, US**
(41) Публікація відомостей про заявку: **26.09.2011, Бюл.№ 18**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.07.2014, Бюл.№ 14**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2009/004825, 25.08.2009**
(72) Винахідник(и): **Лангерман Соломон (US), Лю Лінда (US)**
(73) Власник(и): **АМПЛІМУН, ІНК., 9800 Medical Center Drive, Suite C-120, Rockville, MD 20850, United States of America (US)**
(74) Представник: **Міхашина Людмила Михайлівна, реєстр. №14**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
US 2006/0292593 A1, 28.12.2006
US 2006/0159685 A1, 20.07.2006
US 2007/0231344 A1, 04.10.2007
WO 01/94413 A2, 13.12.2001
WO 93/08120 A1, 29.04.1993
US 2002/091246 A1, 11.07.2002
TSENG SU-YI ET AL: "B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, UNITED STATES, vol. 193, no. 7, 2 April 2001 (2001-04-02), pages 839-845
OZKAYNAK E ET AL: "Programmed Death-1 Targeting Can Promote Allograft Survival", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 169, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 6546-6553
GREENWALD R J ET AL: "Negative co-receptors on lymphocytes", CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, OXFORD, GB, vol. 14, no. 3, 1 June 2002 (2002-06-01), pages 391-396
YOUNGNAK P ET AL: "Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 307, no. 3, 1 August 2003 (2003-08-01), pages 672-677

(54) КОМБІНАЦІЯ АНТАГОНІСТА PD-1 ТА ПОТЕНЦІЮЮЧОГО АГЕНТА ДЛЯ СТИМУЛЮВАННЯ Т-КЛІТИННОЇ ВІДПОВІДІ

(57) Реферат:

Описані способи лікування раку й інфекційних захворювань із застосуванням схеми лікування, що включає себе введення сполуки, яка зменшує передачу інгібіторного сигналу в Т-клітини, в

UA 106050 C2

поєднанні з потенціювальним агентом, як-от циклофосфамід, для отримання ефективних Т-клітинно-опосередкованих відповідей. Також розкриті композиції, що включають у себе антагоністи PD-1 та потенціювальні агенти, застосовні в способах за винаходом.

Дана заявка посилається на пріоритет попередніх заявок США № 61/211697, зареєстрованої 2 квітня 2009, 61/091694, зареєстрованої 25 серпня 2008, 61/091709 зареєстрованої 25 серпня 2008, і 61/091705 зареєстрованої 25 серпня 2008, розкриття яких включені за допомогою посилання в даному описі в усій повноті.

5 Галузь техніки, до якої належить винахід

Даний винахід стосується терапевтичних композицій, що містять сполуку, яка перешкоджає передачі інгібіторного сигналу на Т-клітини в комбінації з потенціювальними агентами, і застосування вказаних компонентів разом або окремо для індукції Т-клітинних відповідей, важливих для лікування захворювання.

10 Рівень техніки винаходу

Відповідь Т-лімфоцитів на хворобливі стани, такі як інфекція й хронічні захворювання, подібні до раку, є складною й включає міжклітинні взаємодії і продукцію розчинних медіаторів (називаних цитокінами або лімфокінами). Активація Т-клітин зазвичай залежить від антигенспецифічного сигналу в результаті контакту Т-клітинного рецептора (TCR) з антигенним пептидом, представленим за допомогою головного комплексу гістосумісності (MHC), тоді як міра вказаної реакції контролюється позитивними й негативними незалежними сигналами, що випускаються низкою коstimуляторних молекул. Вказані молекули зазвичай є членами сімейства CD28/B7. Навпаки, білок програмованої загибелі клітин-1 (PD-1) є членом сімейства рецепторів CD28, який передає негативну імунну відповідь, коли він індукований, на Т-клітини. Контакт між PD-1 і одним з його лігандів (B7-H1 або B7-DC) індукує інгібіторну відповідь, яка зменшує розмноження Т-клітин і силу і тривалість Т-клітинної відповіді.

Таким чином, Т-лімфоцитарна відповідь регулюється різними чинниками, що включають молекули клітинної поверхні, які працюють як рецептори, де рецептори включають комплекс TCR, а також інші молекули клітинної поверхні.

25 В цілому, антигенспецифічна Т-клітинна відповідь опосередковується двома сигналами: 1) взаємодія TCR з антигенним пептидом, представленим в оточенні HC (сигнал 1), і 2) другий антигенезалежний сигнал, передаваний за допомогою контакту між різними парами рецептор/ліганд (сигнал 2). Вказаний "другий сигнал" є критичним для визначення типу Т-клітинної відповіді (активація або толерантність), а також для сили й тривалості вказаної відповіді, й регулюється позитивними й негативними сигналами від коstimуляторних молекул, таких як сімейство білків B7.

Найдетальніше охарактеризованим Т-клітинним шляхом є B7-CD28, в якому B7-1 (CD80) і B7-2 (CD86), кожен, можуть залучати стимулюючий рецептор CD28 та інгібуючий рецептор CTLA-4 (CD152). У поєднанні з передачею сигналу за допомогою Т-клітинного рецептора, зв'язування CD28 збільшує антигенспецифічну проліферацію Т-клітини, збільшує продукцію цитокинів, стимулює диференціювання й ефекторну функцію, й сприяє виживаності Т-клітини (Lenshow, et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 14:233-258 (1996); Chambers і Allison, *Curr. Opin. Immunol.*, 9:396-404 (1997); і Rathmell і Thompson, *Annu. Rev. Immunol.*, 17:781-828 (1999)). Навпаки, вважають, що передача сигналу через CTLA-4 служить для передачі негативного сигналу, який інгібує Т-клітинну проліферацію, продукцію IL-2 і розвиток клітинного циклу (Krummel і Allison, *J. Exp. Med.*, 183:2533-2540 (1996); і Walunas, et al., *J. Exp. Med.*, 183:2541-2550 (1996)). Інші члени сімейства B7 коstimуляторних молекул включають B7-H1 (Dong, et al., *Nature Med.*, 5:1365-1369 (1999); і Freeman, et al., *J. Exp. Med.*, 192:1-9 (2000)), B7-DC (Tseng, et al., *J. Exp. Med.*, 193:839-846 (2001); і Latchman, et al., *Nature Immunol.*, 2:261-268 (2001)), B7-H2 (Wang, et al., *Blood*, 96:2808-2813 (2000); Swallow, et al., *Immunity*, 11:423-432 (1999); і Yoshinaga, et al., *Nature*, 402:827-832 (1999)), B7-H3 (Chapoval, et al., *Nature Immunol.*, 2:269-274 (2001)) і B7-H4 (Choi, et al., *J. Immunol.*, 171:4650-4654 (2003); Sica, et al., *Immunity*, 18:849-861 (2003); Prasad, et al., *Immunity*, 18:863-873 (2003); і Zang, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100:10388-10392 (2003)). B7-H5 (описаний у WO 2006/012232) є нещодавно відкритим членом сімейства B7.

50 Молекули сімейства B7 мають мембранний проксимальний домен і мембранний дистальний домен IGV (варіабельний) IGC (константний). Сімейство CD28-подібних рецепторів вказаних лігандів має загальний позаклітинний IgV-подібний домен. Взаємодії пар рецептор-ліганд опосередковують, головним чином, через залишки IgV-доменів лігандів і рецепторів (Schwartz, et al., *Nature Immunol.*, 3:427-434 (2002)). В цілому, IgV-домени, описують як такі, що містять два аркуші, кожен з яких містить шар β-тяжів (Williams і Barclay, *Annu. Rev. Immunol.*, 6:381-405 (1988)). Передній і задній аркуші CTLA-4 містять ланцюги A'GFC'C і ABEDC, відповідно (Ostrov, et al., *Science*, 290:816-819 (2000)), тоді як передній і задній аркуші IgV-доменів B7 утворені з ланцюгів AGFCCC» і BED, відповідно (Schwartz, et al., *Nature*, 410:604-608 (2001); Stamper, et al., *Nature*, 410:608-611 (2001); і Ikemizu, et al., *Immunity*, 12:51-60 (2000)). Кристалографічний аналіз показав, що поверхня зв'язування CTLA-4/B7 має вирішальну роль при взаємодії CDR3-

аналогічної петлі CTLA-4, що складається з мотиву MYPPPY, з поверхнею B7, утвореною переважно ланцюгами G, F, C, C' і C" (Schwartz, et al., *Nature*, 410:604-608 (2001); і Stamper, et al., *Nature*, 410:608-611 (2001)). Дані, отримані на основі амінокислотної гомології, мінливості й комп'ютерного моделювання, підтверджують концепцію, що вказаний мотив також є головним B7-зв'язуючим сайтом для CD28 (Bajorath, et al., *J. Mol. Graph. Model.*, 15:135-139 (1997)). Хоча мотив MYPPPY не є консервативним в ICOS, досліджений рецептор B7-H2 показав, що родинний мотив, що містить послідовність FDPPPF і розташований в аналогічному положенні, є головною детермінантою для зв'язування ICOS з B7-H2 (Wand, et al., *J. Exp. Med.*, 195:1033-1041 (2002)). B7-DC (називаний також PD-L2 або CD273) є відносно новим членом сімейства B7, і має амінокислотну послідовність, яка приблизно на 34 % ідентична послідовності B7-H1 (званого також PD-L1). Ортологи B7-DC людини й миші характеризуються приблизно 70 %-ною ідентичністю за амінокислотною послідовністю. Попри те, що транскрипти B7-H1 і B7-DC виявлені в різних тканинах (Dong, et al., *Nature Med.*, 5:1365-1369 (1999); Latchman, et al., *Nature Immunol.*, 2:261-268 (2001); і Tamura, *Blood*, 97:1809-1816 (2001)), профілі експресії білків абсолютно різні. B7-H1 широко експресується на багатьох типах тканин і клітин, тоді як експресія B7-DC обмежується, головним чином, активованими дендритними клітинами (DC) і макрофагами.

Показано, що B7-H1 і B7-DC зв'язуються з PD-1 (Freeman, et al., *J. Exp. Med.*, 192:1027-1034 (2000)), віддаленим членом сімейства CD28 з імунорецепторним тирозиновим інгібуючим мотивом (ITIM) у цитоплазматичному домені (Ishida, et al., *EMBO J.*, 11:3887-3895 (1992)). PD-1, член сімейства рецепторів CD28, індукований експресується на активованих Т-клітинах, В-клітинах, натуральних кілерних (NK) клітинах, моноцитах, DC і макрофагах (Keir, et al. *Curr. Opin. Immunol.* 19:309-314 (2007)).

Основним результатом зв'язування PD-1 з його лігандами є інгібування передачі сигналу після Т-клітинного рецептора (TCR). Отже, сигнальна трансдукція за допомогою PD-1 зазвичай надає супресивний або інгібіторний сигнал Т-клітині, що приводить до зменшення Т-клітинної проліферації або іншого зменшення Т-клітинної активації. B7-H1 є основним лігандом PD-1, що викликає передачу інгібіторного сигналу в Т-клітині. Даний винахід вирішує проблему небажаного Т-клітинного інгібування за допомогою надання агентів, які зв'язуються з PD-1 і, таким чином, запобігають передачі інгібіторного сигналу, або інакше зв'язуються з лігандами PD-1, такими як B7-H1, тим самим, запобігаючи зв'язуванню ліганду з PD-1 для передачі інгібіторного сигналу. І в тому і в іншому випадку стимулюються Т-клітинні відповіді, такі як Т-клітинна проліферація або активація.

B7-H1 є головним лігандом PD-1, ймовірно унаслідок його ширшого поширення й вищих рівнів експресії. Інгібування PD-1 відбувається, лише якщо PD-1 і TCR тісно зв'язані один з одним в контексті імунного синапсу. PD-1 і його ліганди були предметом обговорення декількох оглядових статей.

Підвищена експресія B7-H1 також спостерігається при багатьох видах раку (включаючи рак молочної залози, колоректальний рак, рак стравоходу, рак шлунку, гліому, лейкемію, рак легенів, меланому, множинну мієлому, рак яєчників, рак підшлункової залози, нирковоклітинну карциному й рак уротелію), і пов'язана з несприятливим прогнозом. B7-H1 експресується багатьма лініями пухлинних клітин, особливо після стимуляції інтерфероном гамма (IFN- γ), і також активується на інфільтруючих пухлину мієлоїд-залежних супресорних клітинах (MDSC). Наприклад, PD-1 активується на специфічних для пухлини Т-клітинах CD8 і асоціюється з функціональною недостатністю, анергією, виснаженням і апоптозом. Підвищення експресії PD-1 також асоційовано з дисфункціональними й супресивними фенотипами додаткових типів клітин, таких як регуляторні Т-клітини (Treg) і натуральні кілерні Т-клітини (NKT).

Даний винахід використовує вказані молекулярні функції шляхом надання схем лікування захворювань за допомогою збільшення Т-клітинної активності, зокрема лікування раку й інфекційних захворювань.

Суть винаходу

У одному аспекті даний винахід відноситься до способу збільшення Т-клітинних відповідей, наприклад, на антиген, у ссавця, який потребує такого збільшення, що включає введення вказаному ссавцеві сполуки, яка зменшує передачу інгібіторного сигналу в імунні клітини, особливо в Т-клітині, і потенціювального агента, де вказана схема лікування є ефективною для збільшення Т-клітинної відповіді в указаного ссавця.

Сполуки, застосовні в схемі лікування винаходу, включають сполуки, які зв'язуються й блокують рецептори PD-1 на Т-клітинах без ініціації передачі інгібіторного сигналу, сполуки, які зв'язуються з лігандами PD-1 для запобігання їх зв'язуванню з PD-1, сполуки, які виконують обидві вказані функції, й сполуки, які запобігають експресії генів, які кодують або PD-1, або

природні ліганди PD-1. Вказані сполуки позначають в описі як "антагоністи PD-1". Сполуки, які зв'язуються з природними лігандами PD-1, включають сам PD-1, а також активні фрагменти PD-1, і в разі ліганду B7-H1 білки й фрагменти B7.1. Вказані антагоністи включають білки, антитіла, антисмислові молекули й невеликі органічні сполуки. В переважному втіленні вказана Т-клітинна відповідь перевищує відповідь, вироблювану окремо вказаним антагоністом PD-1 або вказаним потенціовальним агентом, коли один з них вводять без іншого.

В іншому варіанті здійснення винаходу сполуками, використовуваними в способах винаходу, є сполуки, які зв'язуються з молекулами Т-клітинної поверхні, такими як CTLA4, щоб запобігти інгібіторним сигналам, запущеним за допомогою зв'язування їх природних лігандів, або сполуки, які зв'язуються з вказаними природними лігандами. Такі антагоністи включають білки, антитіла, антисмислові молекули й малі органічні молекули.

У загальному варіанті здійснення винаходу сполуки, вживані у схемах лікування і композиціях даного винаходу, включають сполуки, які зв'язуються з PD-1 без ініціації, індукції, збільшення, полегшення й/або дозволу співзв'язування PD-1 з TCR.

Переважні сполуки, які запобігають передачі інгібіторного сигналу через PD-1 і, таким чином, діють як антагоністи PD-1 включають у себе, але без обмеження, поліпептиди B7-DC, особливо їх розчинні частини, що містять їх активні фрагменти, їх варіанти і гомологи, а також гібридні білки, що включають будь-яке з вищепереліченого, які зв'язуються з PD-1 без ініціації передачі інгібіторного сигналу. В переважних втіленнях B7-DC включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, 2, 3 або 4. Переважними є сполуки, що включають розчинний домен B7-DC (тобто, без трансмембранної послідовності). Відповідні фрагменти поліпептидів B7-DC включають фрагменти, що містять домени IG1V і/або IG2C або фрагменти, що містять лише домен IG1V, причому домен IG1V є переважним втіленням і амінокислоти 20-121 SEQ ID NO: 1 є переважним прикладом домену IG1V.

Переважні антагоністи PD-1 також включають, але без обмеження активні фрагменти природних лігандів PD-1, такі як поліпептиди B7-H1 (розкриті в патенті США No. 6803192, який включений в опис у всій повноті за допомогою посилання), особливо їх розчинні частини, включаючи їх варіанти й гомологи, а також гібридні білки, що включають будь-яке із згаданого вище, які зв'язуються з PD-1 без ініціації передачі інгібіторного сигналу.

Переважні сполуки винаходу також включають, але без обмеження, сполуки, включаючи їх активні фрагменти, варіанти і гомологи, які зв'язуються з природними лігандами PD-1, наприклад, фрагменти B7-1, які зв'язуються з B7-H1, а також гібридні білки, що містять будь-яке з вищепереліченого, які зв'язуються з лігандами PD-1 для запобігання їх зв'язуванню з PD-1 з ініціацією передачі інгібіторного сигналу.

В іншому втіленні композиції й способи їх застосування включають комбінацію антагоніста рецептора PD-1, який зв'язується з рецептором PD-1 і блокує його, і окремий антагоніст рецептора PD-1, який зв'язується з лігандами рецептора PD-1 і блокує їх. Інше втілення даного винаходу представляє антагоністи рецептора PD-1, які зв'язуються з рецептором PD-1 без ініціації передачі інгібіторного сигналу через рецептор PD-1 і також мають здатність зв'язуватися і виступати як антагоністи лігандів рецептора PD-1, таких як B7-H1, які інакше ініціювали б передачу інгібіторного сигналу через рецептор PD-1. Інші передбачені антагоністи рецептора PD-1 включають біспецифічні антитіла, які можуть зв'язуватися як з рецептором PD-1, так і з лігандами рецептора PD-1.

Переважні втілення сполук, уживаних в даному винаході, також включають антитіла, які зв'язуються з PD-1 або CTLA4, тим самим, зменшуючи або припиняючи передачу інгібіторного сигналу, опосередкованого вказаними джерелами. Переважні сполуки для застосування в способах винаходу також включають, але без обмеження, активні фрагменти лігандів CTLA4 (такі як B7-1 і B7-2), які зв'язуються з CTLA4, для зменшення подальших інгібіторних сигналів, але не зв'язуються з CD28 або інакше вони інгібуватимуть позитивну сигнальну трансдукцію, передавану за допомогою CD28.

Переважні сполуки, які запобігають передачі інгібіторного сигналу через PD-1 і, таким чином, діють як антагоністи PD-1 включають, але без обмеження, антагоністи B7-DC, особливо їх розчинні частини, включаючи їх активні фрагменти, їх варіанти і гомологи, а також гібридні білки, що включають будь-яке з вищепереліченого, які зв'язуються з B7-DC.

У одному варіанті здійснення поліпептиди B7-DC, їх фрагменти або варіанти сполучають з іншими поліпептидами з утворенням гібридних білків, які антагоністично взаємодіють з рецептором PD-1 шляхом зв'язування з рецептором PD-1, не викликаючи передачі інгібіторного сигналу через PD-1, тим самим зменшуючи або перешкоджаючи зв'язуванню ліганду з PD-1, особливо зв'язуванню B7-H1, і перешкоджаючи таким чином передачі інгібіторного сигналу через рецептор PD-1. Прикладами вказаних гібридних білків є поліпептиди, що містять

амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9, 10, 12 або 13, а також їх гомологи. В одному переважному варіанті здійснення, весь або частина позаклітинного домену (ECD) B7-DC є частиною гібридного білка, в якому вказана частина сполучена з другим поліпептидом, що містить Fc-частину імуноглобуліну. Переважним прикладом вказаного білка є B7-DC-Ig, особливо в тих випадках, коли вказана структура є частиною гомодимеру, в якому дві молекули B7-DC-Ig сполучено один з одним, наприклад, за допомогою дисульфідного зв'язку.

У конкретних втіленнях фрагменти, використовувані в сполуках винаходу складаються щонайменше з 10, 15, 25, 50, 75, 100, 150, 200 або більш розташованих рядом амінокислот поліпептиду, що має бажану антагоністичну активність. Вказані фрагменти зазвичай також є частиною гібридних білків, призначених для застосування у винаході.

У іншому аспекті даний винахід відноситься до способу збільшення Т-клітинних відповідей у ссавця, який цього потребує, що включає введення вказаному ссавцеві ефективної схеми лікування, що містить антитіло анти-PD-1 і потенціовальний агент, де вказана схема лікування є ефективною для збільшення Т-клітинного відповіді в вказаного ссавця.

У іншому аспекті даний винахід відноситься до способу збільшення Т-клітинних відповідей у ссавця, який цього потребує, що включає призначення вказаному ссавцеві ефективної схеми лікування, що включає імуномодулятор і потенціовальний агент, де вказана схема лікування є ефективною для збільшення Т-клітинної відповіді в вказаного ссавця. Вказані імуномодулятори включають молекули, які є антагоністами інших рецепторів сімейства CD28 (наприклад, CTLA4), які інгібують Т-клітинні відповіді. У переважному варіанті здійснення використовують антитіло анти-CTLA4 і потенціовальний агент. Додаткові імуномодулятори включають: молекули, які є антагоністами рецепторів сімейства CD28 (такі як CD28 і ICOS), які активують Т-клітинні відповіді; молекули, які є антагоністами лігандів сімейства B7 (такі як B7-H1, B7-DC, B7-H4), які інгібують Т-клітинні відповіді; й молекули, які є антагоністами лігандів сімейства B7 (такі як B7.1 і B7.2), які активують Т-клітинні відповіді.

У додаткових втіленнях будь-якого зі способів винаходу, схема лікування сполукою антагоніста PD-1 і потенціовальним агентом далі включає щонайменше один додатковий терапевтичний агент. Передбачені додаткові терапевтичні агенти включають імуномодулювальні агенти. Типові імуномодулювальні агенти для вказаних способів включають антитіла анти-PD-1 і анти-CTLA4.

У одному варіанті здійснення потенціовальний агент вибраний з циклофосфаміду й аналогів циклофосфаміду, сунітинібу (сутент), анти-TGF β й іматинібу (глівак), інгібітору мітозу, такого як паклітаксел, інгібітору ароматази, такого як летрозол, антагоніста аденозинового рецептора A2a (A2AR), інгібітору ангіогенезу, антрацикліни, оксалиплатин, доксорубіцин, антагоністів TLR4 і антагоністів IL-18. Деякі з вказаних агентів зменшують кількість Treg (тобто, регуляторних Т-лімфоцитів або T-reg) в мікрооточенні пухлини. В іншому варіанті здійснення способи й композиції винаходу розглядають, зокрема, застосування відповідного ад'юванта як частина вказаного способу й композиції.

Відповідно до винаходу Т-клітини можуть контактувати з антагоністом рецептора PD-1 і з його композиціями, що містять потенціовальний агент in vitro, ex vivo або in vivo. Контакт Т-клітин із застосуванням антагоністів рецептора PD-1 і їх композицій, що містять потенціовальний агент, може відбуватися до, під час або після активації Т-клітини.

У конкретному варіанті здійснення молекулу, яка запобігає або зменшує передачу інгібіторного сигналу через PD-1, і потенціовальний агент вводять у різні моменти часу, наприклад, коли потенціовальний агент вводять перед введенням антагоніста PD-1. Вказане введення може відбуватися в поєднанні з введенням додаткового терапевтичного агента.

У конкретних втіленнях будь-якого зі способів винаходу схема лікування включає введення потенціовального агента щонайменше за 1 годину, або щонайменше за 2 години, або щонайменше за 3 години, або щонайменше за 5 годин, або щонайменше за 10 годин, або щонайменше за 15 годин, або щонайменше за 20 годин, або щонайменше за 24 години, або щонайменше за 30 годин або ще більше до введення будь-якого одного або всіх з числа антагоніста PD-1, антитіла анти-PD-1, антитіла анти-CTLA4 і додаткових терапевтичних агентів. Введення потенціовального агента може також відбуватися після введення одного або всіх сполук з числа антагоніста PD-1, антитіла анти-PD-1, антитіла анти-CTLA4 і додаткових терапевтичних агентів, наприклад, не більше, ніж через 1 годину, 2 години, 3 години, 5 години, 10 години, 15 години, 20 години, 24 години або аж до 30 годин після введення антагоніста PD-1, або може відбуватися в поєднанні з введенням антагоніста PD-1.

Підвищена Т-клітинна відповідь, отримана в результаті способів винаходу, є достатньою для лікування захворювання, що включає один або більш за види раку, вірусну інфекцію, бактерійну інфекцію й паразитарну інфекцію. При цьому захворюванням є рак, вказаним раком є один вид

раку або більше, вибраний з раку сечового міхура, раку мозку, раку молочної залози, раку шийки матки, раку прямої кишки, раку стравоходу, раку нирок, раку печінки, раку легенів, раку носоглотки, раку підшлункової залози, раку передміхурової залози, раку шкіри, раку шлунку, раку матки, раку яєчників, раку яєчка або гематологічного раку.

5 У іншому аспекті даний винахід включає композиції антагоністів, вживаних у способах винаходу, у фармацевтично прийнятному носіїві, і де вказана молекула, зв'язуюча PD-1, і вказаний потенціовальний агент, представлені кожен у кількості оптимальній, щоб викликати підвищену Т-клітинну стимуляцію.

10 В одному переважному варіанті здійснення винахід включає медичні набори, що містять контейнери для зберігання одного або більш агентів для застосування у винаході разом з фармацевтичними носіями для їх розведення й інструкціями із застосування. Крім того, вказані антагоніст рецептора PD-1 і потенціовальний агент можуть бути представлені у вигляді компонентів в одному контейнері у фармацевтично прийнятному носіїві, якщо вказані компоненти є компонентами, які потрібно ввести одночасно.

15 Короткий опис фігур

На фігурі 1 показано, що B7-DC-Ig зв'язується з PD-1. Мічені B7-DC-Ig інкубували в різних концентраціях з клітинами лінії CHO, конститутивно експресуючими PD-1, або з батьківськими клітинами CHO, які не експресують PD-1. Зв'язування аналізували за допомогою проточної цитометрії. Середнє значення інтенсивності флуоресценції (MFI) B7-DC-Ig (вісь y) представлене у вигляді функції від концентрації зонда (вісь x). B7-DC-Ig зв'язується з клітинами CHO.PD-1 (темний кружок), але не з нетрансфікованими клітинами CHO (сірий трикутник).

20 На фігурі 2 показано, що B7-DC-Ig конкурує з B7-H1 за зв'язування з PD-1. Немічений B7-DC-Ig у різних концентраціях спочатку інкубували з клітинами лінії CHO, конститутивно експресуючими PD-1, перед додаванням міченого B7-H1-Ig до клітинної суміші. Середнє значення інтенсивності флуоресценції (MFI) B7-H1-Ig (вісь y) показане у вигляді функції від концентрації доданого конкурента неміченого B7-DC-Ig (вісь x). У міру того, як зростає концентрація неміченого B7-DC-Ig, кількість міченого B7-H1-Ig, що зв'язався з клітинами CHO, зменшується, що показує, що B7-DC-Ig конкурує з B7-H1 за зв'язування з PD-1.

30 На фігурі 3 представлені результати експериментів, у яких комбінація циклофосфаміду (CTX або Цитоксан®) і димерний мишачі B7-DC-Ig викликали в результаті знищення прищеплених пухлин CT26 (карцинома товстої кишки) у мишей. На графіці А показаний об'єм пухлини (мм³) проти днів після щеплення пухлини у мишей, що отримували 100 мг/кг CTX на 10-й день, тоді як на графіці В показаний об'єм пухлини (мм³) проти днів після щеплення пухлини у мишей, що отримали CTX на 10-й день, наступного дня після першого введення B7-DC-Ig. Кожна лінія на кожному графіку відповідає одній миші. Чорна стрілка позначає введення B7-DC-Ig. На графіці С показані середні значення об'єму пухлини.

35 На фігурі 4 показані результати експериментів, у яких комбінація CTX і димерного мишачого B7-DC-Ig знищувала прищеплені пухлини CT26 (карцинома товстої кишки) у мишей і захищала при повторному введенні CT26. Мишам, які отримали CTX і B7-DC-Ig і в яких не виявили пухлинного зростання на 44-й день після щеплення пухлини, повторно щепили пухлину. Пізніше мишам знову проводили повторне введення пухлинних клітин на 70-й день. В жодній з мишей не спостерігали пухлинного зростання до 100-го дня.

45 На фігурі 5 показано, що лікування CTX і B7-DC-Ig приводило до формування специфічних для пухлини CTL пам'яті. Мишам зі знищеними підшкірними пухлинами CT26, що прижилися, після лікування CTX і B7-DC-Ig повторно щепили клітини CT26. Опісля сім днів виділяли спленоцити й активували або яєчним альбуміном, іррелевантним пептидом, або AN1, CT26-специфічним пептидом. Клітини забарвлювали спочатку антитілом анти-CD8 подальшим внутріклітинним фарбуванням антитілом анти-IFN γ перед аналізом FACS.

50 На фігурі 6 показані ефекти різних доз B7-DC-Ig в комбінації з CTX на знищення прищеплених пухлин CT26 у мишей. Мишам породи Balb/C у віці 9-11 тижнів щепили підшкірно 1 E05 клітин CT26. На 9-й день мишам вводили IP 100 мг/кг CTX. Через двадцять чотири години, на 10-й день, миші отримували 30, 100 або 300 мкг B7-DC-Ig з подальшими 2 ін'єкціями кожного тижня, всього до 8 введень. Зростання пухлини вимірювали двічі на тиждень.

55 На фігурі 7 представлені результати експериментів, в яких комбінація CTX і антитіла анти-PD-1 викликала знищення прищеплених пухлин CT26 (карцинома товстої кишки) у мишей. На графіці А показаний об'єм пухлини (мм³) залежно від днів після щеплення пухлини у нелікованих мишей (тобто мишей, що отримували лише середовище для ліків), на графіці В представлений об'єм пухлини (мм³) залежно від днів після щеплення пухлини у мишей, що отримували лише анти-PD-1, починаючи з 11-го дня, по 300 мкг на ін'єкцію, 3 рази на тиждень, 60 до 12 ін'єкцій, і на графіці С показаний об'єм пухлини (мм³) залежно від днів після щеплення

пухлини у мишей, отримуючих СТХ на 11-й день і перше введення анти-PD-1 на 12-й день, по 300 мкг на ін'єкцію, 3 рази на тиждень, до 12 ін'єкцій. Кожна лінія на кожному графіку позначає одну мишу. Чорна стрілка вказує введення анти-PD-1.

На фігурі 8 представлені результати експериментів, у яких комбінація СТХ і антитіла анти-CTLA4 приводила до знищення прищеплених пухлин СТ26 (карцинома товстої кишки) у мишей. Тут на графіці А показаний об'єм пухлини (мм³) залежно від днів після введення пухлини у мишей, що отримали 100 мкг/кг СТХ на 11-й день, тоді як на графіці В показаний об'єм пухлини (мм³) залежно від днів після введення пухлини у мишей, отримуючих СТХ на 11-й день і анти-CTLA4 на 12-й день, в дозі 100 мкг на ін'єкцію, двічі на тиждень, всього до 8 ін'єкцій. Кожна лінія на кожному графіку позначає одну мишу. Чорна стрілка вказує введення анти-CTLA-4.

На фігурі 9 представлені результати експериментів, у яких мишам породи Balb/C у віці 9-11 тижнів прищеплювали 1105 клітин СТ26 підшкірно. На 9-й день мишам вводили 100 мкг/кг СТХ, ІР. Через двадцять чотири години, на 10-й день, мишам вводили 100 мкг В7-DC-Ig. У експерименті використовували 5 груп: інтактні миші, яким не вводили яких-небудь пухлинних клітин, миші, яким вводили середовище для ліків, лише СТХ, СТХ+В7-DC-Ig або лише В7-DC-Ig. Дві інтактні миші і 4 миші з інших груп були видалені з дослідження на 11-й день (2 дні після СТХ) і на 16-й день (7 днів після СТХ) для аналізу Т-клітин. Ліва панель показує, що на 11-й день, через 2 дні після ін'єкції СТХ, кількість Treg в селезінці мишей, отримуючих СТХ, було значно нижче, ніж кількість Treg у мишей, яким прищеплювали пухлину і вводили середовище для ліків. Права панель показує, що на 16-й день, через 7 днів після введення СТХ і через 6 днів після введення В7-DC-Ig, В7-DC-Ig істотно зменшував кількість CD4+Т-клітин, експресуючих високий рівень PD-1. Вказане зниження спостерігали як у мишей, отримуючих В7-DC-Ig, так і у мишей, отримуючих СТХ+В7-DC-Ig. Передбачали, що миші з прищепленими пухлинними клітинами мало більше PD-1+/CD4+ Т-клітин в дренажному лімфовузлі, в порівнянні з інтактними мишами.

На фігурі 10 представлені результати експериментів, у яких комбінація СТХ і В7-DC-Ig приводила до збільшення виживаності у мишей при введенні в хвостову вену пухлинних клітин лінії простати мишей. Клітини SP-1 виділяли з легких мишей, у яких розвивалися метастази в результаті ін'єкції клітин пухлини простати TRAMP. Мишам породи B10.D2 спочатку вводили 3105 клітин SP-1 за допомогою ін'єкції в хвостову вену. В дні 5, 12 і 19 мишам вводили 50 мкг/кг СТХ, де вказано. В дні 6, 13 і 20 мишам вводили 5 мкг/кг В7-DC-Ig, де вказано. Тут "NT" позначає "не оброблений".

Фігура 11. Мишам породи Balb/C у віці 11-13 тижнів вводили ізольовані печінкові метастази за допомогою ін'єкції в частину селезінки з її подальшим видаленням (hemispleen injection technique). Селезінки анестезованих мишей, ділили на дві половини й накладали на половини дужки. Клітини СТ26 (1E05) вводили в одну половину селезінки й через 30 секунд вказану половину селезінки видаляли й накладали дужки на селезінкову дренажну вену. На 10-й день миші отримували 1 ін'єкцію СТХ в дозі 50 мкг/кг, ІР. Через двадцять чотири години, на 11-й день, мишам вводили рекомбінантний пептид лістерії, що несе АН1, імунодомінантний епітоп СТ26, у дозі 0,1 LD50 (1107 КОЕ), потім вводили на 14-й і 17-й дні. Мишам також вводили В7-DC-Ig на 11-й день, і потім на 18-й день. Спостерігали загальну виживаність мишей.

Визначення

Якщо не вказано інакше, всі технічні й наукові терміни, використовувані в описі, мають ті самі значення, що зазвичай розуміються фахівцем у даній галузі техніки, до якої належить розкритий винахід. Зокрема, наступні терміни й фрази мають наступне значення.

Термін "передача інгібіторного сигналу" призначений для позначення будь-якої сигнальної трансдукції, що має ефект відміни, або в інших випадках зменшення Т-клітинних відповідей проти антигену, або за допомогою зменшення Т-клітинної проліферації, або за допомогою іншого інгібіторного механізму, внаслідок чого величина або тривалість імуногенної Т-клітинної відповіді зменшується. Вказана передача інгібіторного сигналу може відбуватися внаслідок зв'язування PD-1 з природним лігандом, наприклад, зв'язування PD-1 з В7-Н1 або когось іншого члена вказаного класу лігандів, В7-DC, або може відбуватися внаслідок зв'язування CTLA4 з лігандами, такими як В7-1 або В7-2. В цілому, сполуки винаходу зменшують вказану передачу інгібіторного сигналу й включають, але без обмеження, антагоністи PD-1 і антагоністи CTLA4.

Термін "антагоніст PD-1" позначає будь-яку молекулу, яка ослабляє передачу інгібіторного сигналу, опосередкованого PD-1, що знаходиться на поверхні Т-клітин, В-клітин, натуральних кілерних (NK) клітин, моноцитів, DC і макрофагів.

Вказаний антагоніст включає молекулу, яка перериває будь-який інгібіторний сигнал, що створюється молекулою PD-1 на Т-клітині. В конкретних прикладах винаходу антагоніст PD-1 є молекулою, яка інгібує, зменшує, відмінює або іншим способом зменшує передачу інгібіторного

сигналу через PD-1 рецепторний сигнальний шлях. Вказане зниження може відбуватися, у випадку якщо: (i) антагоніст PD-1 винаходу зв'язується з рецептором PD-1 без ініціації сигнальної трансдукції для зменшення або блокування передачі інгібіторного сигналу; (ii) антагоніст PD-1 зв'язується з лігандом (наприклад, з агоністом) рецептора PD-1, запобігаючи його зв'язуванню з рецептором (наприклад, у тих випадках, коли вказаний агоніст є B7-H1); (iii) антагоніст PD-1 зв'язується, або іншим способом інгібує активність молекули, яка є частиною регуляторного ланцюга, який, коли вона не інгібована, в результаті стимулює або іншим способом сприяє передачі PD-1 інгібіторного сигналу; або (iv) антагоніст PD-1 інгібує експресію рецептора PD-1 або експресію його ліганду, зокрема шляхом зменшення або відміни експресії одного або більш генів, кодуючих PD-1, або одного або більше його природних лігандів. Таким чином, антагоніст PD-1 винаходами є молекулу, яка здійснює зменшення передачі PD-1 інгібіторного сигналу, збільшуючи тим самим Т-клітинну відповідь на один або більше антигенів.

Використовуваний в описі термін "антагоніст CTLA4" позначає сполуку, яка зменшує CTLA4-опосередковане інгібування Т-клітинних реакцій. Наприклад, у Т-клітині CTLA4 доставляє інгібіторний сигнал після зв'язування лігандів B7, таких як B7-1 і B7-2. Антагоніст CTLA4 є антагоністом, який порушує зв'язування вказаних лігандів з CTLA4 на активованих Т-клітинах. У одному варіанті здійснення антагоніст є антитілом анти-CTLA4, яке зв'язується з CTLA4, щоб запобігти зв'язуванню ліганду.

Використовуваний в описі термін "активний фрагмент" стосується частини природного поліпептиду або поліпептиду з високою гомологією послідовностей (наприклад, щонайменше 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 % ідентичності амінокислотної послідовності) з натуральним поліпептидом, і який демонструє активність антагоніста PD-1, наприклад, при зв'язуванні PD-1 або при зв'язуванні з лігандом PD-1. У переважних втіленнях вказаний фрагмент складається з позаклітинного домену (ECD) білка B7-DC, який зв'язується з PD-1, наприклад, SEQ ID NO: 3, переважно з його амінокислот 20-221. В разі поліпептиду PD-1 активним фрагментом є частина вказаного поліпептиду, що включає в себе зв'язуючий домен, який зв'язується з природним лігандом PD-1 для запобігання стимуляції PD-1-опосередкованої передачі інгібіторного сигналу за допомогою вказаного ліганду. Активні фрагменти можуть бути ідентифіковані за їх здатністю конкурувати з молекулою, з якої вони отримані, при зв'язуванні з природним сайтом зв'язування. Наприклад, активні фрагменти конкуруватимуть з B7-DC дикого типу за зв'язування з PD-1.

Відносно антитіла термін "активний фрагмент" означає зв'язуючу для антигену частину антитіла, яка є менше ніж цілісний імуноглобулін. Вказані фрагменти включають Fab і F(ab')₂ фрагменти, здатні реагувати або зв'язуватися з будь-яким з поліпептидів, розкритих у описі, які є рецепторами або лігандами. Вказані фрагменти Fab і F(ab')₂, позбавлені Fc-частини інтактного антитіла, виводяться швидше з циркуляції, і можуть мати менше неспецифічне тканинне зв'язування, ніж інтактне антитіло (Wahl et al., J. Nuc. Med. 24:316-325 (1983)). Також включені Fv-фрагменти (Hochman, J. et al. (1973) Biochemistry 12:1130-1135; Sharon, J. et al. (1976) Biochemistry 15:1591-1594). Вказані різні фрагменти отримують за допомогою звичайних технологічних прийомів, як-от протеазне розщеплювання або хімічне розщеплювання (див., наприклад, Rousseaux et al., Meth. Enzymol., 121:663-69 (1986)).

Використовуваний в описі термін "розчинна частина" антагоніста PD-1 означає частину повнорозмірного поліпептиду, яка не включає яку-небудь частину трансмембранної ділянки або сегменту. Наприклад, відносно B7-DC, розчинна частина включає позаклітинну частину (з N-термінальною сигнальною послідовністю або без неї), але не включає яку-небудь частину трансмембранної ділянки (або, щонайменше, не достатню, щоб зменшити розчинність). Таким чином, ECD B7-DC людини показана як SEQ ID NO: 3 і складається з IgV-подібного і IgC-подібного доменів повнорозмірної молекули (тобто, амінокислоти 20-221 повнорозмірної послідовності (SEQ ID NO: 1)).

Використовуваний в описі "костимуляторний поліпептид" є поліпептидом, який, при взаємодії з молекулою клітинної поверхні на Т-клітинах модулює активність Т-клітини. Таким чином, відповідь Т-клітини може бути ефекторною (наприклад, CTL або антитіло-продукуюча В-клітина) відповіддю, хелперною відповіддю, що забезпечує допомогу одному або більш ефекторним (наприклад, CTL або антитіло-продукуюча В-клітина) відповідям, або супресивною відповіддю.

Використовуваний в описі термін "схема лікування" відноситься до лікування захворювання або до способу досягнення бажаної фізіологічної зміни, такому як збільшена або понижена відповідь імунної системи на антиген або імуноген, наприклад збільшення або зменшення числа або активності однієї або більш клітин, або типів клітин, які залучені в указану відповідь, де вказане лікування або спосіб включає введення тварині, як-от ссавець, зокрема людині,

достатньої кількості двох або більше хімічних агентів або компонентів вказаної схеми для ефективного лікування захворювання або для одержання вказаної фізіологічної зміни, де вказані хімічні агенти або компоненти вводять разом, як частину однієї композиції, або вводять окремо й незалежно в той самий час або в різні моменти часу (тобто введення кожного агента або компонента відокремлене обмеженням періодом часу від введення одного або більш за агентів або компонентів) і де введення вказаного одного або більше агентів або компонентів забезпечує результат, більший за результат, що отримується при введенні будь-якого з указаних агентів або компонентів окремо або ізольовано.

Використовуваний у описі термін "ізольований" призначений для опису сполуки, що становить інтерес, (наприклад, або полінуклеотиду, або поліпептиду), яка знаходиться в оточенні, яке відрізняється від оточення, в якому сполука присутня природним чином, наприклад, виділений зі свого природного середовища, наприклад, за допомогою концентрації поліпептиду до концентрації, в якій він не зустрічається в природі. "Ізольований" призначений для включення сполук, які знаходяться в зразках, які значно збагачені винаходом, що становить інтерес, і в яких сполуку, що становить інтерес, частково або в основному очищають.

Використовуваний в описі термін "поліпептид" стосується ланцюга амінокислот будь-якої довжини, без врахування модифікації (наприклад, фосфорилювання або глікозилювання). Поліпептид даного винаходу може бути рекомбінантним поліпептидом, природним поліпептидом або синтетичним поліпептидом, переважно рекомбінантним поліпептидом.

Використовуваний в описі "варіантний" поліпептид містить щонайменше одну зміну амінокислотної послідовності в порівнянні з амінокислотною послідовністю відповідного поліпептиду дикого типу.

Використовувана в описі "зміна амінокислотної послідовності" може бути, наприклад, заміну, видалення або вставку однієї або більше амінокислот.

Використовувані в описі терміни "частина", "сегмент" і "фрагмент", при використанні відносно поліпептидів, стосуються до безперервної послідовності залишків, наприклад, амінокислотних залишків, послідовність яких утворює частина більшої послідовності. Наприклад, якщо поліпептид обробляли будь-якою зі звичайних ендопептидаз, як-от трипсин або хімотрипсин, олігопептиди, отримані в результаті такої обробки, є частини, сегменти або фрагменти вихідного поліпептиду. "Фрагмент" поліпептиду, таким чином, відноситься до будь-якої частини поліпептиду, яка є коротшим поліпептидом повнорозмірного білка. В цілому, фрагменти матимуть п'ять або більше амінокислот завдовжки.

Похідна, аналог або гомолог поліпептиду (або його фрагменту) винаходу можуть бути (i) поліпептидом, у якому один або більше амінокислотних залишків замінені консервативним або неконсервативним амінокислотним залишком (переважно консервативним амінокислотним залишком) і вказаний заміщений амінокислотний залишок може бути або може не бути залишком, що кодується генетичним кодом, або (ii) поліпептидом, у якому один або більш амінокислотних залишків включають замісну групу, або (iii) поліпептид, у якому зрілий поліпептид сполучають з іншою сполукою, як-от сполука для збільшення часу напівжиття поліпептиду (наприклад, поліетиленгліколь), або (iv) поліпептид, у якому додаткові амінокислоти сполучають із зрілим поліпептидом, таким як лідируюча або секреторна послідовність або з послідовністю, яка застосовується для очищення зрілого поліпептиду або пропротейнової послідовності. Мається на увазі, що вказані похідні й аналоги входять в обсяг знань фахівців у даній галузі техніки, якщо виходити з ідей цього документа.

Використовувана в описі "валентність" належить до доступних сайтів зв'язування в молекулі.

Відповідно до даного винаходу термін "відсоткова ідентичність" або "відсоток ідентичності", коли стосується послідовності, означає, що послідовність порівнюють із заявленою або описаною послідовністю після вирівнювання послідовності, яку потрібно порівняти ("порівнювана послідовність") з описаною або заявленою послідовністю ("референсна послідовність"). Потім відсоткову ідентичність визначають за наступною формулою:

$$\text{Відсоткова ідентичність} = 100[1 - (C/R)]$$

де С є числом відмінностей між референсною послідовністю й порівнюваною послідовністю впродовж довжини вирівнювання між референсною послідовністю й порівнюваною послідовністю, де (i) кожна основа або амінокислота в референсній послідовності, яка не має відповідної вирівнюваної основи або амінокислоти в порівнюваній послідовності і (ii) кожен геп у референсній послідовності й (iii) кожна вирівнювана основа або кожна вирівнювана амінокислота в референсній послідовності, яка відрізняється від вирівнюваної основи або амінокислоти в порівнюваній послідовності, являє собою відмінність; і R є числом основ або амінокислот у референсній послідовності впродовж довжини вирівнювання з порівнюваною послідовністю, з будь-яким гепом, створеним у референсній послідовності, який також вважають основою або

амінокислотою. Якщо має місце вирівнювання між порівнюваною послідовністю й референсною послідовністю, для яких відсоткова ідентичність, як розраховано вище, приблизно рівна або більше, ніж встановлена мінімальна відсоткова ідентичність, у такому разі порівнювана послідовність має встановлену мінімальну відсоткову ідентичність до референсної послідовності, навіть якщо можуть мати місце вирівнювання, в яких вищезгадана розрахована відсоткова ідентичність є меншою, ніж встановлена відсоткова ідентичність.

Використовуваний в описі термін "консервативна заміна амінокислот" означає заміну, при якій замінена амінокислота має схожі структурні або хімічні властивості, й "неконсервативна" заміна амінокислот являє собою заміни, при яких заряд, гідрофобність, або об'єм заміненої амінокислоти істотно відрізняються. Неконсервативні заміни будуть істотніше відрізнятися за їх ефектом на збереження (а) структури пептидного каркаса в області заміни, наприклад, конформації аркуша або спіральної конформації, (b) заряду або гідрофобності молекули в сайті-мішені, або (c) об'єму бічного ланцюга. Приклади консервативних заміन амінокислот включають такі заміни, в яких заміна відбувається в межах однієї з п'яти наступних груп: 1) малі аліфатичні неполярні або слабо полярні залишки (Ala Ser, Thr, Pro, Gly); 2) полярні, негативно заряджені залишки та їхні амідні (Asp, Asn, Glu, Gln); полярні, позитивні заряджені залишки (His, Arg, Lys); великі аліфатичні неполярні залишки (Met, Leu, Ile, Val, Cys); і великі ароматичні залишки (Phe, Tyr, Trp). Прикладами неконсервативних замін амінокислот є заміни, де 1) гідрофільний залишок, наприклад, серил або треонін, замінюють на гідрофобний залишок, наприклад, лейцил, ізолейцил, фенілаланін, валіл або аланін; 2) цистеїн або пролін замінюють на будь-який інший залишок; 3) залишок, що містить позитивно заряджений бічний ланцюг, наприклад, лізил, аргініл або гістидил, замінюють на негативно заряджений залишок, наприклад, глутаміл або аспартил; або 4) залишок, що містить об'ємний бічний ланцюг, наприклад фенілаланін, замінюють на залишок, який не містить бічного ланцюга, наприклад гліцин.

Терміни "індивід", "господар", "суб'єкт" і "пацієнт" використовують в описі взаємозамінно, й вони стосуються ссавця, включаючи, але без обмеження приматів, наприклад, людини, а також гризунів, таких як миші й щури, та інші лабораторні тварини.

Використовуваний в описі термін "ефективна кількість" або "терапевтично ефективна кількість" означає дозу, достатню для лікування, інгібування або зменшення одного або більше симптомів хворобливого стану, який потрібно вилікувати, або для забезпечення іншим способом бажаного фармакологічного й/або фізіологічного ефекту, зокрема, посилення Т-клітинної відповіді до вибраного антигену. Точна доза варіюватиметься відповідно до безлічі чинників, таких як суб'єкт-залежні змінні (наприклад, вік, стан імунної системи тощо), захворювання, й лікування, яке потрібно призначити.

Використовуваний в описі термін "фармацевтично прийнятний носій" включає будь-які й усі розчинники, дисперсні середовища, покриття, антибактеріальні й протигрибкові агенти, ізотонічні й затримуючі абсорбцію агенти тощо. Застосування вказаних середовищ і агентів для фармацевтично активних субстанцій добре відоме в даній галузі техніки. Крім випадків, коли загальноживані середовища або агент несумісні з активною сполукою, передбачається їх застосування в терапевтичній композиції. Додаткові активні сполуки також можуть бути включені в композиції.

Термін "антитіло" призначений для включення інтактних молекул, а також їх фрагментів, які включають антигензв'язуючий сайт. Структура цілого антитіла часто надається у вигляді H_2L_2 і відображає той факт, що антитіла зазвичай містять 2 легких (L) амінокислотних ланцюги й 2 важких (H) амінокислотних ланцюги. Обидва ланцюги містять області, здатні до взаємодії зі структурно комплементарною антигенною мішенню. Області, що взаємодіють з мішенню, позначають як "варіабельні" або "V"-області, і вони характеризуються відмінностями в амінокислотній послідовності від антитіл іншої антигенної специфічності. Варіабельні області H- або L- ланцюгів містять амінокислотні послідовності, здатні до специфічного зв'язування з антигенними мішенями. В межах вказаних послідовностей розташовані менші послідовності, що отримали назву "гіперваріабельних" завдяки їх надзвичайній варіабельності серед антитіл з відмінною специфічністю. Вказані гіперваріабельні області також позначають як "визначальні комплементарності області" або "CDR"-області. Вказані CDR-області відповідають за основну специфічність антитіла відносно певної антигенної детермінантної структури. Областями CDR є неконтактуючі ділянки амінокислот у межах варіабельних областей, але було виявлено, що незалежно від видів, позиційні розташування вказаних критичних амінокислотних послідовностей у межах варіабельних областей важких і легких ланцюгів мають схожі локалізації в амінокислотних послідовностях варіабельних ланцюгів. Варіабельні важкі й легкі ланцюги всіх антитіл, кожен, містять 3 CDR-області, які не стикаються з іншими (L1, що позначаються, L2, L3, H1, H2, H3) для відповідних легких (L) і важких (H) ланцюгів. Поширені

CDR-області описані Kabat et al, J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977). Антитіла, розкриті відповідно до винаходу, також можуть бути повністю синтетичними, в яких поліпептидні ланцюги антитіл синтезовані й, можливо, оптимізовані для зв'язування з поліпептидами, розкритими в описі як рецептори. Вказані антитіла можуть бути химерними або гуманізованими антитілами й

5 можуть бути повністю тетрамерними за структурою, або можуть бути димерними і включати лише один важкий і один легкий ланцюг.

Детальний опис винаходу

Даний винахід надає схему лікування або комбінованої терапії для лікування захворювання у ссавців, що включає сполуку, яка зменшує або припиняє передачу інгібіторного сигналу в Т-клітини, переважно Т-клітини людини, що вводиться у поєднанні з потенціовальним агентом для збільшення імунної відповіді.

Способи винаходу також відносяться до застосування широкого спектру імуномодуляторів і їх композицій. У цілому, підвищена Т-клітинна відповідь, отримана в результаті вказаних способів, є вищою, ніж підвищена Т-клітинна відповідь, отримана в результаті введення аналогічної дози вказаного антагоніста PD-1 або вказаного потенціовального агента окремо.

Розкриті композиції й схеми є корисними для стимулювання або посилення імунних відповідей, що залучають Т-клітини. Таким чином, способи винаходу найбільш корисні в лікуванні хворобливого стану, який може покращитися при збільшенні активності Т-клітин, і де підвищена Т-клітинна відповідь необхідна або достатня для лікування вказаного захворювання, навіть якщо захворювання не викликане специфічно або не обтяжене зниженою Т-клітинною відповіддю. В переважному варіанті здійснення тип захворювання, який/-ому потрібно вилікувати або запобігти, є злоякісною пухлиною або хронічним інфекційним захворюванням, викликаним бактерією, вірусом, простим, гельмінтом або іншим внутріклітинним мікробним патогеном, який піддається атаці цитотоксичних Т-лімфоцитів. Активація Т-клітин з використанням розкритих композицій також корисна для лікування або запобігання станам, що характеризуються імуносупресією.

Відповідно до даного винаходу Т-клітинна відповідь може регулюватися молекулами, які зв'язуються з рецепторами на поверхні Т-клітин, і молекулами, які зв'язуються з лігандами вказаних рецепторів. В разі PD-1, молекули, які зв'язують PD-1 щоб зменшити його інгібіторний ефект, і молекули, які зв'язують один або більш за лігандів PD-1, щоб зменшити їх здатність зв'язуватися з PD-1, мають ефект зменшення здатності PD-1 інгібувати Т-клітинну відповідь, збільшуючи, тим самим, вказану відповідь та її імунологічні ефекти.

А. Антагоністи рецептора PD-1

Надаються композиції, що містять антагоністи рецепторів PD-1 утримують, і вони включають у себе сполуки або агенти, які або зв'язуються з лігандом PD-1 і блокують його, щоб перешкоджати зв'язуванню ліганду з рецептором PD-1 або інгібувати вказане зв'язування, або безпосередньо зв'язуються з рецептором PD-1 і блокують його, не викликаючи передачі інгібіторного сигналу через рецептор PD-1. У іншому варіанті здійснення антагоніст рецептора PD-1 безпосередньо зв'язується з рецептором PD-1 без ініціації передачі інгібіторного сигналу й також зв'язується з лігандом рецептора PD-1, щоб зменшити або інгібувати ініціацію лігандом сигнальної трансдукції через рецептор PD-1. При зменшенні числа й/або кількості лігандів, які зв'язуються з рецептором PD-1 і запускають трансдукцію інгібіторного сигналу, менше число клітин ослабляється негативним сигналом, передаваним за допомогою PD-1-сигнальної трансдукції, і може бути досягнута сильніша імунна відповідь.

Відповідно до даного винаходу сигнальна система PD-1 вимагає зв'язування з лігандом PD-1 (таким як B7-H1 або B7-DC) у безпосередній близькості з пептидним антигеном, представленим головним комплексом гістосумісності (MHC) (див., наприклад, Freeman Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 105:10275-10276 (2008)). Отже, білки, антитіла або малі молекули, які запобігають співзв'язуванню PD-1 і TCR на Т-клітинній мембрані, є ефективними антагоністами PD-1, передбаченими даним винаходом.

Типові антагоністи рецептора PD-1 включають, але без обмеження поліпептиди B7-DC, включаючи їх гомологи й варіанти, а також активні фрагменти будь-чого з вищепереліченого, й гібридні білки, які включають будь-яке з вищепереліченого. В переважному варіанті здійснення гібридний білок включає розчинну частину B7-DC, сполучену з Fc-частиною антитіла, такого як IGG людини, і не містить всю трансмембранну ділянку B7-DC людини або його частину. Антагоністи рецептора PD-1 також можуть бути малими молекулами антагоністів або антитілами, які зменшують або порушують PD-1-рецепторну сигнальну трансдукцію шляхом зв'язування з лігандами PD-1 або з самим PD-1, особливо в тих випадках, коли співзв'язування PD-1 з TCR не настає після такого зв'язування, при цьому не запускається передача інгібіторного сигналу через рецептор PD-1.

Антагоністи рецептора PD-1, що надаються в описі, в цілому застосовні *in vivo* і *ex vivo* як ліки, стимулюючи імунну відповідь. В цілому, розкриті композиції антагоністів корисні для лікування суб'єкта, що страждає від захворювання або порушення або має схильність до захворювання або порушення, де імунна система суб'єкта збільшує імунну відповідь.

5 1. Поліпептиди B7-DC

У певних втіленнях білки B7-DC можуть бути використані як антагоністи рецептора PD-1. B7-DC є природним лігандом PD-1 і зв'язується з PD-1 з вищою афінністю, ніж B7-H1, і може, таким чином, інгібувати взаємодії B7-H1:PD-1. Відповідні поліпептиди B7-DC, включаючи їх варіанти, гомологи й фрагменти, можуть бути отримані з наступних повнорозмірних поліпептидів B7-DC

10 людини з ендегенним сигнальним пептидом (SEQ ID NO:1) або без нього (SEQ ID NO:2).

```

MIFLLMLSL ELQLHQIAAL FTVTVPKELY IIEHGSNVTI ECFDGTGSHV NLGAIASLQ      60
KVENDTSPHR ERATLLEEQL PLGKASFHIP QVQVRDEGQY QCIIYGVAV DYKYLTLKVK      120
ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL AEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSVL      180
RLKPPPGRNF SCVFWNTHVR ELTLASIDLQ SQMEPRTHPT WLLHIFIFPC IIAFIFIATV      240
IALRKQLCQK LYSSKDTTKR PVTTTKREVN SAI      273
(SEQ ID NO:1)

```

```

LFTVTVPKEL YIIHGSNVT LECFDTGSH VNLGAIASL QKVENDTSPH RERATLLEEQ      60
LPLGKASFI PQVQVRDEGQ YQCIIYGVAV WDKYLTLKV KASYRKINTH ILKVPETDEV      120
ELTCQATGYP LAEVSWPVNS VPANTSHSRT PEGLYQVTSV LRLKPPPGRN FSCVFWNTHV      180
RELTLASIDL QSQMEPRTHP TWLLHIFIFP CIIAFIFIAT VIALRKQLCQ KLYSSKDTTK      240
RPVTTTKREV NSAI      254
(SEQ ID NO:2)

```

Сімейство молекул B7, що включає B7-DC, експресується на поверхні клітини з мембранним проксимальним константним доменом IGC і мембранним дистальним доменом IGV. Рецептори вказаних лігандів мають загальний позаклітинний IgV-подібний домен. Взаємодії пар рецептор-ліганд опосередковують головним чином за допомогою амінокислотних залишків у доменах IGV лігандів і рецепторів. В цілому, домени IGV описуються, як такі, що мають два аркуші, кожен з яких містить шар β -тяжів. Вказані β -тяжі позначають як A', B, C, C', D, E, F і G. Структура вказаних поліпептидів описана в літературі (див. Molnar et al., Crystal structure of the complex between programmed death-1 (PD-1) і its ligand PD-L2, PNAS, Vol. 105, pp. 10483-10488 (29 July 2008)).

20 Трансмембранний білок, B7-DC, у мономерній формі включає домени IGV і IGC, які складають позаклітинну частину молекули (позаклітинний домен, або ECD), причому IgV-подібний домен відповідальний цілком або частково за зв'язування PD-1, а також за інші функції, перераховані в способах винаходу. Відносно людського білка, IgV-домен відрізняється тим, що він має сполучені дисульфідним зв'язком тяжі B і F (як вказано вище), що видається

25 характерним для багатьох IgV-доменив, і має тривимірну структуру, схожу з доменами IGV як B7-1, так і B7-2 (див. Molnar et al. (2008), *supra*).

У одному варіанті здійснення варіантні поліпептиди B7-DC містять амінокислотні зміни (тобто, заміни, делеції або вставки) в межах одного або більш вказаних β -тяжів у будь-якій

30 можливій комбінації. У іншому варіанті здійснення варіанти B7-DC містять одну або більше амінокислотних змін (тобто, заміни, делеції або вставки) в β -тяжах A', C, C', D, E, F або G. У переважному варіанті здійснення варіанти B7-DC включають одну або більше амінокислотних змін у β -тяжі G. У іншому варіанті здійснення фрагменти варіантного поліпептиду B7-DC включають домени IGC і IGV B7-DC. У іншому варіанті здійснення фрагменти варіантного

35 поліпептиду B7-DC включають IgV-домен B7-DC. Білки B7-DC людини й миші містять короткий внутріклітинний домен, один трансмембранний домен і позаклітинний домен. Позаклітинний домен містить два Ig-домени; мембранний проксимальний IgC-домен і мембранний дистальний IgV-домен. Використовувані фрагменти варіантних поліпептидів B7-DC включають розчинні фрагменти. Розчинними фрагментами B7-DC є фрагменти B7-DC, які можуть бути "злучені", секретовані або виділені іншим шляхом з продукуючих клітин. У одному варіанті здійснення

40 фрагменти варіантного поліпептиду B7-DC включають повний позаклітинний домен B7-DC. Позаклітинний домен B7-DC включає амінокислоти приблизно 20-221 B7-DC миші або людини або їхні активні фрагменти. В іншому варіанті здійснення фрагменти варіантного поліпептиду

B7-DC включають домени IGC і IGV B7-DC. У іншому варіанті здійснення фрагменти варіантного поліпептиду B7-DC включають домен IGV B7-DC.

Вважають, що сигнальна система PD-1 вимагає зв'язування з лігандом PD-1 (зазвичай B7-H1) у безпосередній близькості з пептидним антигеном, представленим головним комплексом гістосумісності (MHC) (Freeman Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:10275-10276 (2008)). Тому білки, антитіла або малі молекули, які запобігають спільному зв'язуванню PD-1 і TCR на Т-клітинній мембрані, є ефективними антагоністами PD-1, передбаченими даним винаходом.

Антагоніст PD-1, вживаний у способах і композиціях винаходу, включає фрагменти білка B7-DC, що містять ECD утримують. Альтернативно фрагменти B7-DC включають частину позаклітинного домену, яка містить IGV- або IgV-подібний домен, переважно амінокислоти 20-221, переважніше 20-121, які є достатніми для зв'язування з рецептором PD-1, щоб перешкоджати або запобігти, або іншим способом зменшити передачу інгібіторного сигналу через рецептор PD-1. У переважному варіанті здійснення фрагмент B7-DC конкурує з B7-H1 за зв'язування з рецепторами PD-1.

У одному варіанті здійснення фрагменти варіантного поліпептиду B7-DC можуть містити область поліпептиду, яка є важливою для зв'язування з PD-1. Вказані поліпептидні фрагменти можуть бути використані для конкуренції за зв'язування з PD-1 і для запобігання зв'язуванню нативного B7-DC з PD-1. Зважаючи на конкуренцію за зв'язування з PD-1, вказані фрагменти можуть бути корисні для посилення імунної відповіді, оскільки інгібуючі взаємодії B7-H1 і B7-DC з PD-1 інгібують супресію імунних відповідей, яка відбувалася б інакше. Поліпептидний фрагмент мишастого або людського B7-DC, який міг би конкурентно зв'язатися з PD-1, може містити, наприклад, амінокислоти 101-108 або 110-114. Зв'язування B7-DC дикого типу з PD-1 зазвичай інгібується щонайменше на 50 %, на 60 %, на 70 %, на 75 %, на 80 %, на 90 %, на 95 %, або більш ніж на 95 % в порівнянні з рівнем зв'язування B7-DC дикого типу з PD-1 за відсутності фрагмента вказаного B7-DC дикого типу. Типові фрагменти B7-DC, використовувані в способах і композиціях винаходу, включають, але не обмежуються наступними позаклітинними доменами B7-DC:

позаклітинний домен (ECD) B7-DC людини:

LFTVTVPKEL YIIHGSNVT LECNFDGTSH VNLGAIASL QKVENDTSPH RERATLLEEQ	60
LPLGKASFHI PQVQVRDEGQ YQCIIIIYGVA WDKYLTCLKV KASYRKINTH ILKVPETDEV	120
ELTCQATGYP LAEVSHPNVS VPANTSHSRT PEGLYQVTSV LRLKPPPGRN FSCVFWNTHV	180
RELTLASIDL QSQMEPRTHP TW	202

(SEQ ID NO:3)

і ECD B7-DC миші:

LFTVTAPKEV YTVGVGSSVS LECDFDRREC TELEGIASL QKVENDTSLQ SERATLLEEQ	60
LPLGKALFHI PSVQVRDSGQ YRCLVICGAA WDKYLTCLKV KASYMRIDTR ILEVPGTGEV	120
QLTCQARGYP LAEVSHPNVS VPANTSHIRT PEGLYQVTSV LRLKPQPSRN FSCMFWNAHM	180
KELTSALIDP LSRMEPKVPR TW	202

(SEQ ID NO:4)

ECD B7-DC яванського макака:

LFTVTVPKEL YIIHGSNVT LECNFDGTSH VNLGAIASL QKVENDTSPH RERATLLEEQ	60
LPLGKASFHI PQVQVRDEGQ YQCIIIIYGVA WDKYLTCLKV KASYRKINTH ILKVPETDEV	120
ELTCQATGYP LAEVSHPNVS VPANTSHSRT PEGLYQVTSV LRLKPPPGRN FSCVFWNTHV	180
RELTLASIDL QSQMEPRTHP TW	202

(Seq ID NO: 15)

Багаточисельні послідовності інших приматів, використовувані в способах і композиціях винаходу, представлені в Onlamoon et al., Immunology, Vol. 124, pp. 277-293 (2008).

Антагоніст PD-1, використовуваний у композиціях і способах винаходу, також включає гібридний білок (як описано нижчим), який включає першу й другу поліпептидні частини, де вказаний гібридний білок, або щонайменше його перша поліпептидна частина має активність антагоніста PD-1, особливо, якщо вказаний гібридний білок зв'язується з PD-1 і блокує його, або зв'язується з лігандом PD-1 і блокує його. Перша поліпептидна частина вказаного гібридного білка може включати або складатися з будь-якого з поліпептидів-антагоністів PD-1, або їх PD-1-зв'язуючих фрагментів, перерахованих тут іншим чином, для застосування як антагоністи PD-1 у способах винаходу. В переважному варіанті здійснення вказаного гібридного білка згадана

перша поліпептидна частина є N-кінцевою по відношенню до згаданої другої поліпептидної частини. В окремому варіанті здійснення згадана перша поліпептидна частина з'єднується із згаданою другою поліпептидною частиною за допомогою олігопептиду на додаток до амінокислот, що складають згадані першу й другу поліпептидні частини, вказані сполучені

5 амінокислоти не знижують істотно PD-1-антагоністичну активність вказаного гібридного білка.
У переважному димерному гібридному білку димір отримують у результаті ковалентного зв'язування залишків Cys в СН-областях двох важких ланцюгів Ig, які є тими самими залишками Cys, які сполучені дисульфідним зв'язком в димеризованих нормальних важких ланцюгах Ig.

10 Велика кількість поліпептидних послідовностей, які зазвичай використовують як сполучні партнери гібридних білків, добре відомі в даній галузі техніки. Приклади використовуваних поліпептидних зв'язуючих партнерів включають, але без обмеження, зелений флуоресцентний білок (GFP), глутатіон-S-трансферазу (GST), поліістидин, мус, гемаглютинін, FLAG™ tag (Kodak, New Haven, CT), що мальтоза-зв'язуючий білок E і протеїн A. Інший варіант здійснення надає тетрамерну конструкцію, що містить субстрат BIRA, сполучений з позаклітинним доменом

15 варіантного поліпептиду B7-DC. Способи створення тетрамерної конструкції відомі в даній галузі техніки (див. Pertovas, et al., J. Exp. Med., 203:2281 (2006)).
Типові мишачі гібридні білки B7-DC містять амінокислоти 20-221 мишачого B7-DC, сполучені з амінокислотами 237-469 мишачого IgG2a (CAA49868). У одному необмежувачому прикладі людські гібридні білки B7-DC містять амінокислоти 20-221 B7-DC людини, сполучені з

20 амінокислотами 245-476 IGGI людини (AAA02914). Сигнальні пептиди гібридних білків B7-DC включають ендogenousні сигнальні пептиди або будь-який інший сигнальний пептид, який сприяє секреції гібридного білка з "господаря". В іншому варіанті здійснення перший поліпептид включає лише IgV-домен. Інші варіанти здійснення можуть включати шарнірний домен і Fc-домен антитіла IGG, такого як IGGI, причому не представлено жодного домену варіабельної

25 області. Інші варіанти здійснення включають застосування шарнірної області й Fc-області IgG2 або IgG4, особливо що містять N297Q або іншу мутацію, яка зменшує ефекторну функцію.

Відповідно до способів і композицій винаходу поліпептид, вживаний як антагоніст PD-1, або перша поліпептидна частина гібридного білка, вживаного як антагоніст PD-1, включає амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 60 % або щонайменше 65 %, або

30 щонайменше 70 %, або щонайменше 75 %, або щонайменше 80 %, або щонайменше 85 %, або щонайменше 90 %, або щонайменше 95 %, або щонайменше 99 %-ну ідентичність з амінокислотами 1-221 SEQ ID NO: 1, переважно з амінокислотами 20-221 SEQ ID NO: 1, або з амінокислотами 26-221 SEQ ID NO: 1, або з амінокислотами 1-202 SEQ ID NO: 3 або 4, переважніше з амінокислотами 20-121 SEQ ID NO: 1 або з амінокислотами 1-102 SEQ ID NO: 3

35 або 4.

У одному варіанті здійснення поліпептид, вживаний як антагоніст PD-1, або перша поліпептидна частина гібридного білка, використовуваного як антагоніст PD-1, складається з амінокислот 1-221 SEQ ID NO: 1, або складається з амінокислот 20-221 SEQ ID NO: 1, або складається з амінокислот 26-221 SEQ ID NO: 1, або складається з амінокислот 1-202 SEQ ID

40 NO: 3 або 4. У одному варіанті здійснення (SEQ ID NO: 2), поліпептид не включає амінокислоти 1-19 SEQ ID NO: 1.

У інших конкретних прикладах антагоніст поліпептиду PD-1 або перша поліпептидна частина гібридного білка-антагоніста PD-1 включає амінокислотну послідовність 20-121 SEQ ID NO: 1, де переважно він включає амінокислотну послідовність WDYKY в положенні залишків 110-114, або

45 де він включає амінокислоти 1-102 SEQ ID NO: 3, де переважно він включає амінокислотну послідовність WDYKY в положенні залишків 91-95.

У переважному варіанті здійснення вказані відсоткові ідентичності досягаються за допомогою вживання консервативних амінокислотних замінів, як визначено в іншому місці даного опису.

50 В одному вказаному варіанті здійснення поліпептидний антагоніст PD-1 або перша поліпептидна частина гібридного білка-антагоніста PD-1 не включає амінокислоти 1-19 SEQ ID NO: 1, або не включає яку-небудь частину трансмембранного домену, особливо вказаний повний домен, або не включає яку-небудь частину внутріклітинного (або розчинного) домену, особливо вказаний повний домен, ліганду PD-1 або іншого білкового антагоніста PD-1. У

55 переважному варіанті здійснення вказаний антагоніст або перша поліпептидна частина включає лише позаклітинний домен (ECD) SEQ ID NO:1 і, таким чином, включена в склад лише розчинна частина поліпептиду вказаної послідовності, або фрагмент вказаної розчинної частини.

В інших подібних варіантах здійснення поліпептидний антагоніст PD-1 або перша поліпептидна частина гібридного білка-антагоніста PD-1 включає IgV-домен, або IgV-подібний

60 домен або його PD-1-зв'язуючий фрагмент ліганда PD-1, або складається з IgV-домену, або IgV-

подібного домену, або його PD-1-зв'язуючого фрагмента ліганда PD-1. У конкретних прикладах вказаний ліганд PD-1 є молекулою B7-DC або B7-H1 дикого типу, переважно молекулу B7-DC або B7-H1 дикого типу миші або примату, переважно людини. В інших подібних варіантах здійснення поліпептидний антагоніст PD-1, або перша поліпептидна частина гібридного білка-антагоніста PD-1, PD-1-зв'язуючий фрагмент IgV-домену, або IgV-подібного домену, ліганда PD-1, особливо в разі IgV-домену, або IgV-подібного домену, складається з амінокислот 20-121 SEQ ID NO: 1 або амінокислот 1-102 SEQ ID NO: 3.

Антагоніст PD-1 винаходу також включає PD-1-зв'язуючий фрагмент амінокислот 20-121 SEQ ID NO: 1 (людською повнорозмірною) або амінокислот 1-102 SEQ ID NO: 3 (позаклітинний домен або ECD).

У конкретних втіленнях поліпептид або PD-1-зв'язуючий фрагмент також включає амінокислоти WDYKY у положенні залишків 110-114 SEQ ID NO: 1 або WDYKY в положенні залишків 91-95 SEQ ID NO: 3. Як необмежуючі приклади, вказаний фрагмент PD-1-зв'язуючий включає щонайменше 10, або щонайменше 20, або щонайменше 30, або щонайменше 40, або щонайменше 50, або щонайменше 60, або щонайменше 70, або щонайменше 75, або щонайменше 80, або щонайменше 85, або щонайменше 90, або щонайменше 95, або щонайменше 100 розташованих поруч амінокислот послідовності амінокислот 20-121 SEQ ID NO: 1, де в переважному варіанті здійснення кожен PD-1-зв'язуючий фрагмент включав би як підфрагмент амінокислоти WDYKY, що знаходяться в положенні залишків 110-114 SEQ ID NO: 1 або WDYKY в положенні залишків 91-95 SEQ ID NO: 3.

Інші переважні поліпептиди і PD-1-зв'язуючі фрагменти, спеціально передбачені винаходом, включають поліпептидну послідовність амінокислот 20-121 SEQ ID NO: 1 (людську повнорозмірну) та їхні PD-1-зв'язуючі фрагменти, де в указаному поліпептиді або PD-1-зв'язуючому фрагменті цистеїн представлений у положенні залишків 42 і/або 102, причому цистеїн в обох позиціях є переважним, і де фенілаланін представлений у положенні залишку 21, і/або де глутамінова кислота представлена в положенні залишку 28, і/або де треонін, і/або де глутамін представлений у положенні залишку 60, і/або де глутамінова кислота представлена в положенні залишку 101, і/або де ізолейцин представлений у положенні залишку 103, і/або де ізолейцин представлений у положенні залишку 105, і/або де гліцин представлений у положенні залишку 107, і/або де валін представлений у положенні залишку 108, і/або де триптофан представлений у положенні залишку 110, і/або де аспарагінова кислота представлена в положенні залишку 111, і/або де тирозин представлений у положенні залишку 112, і/або де лізин представлений у положенні залишку 113, і/або де тирозин представлений у положенні залишку 114, за умови що, в разі PD-1-зв'язуючих фрагментів указаний фрагмент є чималим, щоб включати вказані положення амінокислот.

Додаткові переважні поліпептиди і PD-1-зв'язуючі фрагменти, спеціально передбачені винаходом, включають поліпептидну послідовність амінокислот 1-102 SEQ ID NO: 3 (ECD людини) або SEQ ID NO: 4 (ECD миші) і їхні PD-1-зв'язуючі фрагменти, де в указаному поліпептиді або PD-1-зв'язуючому фрагменті, цистеїн представлений у положенні залишку 23 і 83, причому цистеїн в обох позиціях є переважним, і поліпеп де фенілаланін представлений у положенні залишку 2, і/або де глутамінова кислота представлена в положенні залишку 9, і/або де треонін або аргінін представлений у положенні залишку 37, причому треонін є переважним, і/або де глутамін представлений у положенні залишку 41, і/або де аргінін представлений у положенні залишку 82, і/або де лейцин представлений у положенні залишку 84, і/або де ізолейцин представлений у положенні залишку 86, і/або де гліцин представлений у положенні залишку 88, і/або де аланін представлений у положенні залишку 89, і/або де триптофан представлений у положенні залишку 91, і/або де аспарагінова кислота представлена в положенні залишку 92, і/або де тирозин представлений у положенні залишку 93, і/або де лізин представлений у положенні залишку 94, і/або де тирозин представлений у положенні залишку 95, за умови що, в разі PD-1-зв'язуючих фрагментів, указаний фрагмент є чималим, щоб включати вказані положення амінокислот.

У додаткових варіантах здійснення будь-яким з указаних вище поліпептидів також може включати частини або фрагменти, наприклад, з 1 до 10 розташованих поруч амінокислот, що витягують з сигнального, трансмембранного або С-кінцевого доменів поліпептиду B7-DC або B7-H1, наприклад, миші або примату, переважно людини. Вказані поліпептиди і PD-1-зв'язуючі фрагменти також можуть бути представлені в будь-якому з гібридних білків винаходу, наприклад, де вказаний поліпептид або PD-1-зв'язуючий фрагмент є "першим поліпептидом" указанного гібридного білка.

У конкретних прикладах молекула, скомбінована з потенціовальним агентом для застосування в схемі лікування винаходу, включає PD-1-зв'язуючий фрагмент амінокислот 20-

221 SEQ ID NO: 1. У одному подібному варіанті здійснення фрагмент складається з амінокислот 20-121 SEQ ID NO: 1, де переважно фрагмент включає амінокислоти 110-114 SEQ ID NO: 1. У деяких варіантах здійснення представлений більш ніж один указаний фрагмент (як описано в іншому місці цього документа) й молекула включає щонайменше 2, 3, 4, 5 або більш за
 5 фрагменти білка B7-DC, особливо де фрагмент є частиною або містить частину амінокислот 20-221 SEQ ID NO: 1. У переважному варіанті здійснення щонайменше один указаний фрагмент складається з амінокислот 20-121 SEQ ID NO: 1, переважніше, де щонайменше один вказаний фрагмент включає амінокислоти 110-114 SEQ ID NO: 1 (тобто, послідовність WDYKY (SEQ ID NO: 14)). У переважних втіленнях PD-1-зв'язуючий фрагмент включає щонайменше 10, або
 10 щонайменше 25, або щонайменше 50, або щонайменше 75, або щонайменше 100 розташованих поруч амінокислот.

Ендогенний сигнальний пептид людини має наступну послідовність MIFLLLMLSL ELQLHQIAA (SEQ ID NO:5) і є першими 19 амінокислот SEQ ID NO: 1. У певних втіленнях поліпептидні фрагменти B7-DC можуть включати 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 розташованих поруч амінокислот ендогенного або гетерологічного сигнального пептиду (який може бути використаний для одержання рекомбінантного поліпептиду B7-DC шляхом експресії й експресії з трансформованої клітини). Також слід розуміти, що корисний поліпептид B7-DC може включати 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 розташованих поруч амінокислот трансмембранного домену B7-DC, і/або 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 розташованих поруч амінокислот цитоплазматичного домену, або їх комбінації, за умови, що фрагмент B7-DC зберігає антагоністичну здатність відносно рецептора PD-1. Фенотипи мишей PD-1-/- надають прямий доказ того, що PD-1 є негативним регулювальником імунних відповідей *in vivo*. За відсутності PD-1 у мишей на фоні C57BL/6 повільно розвивається волчакоподібний гломерулонефрит і прогресуючий артрит (Nishimura, et al., Immunity, 11:141-151 (1999)). У мишей PD-1-/- на фоні BALB/c нестримно розвивається летальна аутоімунна дилатаційна кардіоміопатія (Nishimura, et al., Science, 291:319-322 (2001)). Проте важливе свідчення вказує, що B7-DC може функціонувати як коstimуляційний активатор Т-клітинних відповідей. У присутності субоптимальних сигналів B7-DC TCR викликає збільшення проліферації й продукцію цитокінів *in vitro* (Tseng, et al., J. Exp. Med. 193:839-846 (2001)). В той же час, дослідження *in vitro* показали негативну регуляторну роль B7-DC у Т-клітинних відповідях. Представлені, на перший погляд, суперечливі дані можуть бути успішно пояснені експресією додаткових рецепторів для B7-DC на Т-клітинах, інших, ніж PD-1.

Отже, білки B7-DC, їх варіанти, фрагменти й гібриди можуть мати перевагу безпосереднього посилення Т-клітинних відповідей при зв'язуванні з невідомим рецептором, який активує Т-клітину, на додаток до посилення Т-клітинних відповідей шляхом запобігання PD-1-опосередкованої передачі інгібіторного сигналу.

2. Поліпептиди B7-H1

У іншому варіанті здійснення сполука для застосування в комбінації з потенціовальним агентом у схемі лікування винаходу є або включає фрагмент B7-H1 ссавця, переважно миші або примату, переважно людини, де вказаний фрагмент зв'язується з PD-1 і блокує його, але не викликає передачі інгібіторного сигналу через PD-1, і вказаний фрагмент є завдовжки щонайменше 10, або щонайменше 20, або щонайменше 30, або щонайменше 40, або щонайменше 50, або щонайменше 60, або щонайменше 70, або щонайменше 80, або щонайменше 90, або щонайменше 100 розташованих поруч амінокислот. У інших втіленнях фрагмент може бути різної довжини за умови, що він характеризується функцією зв'язування з PD-1, але не викликає передачу інгібіторного сигналу, що приводить до зменшення Т-клітинної проліферації. Вказані фрагменти B7-H1 також знайшли вживання як першу поліпептидну частину гібридних білків винаходу. Послідовності B7-H1 є наступними:

Поліпептид B7-H1 людини (SEQ ID NO: 16)

MRIFAVFIFM TYWHLLNAFT VTPVKDLYVV EYGSNMTEIC KFPVEKQLDL AALIVYWEME	60
DKNIIQFVHG EEDLVKQHS YRQARLLKD QLSLGNALQ ITDVKLQDAG VYRCMSYGG	120
ADYKRITVKV NAFYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT	180
TTNSKREEKL FNVSTLRLIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVPELP LAHPNERTH	240
LVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET	290

Поліпептид B7-H1 миші (SEQ ID NO: 17)

MRIFAGIIFT ACCHLLRAFT ITAPKDLYVV EYGSNVTMEC RFPVERELDL LALVVYWEKE 60
 DEQVIQFVAG EEDLKPQHSN FRGRASLPKD QLLKGNAALQ ITDVKLQDAG VYCCIIISYGG 120
 ADYKRITLKV NAPYRKINQR ISVDPATSEH ELICQAEGYP EAEVIWTNSD HQPVSGKRSV 280
 TTSRTEGMLL NVTSSLRVNA TANDVFYCTF WRSQPGQNHT AELIPELPA THPPQNRTHW 240
 VLLGSILLFL IVVSTVLLFL RKQVRMLDVE KCGVEDTSSK NRNDTQFEET 290

Поліпептид PD-L1 Macaca mulatta (SEQ ID NO: 18)

MRIFAVFIFT IYWHLLNAFT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC RFPVEKQLGL 60
 TSLIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSN YRQRAQLLKD QLSLGNAAALR 120
 ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE 180
 HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL LNVSTSLRIN 240
 TTANEIFYCI FRRLGPEENH TAEVLPELP LALPPNERTH LVILGAIFLL 300
 LGVALTFIFY LRKGRMMDMK KSGIRVTNSK KQRTQLEET 340

Білки B7-H1-Ig описані в WO/2001/014557 (опублікований 1 березня 2001) і в
 5 WO/2002/079499 (опублікований 10 жовтня 2002).

3. PD-1 та інші поліпептиди

Інші корисні поліпептиди винаходу включають поліпептиди, які зв'язуються з лігандами
 рецептора PD-1. Вони включають рецепторний білок PD-1 або його розчинні фрагменти, які
 10 можуть зв'язуватися з лігандами PD-1, такими як B7-H1 або B7-DC, і запобігати зв'язуванню з
 ендogenous рецептором PD-1, запобігаючи, таким чином, передачі інгібіторного сигналу. Також
 показано, що B7-H1 зв'язується з білком B7.1 (Butte et al., Immunity, Vol. 27, pp. 111-122 (2007)).
 Вказані фрагменти також включають розчинну частину ECD білка PD-1, яка включає мутації,
 такі як мутація A99L, яка збільшує зв'язування з природними лігандами (Molnar et al., Crystal
 structure of the complex between programmed death-1 (PD-1) і its ligand PD-L2, PNAS, Vol. 105, pp.
 15 10483-10488 (29 July 2008)). B7-1 або його розчинні фрагменти, які можуть зв'язуватися з
 лігандом B7-H1 і запобігати зв'язуванню з ендogenous рецептором PD-1, запобігаючи тим самим
 передачі інгібіторного сигналу, також є корисними.

Поліпептиди PD-1, вживані в способах винаходу, є наступними поліпептидами:

PD-1 людини (SEQ ID NO: 19)

MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPTFFPA LLVVTGEDNA TFTCSFSNTS 60
 ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCFRVQTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT 120
 YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS 180
 LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP 240
 20 CVPEQTEYAT IVFPSMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL 288

PD-1 яванського макака Cynomolgus monkey (SEQ ID NO: 20)

MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLESPDR PWNAPTFFPA LLLVTEGDNA TFTCSFSNAS 60
 ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCFRVTRL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT 120
 YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS 180
 LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP 240
 20 CVPEQTEYAT IVFPSMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL 288

Відповідно до винаходу, оскільки B7-1 і його фрагменти також можуть зв'язуватися з B7-H1 і
 передавати інгібіторну трансдукцію Т-клітинам через B7-H1, блокування вказаної взаємодії
 25 також може зменшити передачу інгібіторного сигналу, яка відбувається через B7-H1. Сполуки,
 застосовані у винаході, включають молекули, які блокують вказаного типу взаємодії. Дані
 молекули розкриті в Butte et al (2007) раніше, і включають антитіла анти-B7-H1 з "подвійною"
 специфічністю, які блокують взаємодію B7-H1:B7-1 і B7-H1:PD-1, а також антитіла, що
 демонструють моноспецифічність, які блокують взаємодію PD-L1:B7-1. Сполуки, які
 30 перешкоджають вказаній взаємодії шляхом блокування B7-1, також є корисними, й включають
 анти-B7-1 антитіла.

4. Варіантні поліпептиди

Поліпептиди, використовувані у винаході, як описано, включають поліпептиди, які змінені
 таким чином, що містять одну або більш амінокислотних замін, делецій або вставок. Способи

мутагенезу відомі в даній галузі техніки. Мутовані або варіантні поліпептиди інгібують або зменшують передачу інгібаторного сигналу через рецептори PD-1 завдяки зв'язуванню з лігандами PD-1. Альтернативно, варіанти (наприклад, поліпептиди B7-DC) можуть зв'язуватися з рецептором PD-1 й інгібувати, зменшувати або блокувати передачу інгібаторного сигналу через рецептор PD-1. Варіантні поліпептиди можуть бути поліпептидами, отриманими з видів будь-якого походження. В одному варіанті здійснення варіантний поліпептид є поліпептидом, отриманим з видів ссавців. У переважному варіанті здійснення варіантний поліпептид є за походженням поліпептидом миші або примату, переважно людини.

У одному варіанті здійснення варіантним поліпептидом є поліпептид B7-DC, який має таку саму зв'язуючу здатність відносно PD-1, як B7-DC дикого типу або неваріантний B7-DC, але не має або має менше за 10 % здатність запускати передачу інгібаторного сигналу через рецептор PD-1, в порівнянні з поліпептидом B7-DC, що не мутував. У інших втіленнях варіантний поліпептид B7-DC має зв'язуючу здатність відносно PD-1 більшу на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % або 60 %, ніж B7-DC дикого типу, без ініціації інгібаторної PD-1 сигнальної трансдукції.

Варіантний поліпептид (наприклад, варіантний поліпептид B7-DC) включає поліпептиди, що характеризуються будь-якою комбінацією амінокислотних заміни, делецій або вставок за умови, що антагоністична активність відносно PD-1 не зменшується істотно порівняно з диким типом. Проте в разі, якщо вказане зменшення існує, воно має складати не більше ніж половину значення активності дикого типу, так що вказаний варіант характеризується щонайменше 50 % антагоністичною активністю білка дикого типу відносно PD-1, переважно щонайменше 60 %, переважніше щонайменше 80 %, найпреважніше щонайменше 90 % або 95 %, при цьому щонайменше 100 % антагоністична активність є особливо переважною. Підвищені значення такої активності, отримані в результаті застосування вказаного варіанту, є ще більше бажаними. В одному варіанті здійснення ізольовані варіантні поліпептиди B7-DC мають амінокислотні зміни, такі що їх амінокислотна послідовність характеризується щонайменше 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99, 99,5 або 100 % ідентичністю з амінокислотою послідовністю поліпептиду B7-DC дикого типу, особливо з амінокислотою послідовністю дикого типу ссавця, переважно миші, або примату, переважно людини, поліпептиду B7-DC дикого типу.

Ідентичність поліпептидної послідовності може бути розрахована за допомогою визначення % ідентичності, наданого вище.

Заміни амінокислот у поліпептидах можуть бути "консервативними" або "неконсервативними".

Молекули сімейства B7, включаючи B7-DC, експресуються на клітинній поверхні з мембранним проксимальним константним IgC-доменом і мембранним дистальним IgV-доменом. Рецептори вказаних лігандів містять загальний позаклітинний IgV-подібний домен. Взаємодії пар рецептор-ліганд опосередковуються головним чином через залишки в IgV-доменах лігандів і рецепторів. В цілому, IgV-домени описують, як такі, що містять два аркуші, кожен з яких містить шар β -тяжів. Указані β -тяжі позначають A', B, C, C", C", D, E, F і G. У одному варіанті здійснення варіантні поліпептиди B7-DC містять амінокислотні зміни (тобто заміни, делеції або вставки) в одному або більш β -тяжів у будь-якій можливій комбінації. В іншому варіанті здійснення варіанти B7-DC містять одну або більш амінокислотних змін (тобто заміни, делецій або вставок) в A', C, C" C", D, E, F або G β -тяжах. У одному варіанті здійснення варіанти B7-DC містять одну або більш амінокислотних змін у β -тяжі G.

Що стосується B7-DC миші або примату, переважно людини, варіантний поліпептид B7-DC може містити, без обмеження, заміни, делеції або вставки в положеннях, які не зменшать істотно зв'язування з PD-1 в порівнянні з немутантом B7-DC. Слід розуміти, проте, що заміни в перерахованих положеннях амінокислот можуть бути виконані із застосуванням амінокислоти або аналога амінокислоти. Наприклад, заміни в перерахованих положеннях можуть бути виконані за допомогою однієї з амінокислот, що зустрічаються в природі (наприклад, аланін, аспарагінова кислота, аспарагін, аргінін, цистеїн, гліцин, глутамінова кислота, глутамін, гістидин, лейцин, валін, ізолейцин, лізин, метіонін, пролін, треонін, серин, фенілаланін, триптофан або тирозин).

Попри те, що описані тут заміни, є замінами відносно B7-DC миші й примату, переважно людини, вказано, що фахівець у даній галузі техніки може без зусиль виробити аналогічні зміни у відповідних поліпептидах інших видів (наприклад, щура, хом'яка, морської свинки, піщанки, кроля, собаки, кішки, коня, свині, вівці, корови або нижчого примату).

Преважні фрагменти включають увесь або частину позаклітинного домену B7-DC, корисного для зв'язування з PD-1.

У одному варіанті здійснення фрагментами варіантного поліпептиду B7-DC є фрагменти, які зберігають здатність зв'язуватися з PD-1 без ініціації передачі PD-1 інгібаторного сигналу. Один

варіант здійснення надає варіантний поліпептид B7-DC, який є фрагментом повнорозмірного B7-DC і характеризуються зазвичай щонайменше 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 100 % або ще вище ніж 100 % антагоністичною активністю повнорозмірного варіантного поліпептиду B7-DC відносно PD-1.

Корисні фрагменти варіантних поліпептидів B7-DC включають розчинні фрагменти. Розчинними фрагментами B7-DC є фрагменти B7-DC, які можуть бути "злучені" з поверхні, секретовані або виділені іншим способом з продукуючих клітин. У одному варіанті здійснення фрагменти варіантного поліпептиду B7-DC включають повний позаклітинний домен B7-DC. Позаклітинний домен B7-DC включає амінокислоти приблизно від 20 до амінокислоти 221 B7-DC миші або примату, переважно людини. В іншому варіанті здійснення фрагменти варіантного поліпептиду B7-DC включають домени IGC і IGV B7-DC. У іншому варіанті здійснення фрагменти варіантного поліпептиду B7-DC включають в IgV-домен B7-DC.

У одному варіанті здійснення фрагменти варіантного поліпептиду B7-DC містять ділянку поліпептиду, який є важливим для здатності зв'язуватися з PD-1. Вказані поліпептидні фрагменти є корисними для зв'язування й блокування рецептора PD-1, щоб запобігти зв'язуванню природних лігандів з рецептором PD-1, підсилюючи, таким чином, імунну відповідь. Інгібуючі взаємодії нативного B7-H1 або B7-DC з PD-1 інгібують супресію імунних відповідей, яка відбувалася б в протилежному випадку. Фрагмент поліпептиду B7-DC миші або примату, переважно людини, яка зв'язується з PD-1 містить, як необмежуючий приклад, амінокислоти 101-105 або 111-113. Зв'язування B7-H1 з рецептором PD-1 зазвичай інгібується щонайменше на 50 %, або щонайменше 60 %, або щонайменше на 70 %, або щонайменше 75 %, або щонайменше на 80 %, або щонайменше на 90 %, або щонайменше на 95 %, або більше, в порівнянні з рівнем зв'язування B7-H1 з PD-1 за відсутності вказаного фрагмента.

Мутант A99L людського PD-1 зв'язує B7-DC і B7-H1 з вищою афінністю, ніж немутований PD-1 людини (Lazar Molnar et al PNAS 105 p. 10483-10488 (2008)). У одному варіанті здійснення винаходу сполукою, призначеною для зменшення передачі інгібіторного сигналу, є розчинний білок, такий як ECD PD-1, що включає вказану мутацію.

5. Модифіковані поліпептиди

Поліпептиди, застосовані у винаході, як описано, включаючи варіанти, гомологи та їх фрагменти, можуть бути модифіковані за допомогою хімічних функціональних груп, які виявляють в асоціації з поліпептидами в нормальному клітинному середовищі, наприклад, за допомогою фосфорилування, метилування, амідування, сульфатування, ацилування, глікозилювання, сумоїлювання й убіквітінування поліпептиду. Вказані поліпептиди також можуть бути модифіковані за допомогою хімічних функціональних груп, які зазвичай не є частиною поліпептидів у клітинному середовищі. Вказані модифікації можуть бути введені в молекулу шляхом реакції амінокислотних залишків-мішеней поліпептиду з органічним агентом, використовуваним для отримання похідних, який здатний реагувати з вибраними бічними ланцюгами або з кінцевими залишками. Інша корисна модифікація є циклізацією білка. Вказані модифікації також включають введення мітки, здатної забезпечити детектований сигнал, прямо або побічно, що включає, але без обмеження радіоактивні ізотопи й флуоресцентні сполуки.

Приклади хімічних похідних поліпептидів включають залишок лізину й амінокінцеві залишки, створюючи похідні з сукциновим ангідридом або з іншими ангідридами карбонових кислот. Одержання похідних з циклічним карбоксильним ангідридом має ефект зміни заряду залишків лізину. Інші відповідні реагенти для одержання похідних аміновмісних залишків, включають імідоефіри, такі як метилпіколінімідат; піридоксальфосфат; піридоксаль; хлорборгідрид; тринітробензолсульфонова кислота; О-метилізоосечовина; 2,4-пентандіон; і реакція з гліоксилатом, каталізована трансаміназою. Карбоксильні бічні групи, аспартил або глутаміл, можуть бути вибірково модифіковані за допомогою реакції з карбодіїмідами ($R-N=C=N-R'$), такими як 1-циклогексил-3-(2-морфолініл-(4-етил)карбодіїмід або 1-етил-3-(4-азонію-4,4-диметилфеніл)карбодіїмід. Крім того, залишки аспартилу й глутамілу можуть бути перетворені на залишки аспарагінілу й глутамінілу за допомогою реакції з аміаком. Поліпептиди винаходу також можуть включати одну або більш за D-амінокислот, якими замінюють одну або більш за L-амінокислот.

У інших втіленнях потенціовальний агент, такий як CTX1 сам може бути частиною сполуки, яка зменшує передачу інгібіторного сигналу, наприклад, у випадку, якщо потенціовальний агент хімічно пов'язаний з антагоністом PD-1 винаходу.

6. Гібридні білки

Також надані гібридні поліпептиди, що містять перший гібридний партнер, або поліпептидну частину, що включає весь або частину білкового антагоніста PD-1, наприклад, поліпептид B7-DC (включаючи, варіанти, гомологи та їхні фрагменти), сполучений (і) безпосередньо з другим

поліпептидом або, (ii) за бажання, сполучений з лінкерною пептидною послідовністю, яка об'єднана з другим поліпептидом. Наявність гібридного партнера може змінювати, наприклад, розчинність афінність і/або валентність поліпептидного антагоніста PD-1. Розкриті гібридні білки включають будь-яку комбінацію змін амінокислот (тобто заміна, делеція або вставка), фрагмента, та/або модифікації пептидного антагоніста PD-1, як описано вище. В одному варіанті здійснення гібридні білки B7-DC включають позаклітинний домен білка B7-DC як перший зв'язуючий партнер. У іншому варіанті здійснення вказані гібридні білки B7-DC включають домен IGВ і IGC білка B7-DC як перший зв'язуючий партнер. У іншому варіанті здійснення варіантні гібридні білки B7-DC включають IgV-домен білка B7-DC як перший зв'язуючий партнер.

Типові перші гібридні партнери включають поліпептид B7-DC примату, переважно людини, або миші, його фрагменти та їх варіанти, розкриті вище. Переважні фрагменти включають позаклітинний домен B7-DC. Як описано, позаклітинний домен може включати 1-10 розташованих поруч амінокислот сигнального пептиду, трансмембранного домену B7-DC або їх обох.

У одному варіанті здійснення композиції й/або продукти, і/або способи винаходу застосовують антагоніст рецептора PD-1, особливо поліпептиди, включаючи варіанти, гомологи та їх фрагменти, які сполучають з іншими поліпептидами для створення гібридних білків, які протидіють рецептору PD-1 шляхом зв'язування ліганду PD-1, такого як B7-H1, тим самим інгібують взаємодію інгібуючого ліганду з PD-1. У іншому варіанті здійснення поліпептидні антагоністи рецептора PD-1 або їх варіанти, сполучають з іншими поліпептидами для створення гібридних білків, які надають антагоністичну дію на рецептор PD-1 шляхом зв'язування й блокування рецептора PD-1 та інгібують або зменшують передачу інгібаторного сигналу через PD-1.

Другий поліпептидний зв'язуючий партнер або друга поліпептидна частина, може являти собою N-кінець або C-кінець відносно поліпептидного антагоніста PD-1. У переважному варіанті здійснення другим поліпептидом є C-кінець поліпептидного антагоніста PD-1.

У переважному варіанті здійснення гібридний білок, передбачений для застосування в способах і композиціях і/або продуктах винаходу, включає щонайменше частину антитіла. З появою методів молекулярної біології й рекомбінантної технології, тепер можливо виробляти молекули антитіл рекомбінантними способами і створювати, таким чином, нуклеотидні послідовності генів, які кодують специфічні амінокислотні послідовності, виявлені в поліпептидній структурі антитіл. Вказані антитіла можуть бути отримані або за допомогою клонування нуклеотидних послідовностей генів, що кодують поліпептидні ланцюги вказаних антитіл, або за допомогою прямого синтезу вказаних поліпептидних ланцюгів, із збіркою *in vitro* синтезованих ланцюгів для створення активних тетрамерних (H₂L₂) структур з афінністю до специфічних епітопів і антигенних детермінантів. Вказані способи забезпечують легке одержання антитіл, що мають послідовності, типові для нейтралізуючих антитіл, отриманих з різних видів і джерел.

Незалежно від джерела антитіл, або їх рекомбінантної конструкції, або того, як вони синтезовані, *in vitro* або *in vivo*, з використанням трансгенних тварин, наприклад, корів, кіз і овець, з використанням великих клітинних культур лабораторного або комерційного об'єму, в біореакторах або за допомогою прямого хімічного синтезу без використання живих організмів на якій-небудь стадії процесу, всі антитіла мають схожу загальну 3-мірну структуру. Вказана структура часто представляється у вигляді H₂L₂ і відображає той факт, що антитіла зазвичай включають 2 легких (L) амінокислотних ланцюги й 2 важких (H) амінокислотних ланцюги. Обидва ланцюги містять області, здатні взаємодіяти зі структурно комплементарною антигенною мішенню. Області, що взаємодіють з мішенню, позначають як "варіабельні" або "V" області, й вони характеризуються відмінностями в амінокислотній послідовності від антитіл іншої антигенної специфічності.

У переважних втіленнях поліпептидні антагоністи рецептора PD-1, включаючи фрагменти, мутанти та інші варіанти, мають перший партнер злиття, що має весь або частину білка B7-DC, або його варіант, злитого (i) безпосередньо з другим поліпептидом, або (ii) необов'язково злитого з пептидною лінкерною послідовністю, яка злита з другим поліпептидом. Присутність партнера злиття може змінити розчинність, афінність і/або валентність B7-DC поліпептиду. У переважніших втіленнях поліпептиди B7-DC сполучені з одним або більш доменами константної області важкого ланцюга Ig, переважніше з амінокислотною послідовністю, відповідної шарнірній області, ділянкам C_H2 і C_H3 ланцюга C_γ1 імунoglobуліну людини, або шарнірній області, ділянкам C_H2 і C_H3 ланцюга C_γ2a імунoglobуліну миші. В переважному варіанті здійснення константна область переважно включає мутацію (наприклад, N297Q), щоб

виключити або зменшити зв'язування Fc-рецептора.

Шарнірна область, ділянки C_H2 і C_H3 ланцюга C_γ1 імуноглобуліну людини мають наступну амінокислотну послідовність:

```
EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF      60
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT      120
ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTPP      180
PVLDSGDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK              232
```

(SEQ ID NO:6).

- 5 Шарнірна область, ділянки C_H2 і C_H3 ланцюга C_γ2a імуноглобуліну миші мають наступну амінокислотну послідовність:

```
EPRGPTIKPC PPCKCPAPNL LGGPSVFIFP PKIKDVLMI LSPIVTCVVV DVSEDDPDVQ      60
ISWVFNNEV HTAQQTTHRE DYNSTLRVVS ALPIQHQQDW SGKEFKCKVN NKDLPAPIER      120
TISKPKGSVR APQVYVLPFP EEEMTKQVT LTCMVTDMP EDIYVEWTNN GKTELNYKNT      180
EPVLDSGDSY FMYSKLRVEK KNWVERNSYS CSVVHEGLHN HHTTKSFSRT PGK              233
```

(SEQ ID NO:7)

- 10 Типові гібридні білки B7-DC миші містять амінокислоти 20-221 мишачого B7-DC, сполученого з амінокислотами 237-469 мишачого IgG2a (CAA49868). Гібридні білки B7-DC людини можуть містити амінокислоти 20-221 людського B7-DC, сполученого з амінокислотами 245-476 людського IGGI (AAA02914). Сигнальні пептиди гібридних білків B7-DC можуть бути ендогенними сигнальними пептидами або будь-яким іншим сигнальним пептидом, який сприяє секреції гібридного білка з клітини-господаря.

- 15 Репрезентативний гібридний білок B7-DC-Ig миші кодується послідовністю нуклеїнової кислоти SEQ ID NO:8.

Слід розуміти, що розкриті послідовності нуклеїнових кислот можуть бути оптимізовані для кодону для збільшення рівнів експресії для синтезу гібридних білків, застосованих у способах і композиціях даного винаходу. Способи оптимізації кодонів відомі в даній галузі техніки.

- 20 Мишачий гібридний білок B7-DC-Ig, кодований SEQ ID NO:8, має наступну амінокислотну послідовність:

```
MLLLLPILNL SLQLHPVAAL FTVTAPKEV TVDVGSSVSL ECDFDRRECT ELEGIRASLQ      60
KVENDTSLQS ERATLLEEQL PLGKALFHIP SVQVRDSGQY RCLVICGA AW DYKYLTVKVK      120
ASYMRIDTRI LEVPGTGEVQ LTCQARGYPL AEVSWQNVSV PANTSHIRTP EGLYQVTSVL      180
RLKPQPSRNF SCMFNAHMK ELTSAIIDPL SRMEPKVPR TWEPRGPTIK CPPCKCPAPN      240
LLGGPSVFIF PPKIKDVLMI LSPIVTCVV VDVSEDDPDV QISWVFNNE VHTAQQTTHR      300
EDYNSTLRV SALPIQHQQDW MSGKEFKCKV NNKDLPAPIE RTISKPKGSV RAPQVYVLP      360
PEEEMTKQV TLTCMVTDMP EDIYVEWTN NGKTELNYKN TEPVLDSGDS YFMYSKLRVE      420
KKNWVERNSY SCSVVHEGLH NHHTTKSFSR TPGK              454
```

(SEQ ID NO:9)

SEQ ID NO: 10 надає амінокислотну послідовність мишачого гібридного білка B7-DC-Ig без сигнальної послідовності.

```
LFTVTAPKEV YTVDVGSSVS LECDFDRREC TELEGIRASL QKVENDTSLQ SERATLLEEQ      60
LPLGKALFHI PSVQVRDSGQ YRCLVICGAA WDYKYLTVKV KASYMRIDTR ILEVPGTGEV      120
QLTCQARGYP LAEVSQNVSV VPANTSHIRT PEGLYQVTSV LRLKPQPSRN FSCMFNAHMK      180
KELTSAIIDP LSRMEPKVPR TWEPRGPTIK PCPPCKCPAP NLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI      240
ISLSPIVTCV VDVSEDDPD VQISWVFNNE EVHTAQQTTH REDYNSTLRV VSALPIQHQQ      300
WMSGKEFKCK VNNKDLPAPI ERTISKPKGS VRAPQVYVLP PPEEEMTKKQ VTLTCMVTDMP      360
MPEDIYVEWT NNGKTELNYK NTEPVLDSG SYFMYSKLRV EKKNWVERNS YSCSVVHEGL      420
HNHHTTKSFS RTPGK      435
```

- 25 (SEQ ID NO:10)

У одному варіанті здійснення людський B7-DC-Ig кодується послідовністю нуклеїнової кислоти SEQ ID NO:11, що кодує амінокислотну послідовність B7-DC-Ig людини:

```

MIFLLMLSL ELQLHQIAAL FTVTVPKELY IIEHGSNVTI ECFDGTGSHV NLGAIASLQ      60
KVENDTSPHR ERATLLEEQL PLGKASFHIP QVQVRDEGQY QCIIYGVAV DYKYLTLKV      120
ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL AEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSVL      180
RLKPPPPGRNF SCVFWNTHVR ELTLASIDLQ SQMEPRTHPT WEPKSCDKTH TCPPCPAPEL      240
LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE      300
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS      360
RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK      420
SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK                                  453

```

(SEQ ID NO:12)

Даний винахід, зокрема, передбачає варіант здійснення, де зрілий гібридний білок, використовуваний у способах і композиціях винаходу, характеризується видаленою сигнальною послідовністю. В переважному варіанті здійснення сигнальна послідовність повністю видалена.

5 SEQ ID NO:13 надає амінокислотну послідовність людського B7-DC-Ig без сигнальної послідовності.

```

LFTVTVPKEL YIIHGSNVT LECNFDGTGSH VNLGAIASL QKVENDTSPH RERATLLEEQL      60
LPLGKASFHI PQVQVRDEGQ YQCIIYGVA WDYKYLTLKV KASYRKINTH ILKVPETDEV      120
ELTCQATGYPLAEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSV LRLKPPPPGRNF SCVFWNTHV      180
RELTLASIDLQ SQMEPRTHPT WEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS      240
SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW      300
LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY      360
PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTV D KSRWQQGNVF SCSVMHEALH      420
NHYTQKSLSL SPGK                                  434

```

(SEQ ID NO:13).

Даний винахід, зокрема, передбачає варіанти здійснення, де розкриті гібридні білки B7-DC-Ig, використовувані в розкритих тут способах і композиціях, мають послідовність, ідентичну щонайменше на 80 %, 85 %, 90 %, 99 % або 100 % по відношенню до SEQ ID NO: 9, 10, 12 або 13.

У іншому варіанті здійснення винаходу гібридний поліпептид може характеризуватися біспецифічною функцією, відповідно до якої перший гібридний партнер зв'язується з лігандом PD-1, таким як B7-H1, і другий гібридний партнер зв'язується з рецептором PD-1 без ініціації передачі інгібіторного сигналу через рецептор PD-1.

Попри те, що поліпептид, застосований у винаході, може бути мономерним або димерним, самі гібридні білки можуть бути представлені в мономерній або олігомерній формі, переважно у вигляді димеру. В конкретних втіленнях гібридні білки, вживані як антагоністи PD-1 в способах і композиціях винаходу, можуть збиратися спонтанно в олігомерних, зокрема, димерних формі або можуть бути хімічно зв'язані для створення вказаних олігомерів за допомогою способів, добре відомих у даній галузі техніки. Наприклад, гібридний білок, застосований у винаході, може включати частину поліпептиду B7-DC, сполучену з частиною антитіла, й указані частини далі можуть бути зібрані в димер. У одному прикладі поліпептид для застосування у винаході гібридизують у вигляді одного амінокислотного ланцюга з Fc-областю антитіла (наприклад, де вказана конструкція експресується з одного рекомбінантного поліпептиду), після чого два таких гібридних продукти сполучають один з одним для створення гомодимеру, наприклад, за допомогою дисульфідного зв'язку між відповідними Fc-областями.

Вказані димерні продукти можуть бути гомодимерами (де обидва мономерні гібридні білки ідентичні) або можуть бути гетеродимерами (де два різні гібридні білки зв'язані один з одним). Окремі мономери вказаних димерів можуть бути зв'язані способами, відомими в даній галузі техніки, наприклад, за допомогою ковалентного зв'язку (наприклад, дисульфідний зв'язок) або за допомогою нековалентного зв'язку (такий як іонна взаємодія). B7-DC-Ig, застосований у прикладах винаходу, представлений у формі гомодимеру, що містить 2 копії SEQ ID NO: 10, зв'язаних разом дисульфідним зв'язком. Крім того, гетеродимери винаходу включають біспецифічні білки й гібридні білки, в яких одна мономерна частина зв'язується з PD-1 та інша частина зв'язується з природним лігандом PD-1. Вказані гетеродимери створюють шляхом з'єднання поліпептидів і гібридних білків, повністю описаних в іншій частині цього документа.

В іншому корисному варіанті здійснення винаходу антагоніст PD-1 являє собою гетеродимер, де, наприклад, два гібридні білки сполучено разом, але вони не є ідентичними за амінокислотною послідовністю. В конкретному прикладі кожен мономер може включати Fc-

частину антитіла, сполучену з активним фрагментом поліпептиду B7-DC, де вказані активні фрагменти є фрагментами з різних частин поліпептиду B7-DC, або де гібридний білок, що включає Fc-частину антитіла, сполучену з повнорозмірним нативним B7-DC поліпептидом, зв'язаний (наприклад, поперечним зв'язком) з гібридним білком, що містить Fc-частину антитіла й активний фрагмент повнорозмірного нативного поліпептиду B7-DC. У кожному вказаному випадку частина антитіла, використана для створення кожного мономерного гібридного білка, може відрізнитися у двох мономерних одиницях. Будь-яка вказана димерна комбінація зокрема передбачена способами й композиціями винаходу.

У переважному димерному гібридному білку димер отримують у результаті ковалентного зв'язування Cys-залишків у СН-областях двох важких ланцюгів Ig, які є тими самими Cys-залишками, які сполучені дисульфідним зв'язком у димеризованих важких ланцюгах звичайного Ig.

Інше втілення надає тетрамерну конструкцію, що містить субстрат BirA, сполучений з позаклітинним доменом варіантного поліпептиду B7-DC. Способи створення тетрамерних конструкцій відомі в даній галузі техніки (див. Pertovas, et al., J. Exp. Med., 203:2281 (2006)).

7. Анті-pd-1 та інші антитіла

Інші антагоністи PD-1, передбачені способами винаходу, включають антитіла, які зв'язуються з PD-1 або з лігандами PD-1, та інші антитіла.

У одному аспекті даний винахід відноситься до способу збільшення Т-клітинної відповіді у ссавця, який цього потребує, що включає призначення вказаному ссавцеві ефективної схеми лікування, що включає антитіло анти-PD-1 і потенціовальний агент, де вказана схема лікування є ефективною для збільшення Т-клітинної відповіді ссавця на вказаний антиген.

Антитіла анти-PD-1, застосовні у схемі (схемах) лікування винаходу, включають, але без обмеження, антитіла, описані в наступних публікаціях:

- PCT/IL03/00425 (Hardy et al., WO/2003/099196)
- PCT/JP2006/309606 (Korman et al., WO/2006/121168)
- PCT/US2008/008925 (Li et al., WO/2009/014708)
- PCT/JP03/08420 (Honjo et al., WO/2004/004771)
- PCT/JP04/00549 (Honjo et al., WO/2004/072286)
- PCT/IB2003/006304 (Collins et al., WO/2004/056875)
- PCT/US2007/088851 (Ahmed et al., WO/2008/083174)
- PCT/US2006/026046 (Korman et al., WO/2007/005874)
- PCT/US2008/084923 (Terrett et al., WO/2009/073533)
- Berger et al., Clin. Cancer Res., Vol. 14, pp. 30443051 (2008).

Конкретним прикладом антитіла анти-PD-1, застосовного у способах винаходу, є MDX-1106 (див. Kosak, патент США 20070166281 (опубліковано 19 липня 2007), абзац 42), людське антитіло анти-PD-1, що переважно вводиться в дозі 3 мг/кг.

У іншому аспекті даний винахід відноситься до способу збільшення Т-клітинної відповіді у ссавця, який цього потребує, що включає призначення вказаному ссавцеві ефективної схеми лікування, що включає антитіло анти-PD-1 ліганду, наприклад антитіло анти-B7-H1, і потенціовальний агент, де вказана схема лікування є ефективною для збільшення Т-клітинної відповіді вказаного ссавця на вказаний антиген.

Антитіла анти-B7-H1, застосовні у схемі (схемах) лікування винаходу, включають, але без обмеження антитіла, описані в наступних публікаціях:

- PCT/US06/022423 (WO/2006/133396, опублікований 14 грудня 2006)
- PCT/US07/088851 (WO/2008/083174, опублікований 10 липня 2008)
- US 2006/0110383 (опублікований 25 травня 2006).

Конкретним прикладом антитіла анти-B7-H1, застосовного в способах винаходу, є MDX-1105 (WO/2007/005874, опублікований 11 січня 2007)), людське антитіло анти-B7-H1.

Для антитіла анти-B7-DC див. патентні заявки США 7411051, 7052694, 7390888, 20060099203.

Інший варіант втілення винаходу включає біспецифічне антитіло, яке включає антитіло, яке зв'язується з рецептором PD-1, сполучене місточковим зв'язком з антитілом, яке зв'язується з лігандом PD-1, таким як B7-H1. У переважному варіанті здійснення частина, що зв'язує PD-1, зменшує або інгібує сигнальну трансдукцію через рецептор PD-1.

Антитіло для застосування у винаході не обов'язково має бути антитілом анти-PD-1 або антитілом анти-PD-1 ліганду, але може бути іншим антитілом, використовуваним в опосередкуванні ефектів Т-клітини в імунній відповіді. В указаному аспекті даний винахід відноситься до способу збільшення Т-клітинної відповіді на антиген у ссавця, який цього потребує, що включає введення вказаному ссавцеві ефективної схеми лікування, що включає

антитіло анти-CTLA4 і потенціувальний агент, де вказана схема лікування є ефективною для збільшення Т-клітинної відповіді вказаного ссавця на вказаний антиген. Приклад антитіла анти-CTLA4, передбаченого для застосування в способах винаходу, включає антитіло, яке описане в PCT/US2006/043690 (Fischkoff et al., WO/2007/056539).

5 Конкретні приклади антитіла анти-CTLA4, застосованого в способах винаходу, являють собою іпілімумаб, також відомий як MDX-010 або MDX-101, людське антитіло анти-CTLA4, що переважно вводиться в дозі 10 мг/кг, і тремелімуаб людське антитіло анти-CTLA4, що переважно вводиться в дозі 15 мг/кг.

8. Малі молекули антагоністів PD-1

10 Антагоністи рецептора PD-1 також можуть являти собою малі молекулярні антагоністи. Термін "мала молекула" стосується невеликих органічних сполук з молекулярною вагою більше 100 і менше 2500 дальтон, переважно від 100 до 2000, переважніше приблизно від 100 до 1250, переважніше приблизно від 100 до 1000, переважніше приблизно від 100 до 750, переважніше від 200 до 500 дальтон. Малі молекули часто включають циклічний вуглець або гетероциклічні структури і/або ароматичні або поліароматичні структури, заміщені однією або більше функціональними групами. Малі молекулярні антагоністи зменшують або перешкоджають сигнальній трансдукції через рецептор PD-1 шляхом зв'язування з лігандами PD-1, такими як B7-H1 і B7-DC і запобігання взаємодії ліганду з PD-1 або шляхом зв'язування й блокування безпосередньо рецептора PD-1 без ініціації сигнальної трансдукції через рецептор PD-1.

20 У одному варіанті здійснення вказана мала молекула може бути введена в комбінації з іншим антагоністом PD-1 або з антагоністом CTLA4, таким як антитіло, специфічне до PD-1, або один з його лігандів або як антитіло, специфічне до CTLA4, або один з його лігандів. Таким чином, вказані малі молекули можуть бути введені як сполуки в один або більше способи винаходу або можуть бути введені в комбінації з іншими сполуками, вживаними в способах винаходу. Наприклад, показано, що серії малих органічних сполук зв'язуються з лігандом B7-1 для запобігання зв'язуванню з CTLA4 (див. Erbe et al., J. Biol. Chem., Vol. 277, pp. 7363-7368 (2002)). Вказані малі органічні сполуки можуть бути введені окремо або разом з антитілом анти-CTLA4, в комбінації з введенням CTX, для зменшення передачі інгібіторного сигналу Т-клітин.

У одному варіанті здійснення антагоністи PD-1 або антагоністи CTLA4, передбачені для застосування в способах винаходу, включають антисмислові нуклеїнові кислоти, як ДНК, так і РНК, а також молекули siРНК. Вказані антисмислові молекули запобігають експресії PD-1 на Т-клітинах, а також продукцію Т-клітинних лігандів, таких як B7-H1, PD-L1 і PD-L2. Наприклад, siРНК (наприклад, завдовжки приблизно 21 нуклеотид, яка специфічна для гена, кодуєчого PD-1, або кодуєчого ліганд PD-1, і олігонуклеотиди якого можуть бути без зусиль придбані комерційно) об'єднаний з носіями, такими як поліетиленімін (див. Cubillos-Ruiz et al., J. Clin. Invest. 119(8): 2231-2244 (2009)), легко поглинається клітинами, які експресують PD-1, а також ліганди PD-1 і зменшує експресію вказаних рецепторів і лігандів, щоб забезпечити зниження передачі інгібіторного сигналу в Т-клітини, активуючи, тим самим, Т-клітини.

В. Потенціувальні агенти

40 Відповідно до винаходу, активність антагоніста PD-1 збільшується, переважно синергічно, завдяки присутності потенціувального агента. Потенціувальний агент впливає на збільшення ефективності антагоніста рецептора PD-1, можливо за допомогою більш ніж одного механізму, хоча точний механізм дії не є істотно важливим для широкої лікувальної практики даного винаходу.

45 У переважному варіанті здійснення потенціувальний агент являє собою циклофосфамід. Циклофосфамід (CTX, Цитоксан®, або Неосар®) являє собою ліки оксазафосфорин і аналоги і включає іфосфамід (IFO, Іфекс), перфосфамід, трофосфамід (трофосфамід; іксотен) і фармацевтично прийнятні солі, сольвати, проліки та їх метаболіти (патентна заявка США 20070202077, яка включена в усій повноті). Іфосфамід (Мітоксана®) є структурним аналогом циклофосфаміду й механізм його дії вважають ідентичним або в основному схожим з механізмом дії циклофосфаміду. Перфосфамід (4-гідропероксициклофосфамід) і трофосфамід також є алкілюючими агентами, які структурно пов'язані з циклофосфамідом. Наприклад, перфосфамід алкілює ДНК, інгібуючи тим самим реплікацію ДНК і РНК і синтез білка. Нові похідні оксазофосфоринів були створені й оцінені як спроба поліпшити селективність і отримати відповідь з меншою цитотоксичністю для господаря (Liang J, Huang M, Duan W, Yu XQ, Zhou S. Design of new oxazaphosphorine anticancer drugs. Curr Pharm Des. 2007;13(9):963-78. Review). Вказані похідні включають мафосфамід (NSC 345842), глуфосфамід (D19575, бета-D-глікозилізофосфорамід гірчиці), S-(-)-бромфосфамід (CBM-11), NSC 612567 (альдофосфамід пергідротіазин) і NSC 613060 (альдофосфамід тіазолідин). Мафосфамід є аналогом оксазафосфорину, який є хімічно стабільною сіллю 4-тіоетансульфонової кислоти 4-гідрокси-

CPA. Глүфосфамід є похідною IFO, де ізофосфорамід гірчиці, алкілюючий метаболіт IFO, зв'язаний глікозидним зв'язком з молекулою бета-D-глюкози. Додаткові аналоги циклофосфаміду описані в патенті США 5190929 під назвою "Аналоги циклофосфаміду, застосовні як протипухлинні агенти", який включений в опис за допомогою посилання в усій своїй повноті.

У інших втіленнях потенціювальний агент являє собою агент, який зменшує активність і число регуляторних Т-лімфоцитів (T-reg), переважно сунітиніб (SUTENT®), анти-TGFβ або іматиніб (GLEEVAC®). Описана схема лікування також може включати введення ад'юванта.

Придатні потенціювальні агенти також включають інгібітори мітозу, такі як паклітаксел, інгібітори ароматази (наприклад, летрозол) і інгібітори ангиогенезу (інгібітори VEGF, наприклад, авастин, VEGF-Trap) (див., наприклад, Li et al., Vascular endothelial growth factor blockade reduces intratumoral regulatory T-cells and enhances the efficacy of a GM-CSF-secreting cancer immunotherapy. Clin Cancer Res. 2006 Nov 15;12(22):6808-16.), антрацикліни, оксаліплатин, доксорубіцин, антагоністи TLR4, і антагоністи IL-18.

С. Фармацевтичні композиції

У одному аспекті винахід відноситься до терапевтичної композиції, що містить молекулу, яка запобігає передачі інгібіторного сигналу через PD-1, або антагоніст CTLA4, і потенціювальний агент, у фармацевтично прийнятному носіїві. Компоненти вказаної композиції представлені в кількості, ефективній для збільшення Т-клітинної відповіді у ссавця. В конкретних втіленнях, потенціювальний агент являє собою циклофосфамід або аналог циклофосфаміду, приклади таких аналогів перераховані вище.

У інших конкретних прикладах потенціювальний агент являє собою агент, який зменшує активність регуляторних Т-лімфоцитів (T-reg), де переважно активність знижується внаслідок зменшення числа вказаних Т-reg. У переважних необмежуваних варіантах здійснення, агент являє собою сунітиніб (SUTENT®), анти-TGFβ або іматиніб (GLEEVAC®).

Потенціювальний агент, застосовний у складанні композиції винаходу, також включає інгібітори мітозу, такі як паклітаксел, інгібітори ароматази (наприклад, летрозол), інгібітори ангиогенезу (інгібітори VEGF, наприклад, авастин, VEGF-Trap), антрацикліни, оксаліплатин, доксорубіцин, антагоністи TLR4 і антагоністи IL-18.

Терапевтична композиція винаходу також за бажанням включає щонайменше один додатковий агент, який може бути одним або більше антитіло анти-PD-1, антитіло анти-CTLA4, інгібітор мітозу, інгібітор ароматази, антагоніст рецептора аденозину A2a (A2AR) або інгібітор ангиогенезу.

Будь-яка з терапевтичних композицій винаходу також може містити один або більш ад'ювантів, які описані в цьому документі.

Антагоніст PD-1, застосовний як компонент терапевтичної композиції винаходу, включає будь-який з антагоністів PD-1, перерахованих в описі для застосування в будь-якому зі способів винаходу. Наприклад, вказаний антагоніст PD-1 включає будь-який з гібридних білків, перерахованих в описі. Вказаний антагоніст також може бути будь-яким з поліпептидів або PD-1-зв'язуючих фрагментів, перерахованих у описі для застосування як першої поліпептидної частини будь-якого з гібридних білків, описаних для застосування в будь-якому зі способів винаходу. Такий антагоніст може далі бути антитілом, таке як будь-яке з відомих антитіл анти-PD-1, анти-B7-DC або ант-B7-H1, згаданих в описі.

Терапевтична композиція винаходу також включає на додаток або замість вищезазначеного антагоніста PD-1 антитіло анти-CTLA4. Така композиція, відповідно, містить вказане антитіло анти-CTLA4 і потенціювальний агент з числа вже описаних тут.

Терапевтична композиція винаходу знаходить застосування в будь-якому зі способів винаходу, розкритих у описі. Вказана композиція, попри те, що призначена для застосування як активне лікування стану хвороби, також може знайти застосування як профілактична композиція для запобігання будь-якому із захворювань, перерахованих в описі.

У одному аспекті даний винахід передбачає терапевтичну композицію, що містить антагоніст PD-1 і потенціювальний агент у фармацевтично прийнятному носіїві, де антагоніст PD-1 і потенціювальний агент представлені в кількості, ефективній для збільшення Т-клітинної відповіді у ссавця.

Терапевтичні композиції в обсязі винаходу включають композиції, що містять будь-яку й усі комбінації антагоністів PD-1 і антитіл, розкритих в описі, з будь-яким з перерахованих потенціювальних агентів. Як необмежувачі приклади терапевтична композиція винаходу включає композицію, що містить ефективну кількість одного або більше антагоністів PD-1, наприклад, комбінацію будь-якого або всіх повнорозмірних поліпептидів, наведених тут у вигляді конкретних SEQ ID NO або їх гомологів, разом з одним або більш фрагментами будь-якого з

указаних поліпептидів, включаючи комбінації, де будь-яке або всі з них сполучені з іншими білками, наприклад, сполучені з одним або більш імуноглобулінами, перерахованими тут, або не сполучені, й комбінації містять один або більше потенціовальних агентів, таких як циклофосфамід окремо, або циклофосфамід плюс один або більше його аналоги, лише один або більше аналогів циклофосфаміду, або потенціовальний агент може складатися з циклофосфаміду й агента, який зменшує число T-reg у ссавця, одержуючого композицію, або може складатися з аналога циклофосфаміду плюс агент, який зменшує число T-reg, або потенціовальний агент може складатися лише з одного або більше агентів, які зменшують число T-reg або іншу активність T-reg. Усі вказані комбінації передбачені винаходом, якщо лише композиція включає щонайменше один антагоніст PD-1 і антитіло, що опосередковує T-клітинну активність, і щонайменше один потенціовальний агент.

Композиції винаходу також можуть включати додаткові активні агенти. В переважних утіленнях будь-якої композиції винаходу фармацевтична або терапевтична композиція далі включає щонайменше один додатковий агент, вибраний з групи, що включає антитіло анти-PD-1, антитіло анти-CTLA4, інгібітор мітозу, такий як паклітаксел, інгібітор ароматази, такий як летрозол, антагоніст A2AR, інгібітор ангиогенезу, антрацикліни, оксалиплатин, доксорубіцин, антагоністи TLR4, і антагоністи IL-18.

Антагоніст PD-1 і потенціовальний агент можуть бути введені за допомогою будь-яких відповідних засобів. У переважному варіанті здійснення антагоніст PD-1 і потенціовальний агент вводять у водному розчині, за допомогою парентеральної ін'єкції. Композиція також може бути у формі суспензії або емульсії. В цілому, надають фармацевтичні композиції, що включають ефективні кількості пептиду або поліпептиду, й додатково включають фармацевтично прийнятні розчинники, консерванти, солюбілізатори, емульгатори, ад'юванти й/або носії. Вказані композиції включають розчинники: стерилізовану воду, забуферений фізіологічний розчин з різним буферним складом (наприклад, Tris-HCl, ацетат, фосфат), різними значеннями рН та іонної сили; і за бажанням, добавки, такі як детергенти і солюбілізуючий компонент (наприклад, TWEEN 20, TWEEN 80, Polysorbate 80), антиоксиданти (наприклад, аскорбінова кислота, матабісульфіт натрію), і консерванти (наприклад, тимерсол, бензиловий спирт) і об'ємотвірні субстанції (наприклад, лактоза, манітол). Прикладами неводних розчинників або середовищ для ліків є пропіленгліколь, поліетиленгліколь, рослинні олії, такі як оливкове масло і кукурудзяне масло, желатин, і органічні ефіри для ін'єкцій, такі як етилолеат. Композиції можуть бути ліофілізовані й повторно розчинені/ресуспендовані безпосередньо перед вживанням. Композиції можуть бути простерилізовані, наприклад, шляхом фільтрування через фільтри, затримуючі бактерії, зі шляхом включення в композиції стерилізуючих агентів, шляхом опромінення композиції або шляхом нагрівання композиції.

Фармацевтичні композиції винаходу можуть бути введені парентеральним (внутрішньом'язова, внутрішньоочеревинна, внутрішньовенна (IV) або підшкірна ін'єкція), трансдермальним (або пасивно, або з використанням електрофорезу або електропорації), або трансмукозальним (назальним, вагінальним, ректальним або сублінгвальним) способом введення. Способи винаходу не виключають введення антагоніста PD-1 і потенціовального агента окремими й різними шляхами (наприклад, місцево).

Антагоніст PD-1 і потенціовальний агент можуть бути введені в той самий або в різні моменти часу, при цьому потенціовальний агент вводять до або після введення антагоніста PD-1. У одному варіанті здійснення потенціовальний агент вводять як до так і після введення антагоніста PD-1. У одному такому варіанті здійснення той самий потенціовальний агент вводять до і після введення антагоніста PD-1. У іншому варіанті здійснення потенціовальний агент вводять до введення антагоніста PD-1.

Використовуваний в описі термін "ефективна кількість" або "терапевтично ефективна кількість" означає дозу, достатню для лікування інгібування або полегшення одного або більше симптомів порушення, яке лікують, або для надання іншим чином бажаного фармакологічного й фізіологічного ефекту. Точне дозування варіюватиметься залежно від ряду чинників, таких як суб'єкт-залежні змінні (наприклад, вік, стан імунної системи тощо), захворювання, й вироблюване лікування. Терапевтично ефективні кількості антагоністів рецепторів PD-1 і антитіл разом з потенціовальними агентами викликають імунну відповідь, яка має бути досягнута або підтримана.

Вибрана доза залежить від бажаного терапевтичного ефекту, від шляху введення, і від тривалості необхідного лікування. Зазвичай рівні доз 0,001-50 мг/кг маси тіла вводять ссавцям щодня. Переважно, вказана доза складає 1-50 мг/кг, переважніше 1-40 мг/кг, або навіть 1-30 мг/кг, при цьому доза 2-20 мг/кг є також переважною дозою. Приклади інших доз включають 2-15 мг/кг, або 2-10 мг/кг або навіть 3-5 мг/кг, при цьому доза 4 мг/кг являє собою конкретний

приклад.

У схемах лікування із застосуванням потенціювального агента й антитіла, такого як антитіло анти-PD-1 або антитіло анти-CTLA4, дози зазвичай відповідають інтервалу 0,1-100 мг/кг, при цьому вужчі інтервали від 1 до 50 мг/кг є переважними, і діапазони від 10 до 20 мг/кг є переважнішими. Відповідна доза для суб'єкта людини складає 5-15 мг/кг, при цьому доза антитіла 10 мг/кг (наприклад, людське антитіло анти-PD-1, аналогічне MDX-1106) є найбільш переважною (плюс відповідна доза циклофосфаміду або іншого потенціювального агента, введена приблизно за 24 години перед введенням антитіла).

В цілому, лише як приклад, лікарські форми на основі ваги тіла для будь-якого з антагоністів сигнальної трансдукції, застосовного в способах винаходу, включають дози в діапазоні 5-300 мг/кг або 5-290 мг/кг, або 5-280 мг/кг, або 5-270 мг/кг, або 5-260 мг/кг, або 5-250 мг/кг, або 5-240 мг/кг, або 5-230 мг/кг, або 5-220 мг/кг, або 5-210 мг/кг, або 20-180 мг/кг, або 30-170 мг/кг, або 40-160 мг/кг, або 50-150 мг/кг, або 60-140 мг/кг, або 70-130 мг/кг, або 80-120 мг/кг, або 90-110 мг/кг, або 95-105 мг/кг, причому дози 3 мг/кг, 5 мг/кг, 7 мг/кг, 10 мг/кг, 15 мг/кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг, 30 мг/кг, 50 мг/кг і 100 мг/кг є конкретними прикладами переважних доз. Указані дози, зрозуміло, можуть бути введені повторно. Доза, зрозуміло, корелюватиме з виглядом ссавця, одержуючого вказану дозу. Дози перерахованих вище інтервалів мг/кг є придатними для ссавців, включаючи гризунів, таких як миші й щури, і для приматів, особливо для людини, дози, що складають приблизно 5 мг/кг, 10 мг/кг і 15 мг/кг, є особливо переважними для лікування людини.

Відповідно до схеми лікування винаходу потенціювальний агент, наприклад, циклофосфамід вводять у нетоксичних дозах, які варіюють залежно від вигляду тварини. В конкретних втіленнях потенціювальний агент вводять за допомогою будь-якого відповідного способу введення, включаючи парентеральний або пероральний, перший спосіб, з двох згаданих вище, включає системне введення, таке як внутрішньовенне введення. Наприклад, потенціювальний агент, подібний циклофосфаміду, зазвичай вводять перорально. Вказане введення може відбуватися в будь-якій зручній дозі, залежній від потенціювального агента. Доза в кожному випадку може бути заснована на масі тіла або доза може бути введена у вигляді одиничної дози.

Попри те, що СТХ сам по собі не токсичний, деякі з його метаболітів є цитотоксичними алкілюючими агентами, які індукують утворення перехресних зв'язків у ДНК і, у високих дозах, розриви ланцюга. Багато клітин є стійкими до СТХ, тому що вони експресують високі рівні детоксикуючого ферменту альдегіддегідрогенази (ALDH). СТХ впливає на проліферуючі лімфоцити, оскільки лімфоцити (але не гемопоетичні стоволові клітини) експресують низькі рівні ALDH, і клітини, що діляться, є найбільш чутливими до ДНК-алкілюючих агентів.

Низькі дози СТХ (<200 мг/кг) можуть мати імуностимулюючі ефекти, що включають стимуляцію протипухлинних імунних відповідей у людських і мишачих моделях раку (Brode & Cooke Crit Rev. Immunol. 28:109-126 (2008)). Вказані низькі дози є субтерапевтичними й не мають безпосередньої протипухлинної активності. Навпаки, високі дози СТХ інгібують протипухлинну відповідь. Роль СТХ у потенціюванні протипухлинної імунної відповіді можна пояснити декількома механізмами: (а) виснаження CD4+CD25+FoxP3+Treg (і особливо проліферуючих Treg, які можуть бути особливо супресивними), (b) виснаження В-лімфоцитів; (c) індукція оксиду азоту (NO), що приводить до супресії зростання пухлинних клітин; (d) мобілізація й розмноження CD11b+Gr-1+MDSC. Вказані первинні ефекти володіють багаточисельними вторинними ефектами; наприклад, після виснаження Treg макрофаги виробляють більша кількість IFN-γ і менша кількість IL-10. Також показано, що СТХ індукує експресію IFN типу I й підсилює гомеостатичну проліферацію лімфоцитів.

Виснаження Treg найчастіше згадують як механізм, за допомогою якого СТХ потенціює протипухлинну імунну відповідь. Указаний висновок ґрунтується частково на результатах експериментів з адаптивного перенесення. В моделі із застосуванням пухлинних клітин AB1-НА обробка СТХ на 9-й день забезпечувала показник ефективності лікування 75 %. Перенесення очищених Treg на 12-й день майже повністю інгібувало СТХ-відповідь (van der Most et al. Cancer Immunol. Immunother. 58:1219-1228 (2009)). Схожий результат спостерігали в моделі з пухлинними клітинами ННД2: адаптивне перенесення CD4+CD25+Treg після попередньої обробки СТХ усувало терапевтичну відповідь на вакцину (Taieb.J. J. Immunol. 176:2722-2729 (2006)).

Численні клінічні випробування за участю людей показали, що СТХ у низькій дозі є безпечним, добре переносимим і ефективним агентом для стимулювання протипухлинних імунних відповідей (Bas & Mastrangelo Cancer Immunol. Immunother. 47:1-12 (1998)).

Оптимальною дозою СТХ для потенціювання протипухлинної імунної відповіді є доза, яка знижує в цілому кількості Т-клітин при зниженні рівнів Treg нижче за діапазон нормальних значень, але яка є субтерапевтичною дозою (див. Machiels et al. Cancer Res. 61:3689-3697

(2001)).

У клінічних випробуваннях за участю людей, де СТХ використовували як імунотенцируючий агент, зазвичай застосовували дозу 300 мг/м². Для людини середньої комплекції (6 футів, 170 фунтів (78 кг) з площею поверхні тіла 1,98 м²), 300 мг/м² складає 8 мг/кг, або 624 мг загального білка. В мишачій моделі раку ефективність спостерігали в дозах, що змінювалися в діапазоні 15-150 мг/кг, що відповідає 0,45-4,5 мг загального білка в миші вагою 30 г (Machiels et al. Cancer Res. 61:3689-3697 (2001), Hengst et al Cancer Res. 41:2163-2167 (1981), Hengst Cancer Res. 40:2135-2141 (1980)).

Для крупніших ссавців, таких як примат, переважно людина, пацієнт, можуть бути використані вказані дози мг/м², але стандартні дози, що вводяться протягом кінцевого проміжку, можуть бути переважними. Вказані стандартні дози можуть бути введені на щоденній основі протягом кінцевого проміжку часу, наприклад, до 3 днів або до 5 днів, або до 7 днів, або до 10 днів, або до 15 днів, або до 20 днів, або до 25 днів, всі специфічно передбачені винаходом. Аналогічні схеми введення можуть бути застосовані для інших потенціовальних агентів, перерахованих в описі.

Всі вказані введення можуть відбуватися до або після введення PD-1-зв'язуючої молекули винаходу. Альтернативно, одна або більше доз PD-1-зв'язуючої молекули винаходу можуть бути рознесені в часі з уведенням потенціовального агента для формування одноманітного або неодноманітного курсу лікування, при якому вводять одну або більше дозу потенціовального агента з подальшими однією або більше дозами PD-1-зв'язуючої сполуки з подальшими однією або більше дозами потенціовального агента, згідно з графіком, вибраним або заданим дослідником або лікарем, які вводять вказані агенти.

В інших конкретних варіантах здійснення схема лікування включає багатократні введення одного або більш за антагоністів PD-1. У деяких варіантах здійснення вказані багатократні введення антагоністів PD-1 відбуваються у поєднанні з багатократними введеннями того самого або різних потенціовальних агентів.

Як і в інших втіленнях винаходу, тут потенціовальний агент вводять щонайменше за 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 24 або 30 годин до або після введення антагоніста PD-1.

Фармацевтичні композиції, використовувані тут, також містять фармацевтично прийнятний носій, що включає будь-який відповідний розчинник або середовище для ліків, який включає будь-який фармацевтичний агент, який сам не викликає продукції антитіл, шкідливих для суб'єкта, що приймає композицію, і який може бути введений без неспецифічної токсичності. Фармацевтично прийнятні носії включають, але без обмеження рідини, такі як вода, фізіологічний розчин, гліцерин і етанол і т.п., включаючи носії, використовувані для створення спреїв для назальної доставки й іншої доставки через респіраторний тракт, або для доставки в зорову систему. Повне обговорення фармацевтично прийнятних носіїв, розчинників та інших середовищ для ліків представлено в REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. current edition).

Композиції вакцин (як обговорюється нижче) далі можуть включати додаткові речовини для стабілізації значення рН, або для функціонування як ад'ювантів, зволожуючих агентів або емульгуючих агентів, які можуть служити для поліпшення ефективності вакцини.

Вакцини зазвичай створюють для парентерального введення і вводять або підшкірно, або внутрішньом'язово. Вказані вакцини також можуть бути створені у вигляді супозиторіїв або для перорального введення, за допомогою методів, відомих у даній галузі техніки, або для введення через назальний або респіраторний шлях.

D. Способи одержання

Ізольований поліпептидний антагоніст PD-1, включаючи варіанти, гомологи та їх фрагменти, або дикого типу, або білки, що мутували, й гібридні, що містять будь-яке зі вказаного, всі передбачені для включення у винахід, можуть бути отримані, наприклад, за допомогою хімічного синтезу або за допомогою рекомбінантної продукції в клітці-господарі. Для рекомбінантного одержання співстимулюючого поліпептиду нуклеїнова кислота, що містить нуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, може бути використана, щоб трансформувати, трансдукувати або трансфікувати бактерійну або еукаріотичну клітину-господар (наприклад, клітину комахи, дріжджів або ссавця). Слід розуміти, що нуклеотидні послідовності можуть бути оптимізовані для кодону для збільшення рівнів експресії білка в певному типі клітини-господаря. Способи оптимізації кодонів добре відомі в даній галузі техніки. В цілому, конструкції нуклеїнових кислот включають регуляторну послідовність, функціонально зв'язану з нуклеотидною послідовністю, що кодує співстимуляторний поліпептид. Регуляторні послідовності (що також позначаються тут як послідовності контролю експресії) зазвичай не кодують генний продукт, але замість цього впливають на експресію послідовностей нуклеїнової

кислоти, з якою вони функціонально зв'язані. Сигнальні пептиди, використовувані, щоб секретувати білки з клітини, можуть бути ендogenousними сигнальними пептидами або будь-яким іншим сигнальним пептидом, який полегшує секрецію гібридного білка з господаря.

Для загальних молекулярно-біологічних процедур, використовуваних у здійсненні даного винаходу, є низка стандартних посилань, які містять процедури, добре відомі в області молекулярної біології й генної інженерії, і немає необхідності описувати вказані процедури далі в цьому документі. Корисні посилання включають Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Wu et al, *Methods in Gene Biotechnology* (CRC Press, New York, NY, 1997), і *Recombinant Gene Expression Protocols*, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 62, (Tuan, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 1997), розкриття яких таким чином включені за допомогою посилання.

Е. Лікування захворювання

Захворювання, які лікують або яким запобігають за допомогою введення терапевтичної комбінації, наданої даним винаходом, включають злоякісну пухлину або хронічне інфекційне захворювання, викликане бактерією, вірусом, простішим, гельмінтом або іншим мікробним патогеном, який проникає всередину клітини. Вказані захворювання часто лікують за допомогою атаки цитотоксичних Т-лімфоцитів. Оскільки даний винахід пропонує комбіновані терапії, корисні для посилення Т-клітинних відповідей за допомогою збільшення Т-клітинної активності, збільшення Т-клітинної проліферації й зменшення Т-клітинних інгібіторних сигналів, комбіновані терапії винаходу мають унікальну перевагу в лікуванні (або навіть у запобіганні) вказаних захворювань. У одному варіанті здійснення, оскільки вірусні інфекції усуваються, головним чином, Т-клітинами, збільшення Т-клітинної активності є терапевтично доцільним для посилення виведення інфекційного вірусного агента з організму тварини або примату, переважно людини, суб'єкта. Таким чином, розкриті сполуки винаходу, з активністю антагоніста рецептора PD-1, разом з потенціювальним агентом діють у комбінації для лікування місцевих або системних вірусних інфекцій. Інфекції, які лікують за допомогою сполук винаходу включають, але без обмеження, імунодефіцит (наприклад, HIV), папілому (наприклад, HPV), герпес (наприклад, HSV), енцефаліт, грип (наприклад, вірус грипу людини А), гепатит (наприклад, HCV, HBV) і простудні (наприклад, риновірус людини) вірусні інфекції. Фармацевтичні складки композицій антагоністів рецептора PD-1 також можуть бути введені для лікування системних вірусних захворювань, включаючи, але без обмеження, СНІД, грип, простудні захворювання або енцефаліт.

Невірусні інфекції, що піддаються лікуванню сполуками винаходу, включають, але без обмеження інфекції, що викликаються мікроорганізмами, включаючи, але без обмеження *Actinomyces*, *Anabaena*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bdellovibrio*, *Bordetella*, *Borrelia*, *Campylobacter*, *Caulobacter*, *Chlamydia*, *Chlorobium*, *Chromatium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Cytophaga*, *Deinococcus*, *Escherichia*, *Francisella*, *Halobacterium*, *Heliobacter*, *Haemophilus*, *Hemophilus influenza* тип В (HIB), *Hyphomicrobium*, *Legionella*, *Leptspirosis*, *Listeria*, *Meningococcus* А, В і С, *Methanobacterium*, *Micrococcus*, *Myobacterium*, *Mycoplasma*, *Myxococcus*, *Neisseria*, *Nitrobacter*, *Oscillatoria*, *Prochloron*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Phodospirillum*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Spirillum*, *Spirochaeta*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Sulfolobus*, *Thermoplasma*, *Thiobacillus*, *Treponema*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma* sp. (наприклад, *Histoplasma capsulatum*), *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Nocardia asteroides*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Leishmania*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydial psittaci*, *Chlamydial trachomatis*, *Plasmodium* sp. (наприклад, *Plasmodium falciparum*), *Trypanosoma brucei*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis* і *Schistosoma mansoni*. У одному варіанті здійснення даний винахід надає способи й композиції для індукції або посилення імунної відповіді господаря для лікування раку. Типи раку, що їх можна лікувати запропонованими композиціями й способами включають, але без обмеження, наступні: рак сечового міхура, рак мозку, рак молочної залози, рак шийки матки, колоректальний рак, рак стравоходу, рак нирок, рак печінки, рак легенів, назофарингеальний рак, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози, рак шкіри, рак шлунку, рак матки, рак яєчників, рак яєчок і гематологічний рак.

Злоякісні пухлини, які можуть бути піддані дії, класифікують тут відповідно до ембріонального походження тканини, з якої розвивається пухлина. Карциномами є пухлини, що виникають з ендодермальної або ектодермальної тканин, таких як шкіра або епітеліальне вистилання внутрішніх органів і залоз. Саркоми, які виникають рідше, походять з мезодермальних сполучних тканин, таких як кістка, жир і хрящ. Лейкемії та лімфоми є злоякісними пухлинами гемопоетичних клітин кісткового мозку. Лейкемії проліферують у вигляді окремих клітин, тоді як лімфоми виявляють тенденцію до зростання у вигляді пухлинних мас. Злоякісні пухлини можуть виявлятися в різних органах і тканинах організму при постановці

діагнозу раку.

Як демонстрація корисності схем лікування винаходу, мишачий аналог B7-DC-Ig (у якому мишачий B7-DC ECD, який характеризується 72 % ідентичності послідовності з білком людини, сполучений з Fc-доменом мишачого IgG2a) тестували в сингенних мишачих пухлинних моделях колоректального раку, мастоцитом та інших типів пухлини, що включають попередню обробку циклофосфамідом (CTX), як описано в цьому документі.

Результати показали, що лікування однократною субтерапевтичною дозою CTX, який діє як імунопотенціювальний агент, з подальшим введенням мишачого B7-DC-Ig ліквідує прищеплені пухлини CT26 карциноми товстої кишки у 80 % тварин. Далі, в дослідженнях з повторним введенням клітин лінії CT26 карциноми товстої кишки не виявили повторного зростання пухлини у мишей, з раніше знищеними пухлинами після лікування CTX + мишачий B7-DC-Ig. Також показано, що вказані миші характеризувалися підвищеною популяцією специфічних для пухлини CTL в порівнянні з нативними мишами.

В одному варіанті здійснення даний винахід передбачає застосування сполуки, яка зменшує передачу інгібіторного сигналу в Т-клітину, як описано в іншому розділі цього документа, для одержання ліків для збільшення Т-клітинної відповіді за допомогою комбінованої терапії, де вказану сполуку вводять у поєднанні з потенціювальним агентом. Далі, сполуку, яка зменшує передачу інгібіторного сигналу в Т-клітину, і вказаний потенціювальний агент надають у вигляді окремих медикаментів для введення в різні моменти часу, де переважно потенціювальний агент вводять раніше, ніж сполуку, яка зменшує передачу інгібіторного сигналу, наприклад, аж до 24 годин до введення інгібіторної сполуки (або інші інтервали часу, перераховані в описі). Переважно, сполука й потенціювальний агент призначені для лікування інфекційного захворювання або раку, включаючи захворювання, викликані будь-якими інфекційними агентами або видами раку, перерахованими в цьому документі. В переважному варіанті здійснення сполукою, застосовною у вказаних способах, є рекомбінантний білок, що складається з ECD людини B7-DC сполученого з Fc-доменом людини IgG₁, що позначається тут як B7-DC-Ig.

У одному варіанті здійснення даний винахід відноситься до медичного набору для введення сполуки, яка зменшує передачу інгібіторного сигналу в Т-клітину, як розкрито в описі, в комбінації з потенціювальним агентом, вказаний набір включає:

- (a) запас дози сполуки, яка зменшує передачу інгібіторного сигналу в Т-клітину;
- (b) запас потенціювального агента;
- (c) запас фармацевтично прийняттого носія; і
- (d) віддруковані інструкції з введення сполуки при застосуванні, як описано вище.

F. Комбіноване лікування

Вакцини викликають сильну Т-клітинну відповідь для знищення ракових клітин й інфікованих клітин або інфекційних агентів. Антагоністи рецептора PD-1, описані в цьому документі, можуть бути введені у вигляді компонента вакцини разом з потенціювальним агентом, для надання співстимуляторного сигналу Т-клітинам. Вакцини, розкриті в описі, включають антигени, антагоніст рецептора PD-1 і додатково ад'юванти й таргетні молекули.

Антигени, проти яких підсилюють Т-клітинну відповідь за допомогою способів і композицій винаходу, включають пептиди, білки, полісахариди, сахариди, ліпіди, нуклеїнові кислоти або їх комбінації. Антигени в разі захворювання представлені в результаті патологічного процесу.

Розкриті композиції антагоністів рецептора PD-1 можуть бути введені у поєднанні з профілактичними вакцинами, які викликають у суб'єкта стійкість до подальшої дії інфекційних агентів, або в поєднанні з терапевтичними вакцинами, які можуть бути використані, щоб ініціювати або підсилити імунну відповідь у суб'єкта на заданий антиген, такий як пухлинний антиген у суб'єкта, що має рак, або вірусний антиген у суб'єкта, інфікованого вірусом.

Бажаний результат профілактичного, терапевтичного або десенсибілізаційної імунної відповіді може варіюватися залежно від захворювання, виходячи з принципів, добре відомих у даній галузі техніки. Наприклад, імунна відповідь проти інфекційного агента може повністю запобігти колонізації й реплікації інфекційного агента, викликаючи "стерильний імунітет" і відсутність симптомів захворювання. Проте вакцина проти інфекційних агентів може вважатися ефективною, якщо вона зменшує кількість, важкість або тривалість симптомів; якщо вона зменшує кількість суб'єктів у популяції, що мають симптоми захворювання; або зменшує передачу інфекційного агента. Аналогічним чином, імунні відповіді проти раку, алергенів або інфекційних агентів можуть повністю вилікувати захворювання, можуть зменшити симптоми або можуть бути однією гранню загальної терапевтичної дії на захворювання. Наприклад, стимуляція імунної відповіді проти раку може поєднуватися з хірургічним, хімотерапевтичним, радіологічним, гормональним та іншими імунологічними підходами, щоб впливати на лікування.

Способи й продукти винаходу не виключають застосування ад'юванта на додаток до потенціовального агента. Такий ад'ювант може бути доданий, наприклад, разом з антагоністом PD-1. Ад'юванти, використовувані в композиціях і способах винаходу, включають, але без обмеження, один або більше з наступних: масляні емульсії (наприклад, ад'ювант Фрейнда);

5 препарати сапоніну; віросоми й вірусоподібні частки; бактерійні та мікробні похідні; імуностимулюючі олігонуклеотиди; Адф-рибозилуючі токсини й знешкоджені похідні; галун; BCG; мінераловмісні композиції (наприклад, мінеральні солі, такі як солі алюмінію й солі кальцію, гідроксиди, фосфати, сульфати тощо); біоадгезиви й мукоадгезиви; мікрочастки; ліпосоми; композиції ефірів поліоксіетилену й складних ефірів поліоксіетилену; мурамілові

10 пептиди; поліфосфазен; сполуки імідазолхінолону; й поверхнево-активні речовини (наприклад, лізолецитин, поліоли плуроніка, поліаніони, пептиди, масляні емульсії, гемоціанін лімфи равлика і динітрофенол). Корисні ад'юванти також включають імуномодулятори, такі як цитокіни, інтерлейкіни (наприклад, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 тощо), інтерферони (наприклад, інтерферон-γ), макрофагальний колонієстимулюючий чинник і чинник некрозу

15 пухлини.

Немає жодних перешкод для введення розкритого антагоніста рецептора PD-1, включаючи поліпептиди, фрагменти, варіанти, гомологи й гібридні білки, розкриті тут, суб'єктові, який потребує їх, в комбінації з одним або більш додатковими терапевтичними агентами (на додаток до потенціовального агента). Додаткові терапевтичні агенти вибирають, виходячи із стану, порушення або захворювання, яке потрібно лікувати. Наприклад, антагоністи рецептора PD-1

20 можуть бути введені спільно з одним або більш додатковими агентами, функцією яких є посилення або сприяння розвитку імунної відповіді, та які розглядають в описі як активні агенти. Вказані агенти включають, але без обмеження амсакрин, блеоміцин, бусульфат, капецитабін, карбоплатин, кармустин, хлорамбуцил, цисплатин, кладрибін, клофарабін, кризантаспазу, цитарабін, дакарбазин, дактиноміцин, даунорубіцин, доцетаксел, доксорубіцин, епірубіцин, етопозид, флударабін, фторурацил, гемцитабін, гідроксикарбамід, ідарубіцин, іфосфамід, іринотекан, лейковорин, ліпосомальний доксорубіцин, ліпосомальний даунорубіцин, ломустин, мелфалан, меркаптопурин, месну, метотрексат, мітоміцин, мітоксантрон, оксалиплатин, паклітаксел, пеметрексед, пентостатин, прокарбазин, ралтитрексед, сатраплатин,

25 стрептозоцин, тегафур-урацил, темозоломід, теніпозид, тіотепа, тіогуанін, топотекан, треосульфат, вінбластин, вінкрисдин, віндезин, вінорелбін або їх комбінації. Типові проапоптатичні агенти включають, але без обмеження флударабін, стауроспорин, циклогексимід, актиноміцин D, лактозилцерамід, 15d-PGJ(2) та їх комбінації.

Види терапії, що надаються способами й композиціями даного винаходу, також можуть бути використані у поєднанні з іншими типами терапії, наприклад, з променевою терапією, хірургічним втручанням і тому подібне.

35

G. Аналізи активності антагоніста

Даний винахід описує ряд специфічних структур, корисних у здійсненні способів винаходу. Інші сполуки, що мають антагоністичну активність і використовувані у способах винаходу, також

40 можуть бути ідентифіковані за допомогою посилання на добре відомі методики аналізу для ідентифікації хімічних структур, які зв'язуються з PD-1, CTLA4, та їх лігандів, які також мають здатність зменшувати передачу інгібіторного сигналу в Т-клітині. Деякими вказаними аналізами є аналізи зв'язування, вживані для визначення, чи зв'язується вибрана хімічна структура з рецепторами; вказані аналізи добре відомі в даній галузі техніки, й немає необхідності детально розглядати їх у цьому документі (див., наприклад, патент США 2008/0274490, (опублікований 6

45 листопада 2008) і патент США 7105328 (опублікований 12 вересня 2006), у кожному з яких показані тести для визначення модуляторів сигнальної системи PD-1, що використовують Т-клітини), розкриття яких, таким чином, включені за допомогою посилання в усій своїй повноті. Інші тести використовують для визначення ефектів агентів винаходу, таких як активні

50 фрагменти, на активацію Т-клітин за допомогою збільшення проліферації й/або продукції цитокінів. Вказані аналізи також добре відомі в даній галузі техніки. Наприклад, підвищена проліферація клітин може бути продемонстрована за допомогою збільшення захвату 3Н-тимідину (в результаті збільшеного синтезу ДНК, необхідного для клітинного розмноження) або за допомогою ІФА і/або РІА для виявлення підвищеної продукції цитокінів Т-клітинами в

55 культурі.

У одному такому експерименті PD-1-зв'язуючу активність B7-DC-Ig людини оцінювали за допомогою ІФА. 96-лункові планшети для тесту ІФА покривали 100 мкл 0,75 мкг/мл рекомбінантного людського PD-1/Fc (R&D Systems), розведеного в буфері BupH карбонат/бікарбонат, рН 9,4 (Pierce) на 2 години і потім блокували розчином BSA (Jackson ImmunoResearch) протягом 90-120 хвилин. Серійні розведення B7-DC-Ig людини (дикий тип, а

60

також мутеїн D111S, і мутанти K113S, які вибрали внаслідок зниженого зв'язування з PD-1), а також ізотипу IgG₁ людини, як контроль, вводили для зв'язування протягом 90 хвилин. Зв'язаний B7-DC-Ig виявляли із застосуванням 100 мкл 0,5 мкг/мл біотину, кон'югованого з антилюдським B7-DC клоном MH 18 (Bioscience) з подальшим вживанням HRP-стрептавідину в розведенні 1:1000 (BD Bioscience) і субстрату TMB (BIOFX). Абсорбцію зчитували при довжині хвилі 450 нм із застосуванням планшетного ридера (Molecular Devices) і дані аналізували за допомогою програми SoftMax із застосуванням логічної відповідності по 4 параметрах. Дані показали, людський B7-DC-Ig (дикий тип) зв'язувався з PD-1, але мутанти K113S і D111S не зв'язувалися з PD-1.

При здійсненні методик даного винаходу слід розуміти, що посилання на конкретні буфери, середовища, реагенти, клітини, умови культивування й тому подібне не є такими, що обмежують, але призначені для включення всіх суміжних матеріалів, які фахівець у даній галузі техніки визначить як такі, що становлять інтерес або цінність у конкретному контексті, в якому представлено дане обговорення. Наприклад, часто можливо замінити одну буферну систему або культуральне середовище на іншу(е) й досягти схожих, якщо не ідеальних, результатів. Фахівцям у даній галузі техніки відомі вказані системи й методики, щоб без невиправданих експериментів виробити вказані заміни, які щонайкраще служитимуть їх цілям у використанні способів і методик, розкритих в описі.

Винахід описаний детальніше в наступних необмежуваних прикладах. Слід розуміти, що вказані способи й приклади жодним чином не обмежують винахід у варіантах здійснення, описаних тут, і що інші варіанти здійснення і застосування без сумніву можуть бути запропоновані фахівцями в даній галузі техніки.

Приклади

Приклад 1

B7-DC-Ig зв'язується з клітинами CHO, експресуючими PD01

Спочатку кон'югували B7-DC-Ig з алофікоціаніном (APC) і потім інкубували в різних концентраціях з клітинами лінії CHO, конститутивно експресуючими PD-1, або з батьківськими клітинами CHO, які не експресують PD-1. Зв'язування аналізували за допомогою проточної цитометрії. На фігурі 1 представлено середнє значення інтенсивності флуоресценції (MFI) B7-DC-Ig-APC у вигляді функції від концентрації зонда (вісь x).

B7-DC-Ig-APC зв'язується з клітинами CHO.PD-1 (темне коло), але не з нетрансфікованими клітинами CHO (сірий трикутник).

Приклад 2

B7-DC-Ig конкурує з B7-H1 за зв'язування з PD-1

Спочатку кон'югували B7-H1-Ig з алофікоціаніном (APC). Немічений B7-DC-Ig у різних концентраціях спочатку інкубували з клітинами лінії CHO, конститутивно експресуючими PD-1, перед додаванням B7-H1-Ig-APC до зонда й клітинної суміші. На фігурі 2 середнє значення інтенсивності флуоресценції (MFI) B7-H1-Fc-APC показане у вигляді функції від концентрації доданого конкурента неміченого B7-DC-Ig (вісь x). У міру того, як зростає концентрація неміченого B7-DC-Ig, кількість B7-H1-Ig-APC, що зв'язався з клітинами CHO, зменшується, що показує, що B7-DC-Ig конкурує з B7-H1 за зв'язування з PD-1.

Приклад 3

Модель пухлинних клітин CT26

Клітинну лінію колоректальної пухлини мишей, CT26, отримували з ATCC. Матковий банк клітин у пасажі 4 створювали відповідно до керівництва ATCC. Клітини тестували й підтверджували відсутність мікоплазми та іншого патогенного зараження. Один флакон з пухлинними клітинами розморожували із криоконсервованого стоку й вирощували впродовж двох пасажів перед інокуляцією.

Клітини CT26 відокремлювали в 1:5 розведенні 30 мл повного середовища (RPMI + 10 % FBS, 2mM L-Glu і 1 (P/S) для 2-денної культури або в 1:10 розведенні 30 мл повного середовища для 3-денної культури. Клітини CT26 збирали шляхом аспірування середовища, промивали флакон 5 мл PBS, додавали 5 мл трипсину, інкубували при 37°C протягом 2 хвил, і потім нейтралізували 10 мл повного середовища. Після центрифугування при 600×g (~1000 об/хвил) протягом 5 хвил, середовище відсмоктували й клітинний осад ресуспендували піпетуванням з 10 мл звичайного середовища RPMI. Вказану стадію відмивання повторювали тричі.

Кількість клітин і життєздатність інокульованих клітин визначали за допомогою забарвлення трипановим синім у відповідному розведенні (наприклад, розведення 1:5, 10 мкл клітин + 40 мкл трипановий синій) і підтверджували за допомогою клітинного лічильника NOVA під час останньої стадії промивання. Життєздатність клітин для інокулювання, як правило, складала більше 95 %.

Для початкової інокуляції клітини CT26 розводили до концентрації 6,7105 клітин/мл звичайним середовищем RPMI і зберігали на льоду. Зазвичай кожну мишу інокулювали 150 мкл (1105 клітин). На 9-й день, всіх мишей, що несуть пухлину, спочатку поміщали в одну клітину й розподіляли випадковим чином по експериментальних групах. Розчин CTX відновлювали 1PBS до концентрації 4 мг/мл. Мишам вводили внутрішньочеревно (IP) 0,5 мл розчину CTX, що давало в результаті 2 мг для миші вагою 20 г, тобто 100 мг/кг.

На 10-й день мишам вводили IP 0,5 мл B7-DC-Ig (0,2 мг/мл) що давало в результаті 0,1мг для миші вагою 20 г, тобто 5 мг/кг. Аналогічні дози вводили 2 рази на тиждень протягом 4 тижнів, загалом 8 доз. Пухлинне зростання контролювали шляхом вимірювання пухлини двічі на тиждень, починаючи з дня введення B7-DC-Ig, за допомогою штангенциркуля з цифровою індикацією. Об'єм пухлини розраховували таким чином:

$$\text{Об'єм пухлини} = \pi(D_{\text{short}})^2 \times (D_{\text{long}}) / 6 = \sim 0,52 \times (D_{\text{short}})^2 \times (D_{\text{long}})$$

Мишей убивали й припиняли дослідження, якщо об'єм пухлини досягав 2000 мм³ або якщо в місці інокуляції пухлини спостерігали шкірні виразки й інфекції.

Приклад 4

Комбінація циклофосфаміду й B7-DC-Ig може знищувати прищеплені пухлини

Мишам породи Balb/C у віці 9-11 тижнів імплантували підшкірно $1,0 \times 10^5$ клітин колоректальної пухлини CT26, як описано вищим. На 10-й день після імплантації пухлини миші отримували 100 мг/кг циклофосфаміду. Лікування B7-DC-Ig починали на 1 день пізніше, на 11-й день. Мишей лікували 100 мкг B7-DC-Ig, 2 дози на тиждень, протягом 4 тижнів і всього 8 доз. У 75 % мишей, які отримували схему лікування CTX+B7-DC-Ig, прищеплені пухлини були знищені до 44 дня, тоді як усі миші в контрольній групі, що отримували лише CTX, загинули в результаті пухлинного зростання або були піддані евтаназії, оскільки пухлини перевищували розміри, затверджені IACUC (результати представлені на фігурі 3). Вказані результати демонструють ефективність схеми лікування на прищеплених пухлинах і не обмежуються профілактикою.

Приклад 5

Комбінація циклофосфаміду й B7-DC-Ig може знищити прищеплені пухлини й захистити проти повторного пухлинного зараження

Мишам з описаного вище експерименту із знищеними прищепленими колоректальними пухлинами CT26, повторно вводили 1×10^5 клітин CT26 на 44-й день і на 70-й день. Відсутність пухлинного зростання при повторному введенні пухлинних клітин дозволяє передбачити, що у мишей розвинувся довготривалий протипухлинний імунітет завдяки комбінованому лікуванню циклофосфамідом і B7-DC-Ig. У всіх мишей контрольної групи, що отримували носій, розвинулися пухлини (результати представлені на фігурі 4). Результати демонструють ефективність схеми лікування відносно прищеплених пухлин і показують, що комбіноване лікування циклофосфамідом і B7-DC-Ig приводило в результаті до відповідей за участю імунної пам'яті на пухлинні антигени.

Приклад 6

Комбінація циклофосфаміду й B7-DC-Ig може створити специфічні для пухлини, цитотоксичні Т-лімфоцити пам'яті

Мишам з описаного вище експерименту із знищеними прищепленими колоректальними пухлинами CT26, повторно вводили $2,5 \times 10^5$ клітин лінії CT26 на 44-й день. Через сім днів виділяли селезінки мишей. Мишачі спленоцити стимулювали 5 або 50 мкг/мл яєчного альбуміну (OVA) або пептидами AN1 протягом 6 годин у присутності блокатора апарату Голджі (BD BioScience). Ефекторні Т-клітини пам'яті аналізували шляхом визначення CD8+/IFN γ + Т-клітин. Результати на фігурі 5 показують, що миші із знищеними пухлинами CT26 характеризувалися значною кількістю CT26-специфічних Т-ефекторних клітин.

Приклад 7

Дозозалежна дія B7-DC-Ig на видалення пухлин

Мишам породи Balb/C у віці 9-11 тижнів імплантували підшкірно $1,0 \times 10^5$ клітин лінії колоректальної пухлини CT26. На 9-й день після імплантації пухлини мишам вводили однократну дозу циклофосфаміду (100 мг/кг) і на 10-й день починали лікування 30, 100 або 300 мкг B7-DC-Ig, 2 дози на тиждень протягом 4 тижнів, всього 8 доз. На фігурі 6 показано, що при дозі 300 мкг пухлини зникали у 70 % мишей, при дозі 100 мкг пухлини зникали у 40 % мишей, і доза 30 мкг викликала знищення 10 % пухлин.

Приклад 8

Комбінація циклофосфаміду й анти-PD-1 може знищувати прищеплені пухлини

Мишам породи Balb/C у віці 9-11 тижнів вводили підшкірно 1,0105 клітин колоректальної пухлини CT26. На 11-й день після введення пухлинних клітин мишам вводили однократну дозу циклофосфаміду (100 мг/кг) і починали лікування антитілом анти-PD-1 (250 мкг, клон G4, Hirano

F. et al., 2005 Cancer Research), яке вводили 3 рази на тиждень протягом чотирьох тижнів. До 50-го дня після введення пухлинних клітин у 70 % мишей, які отримували лікування за схемою CTX + анти-PD-1, зникли прищеплені пухлини CT26, тоді як всі миші контрольної групи і групи, що отримувала лише анти-PD-1, загинули в результаті зростання пухлини або були піддані евтаназії, оскільки розміри пухлин перевищували розміри, встановлені IACUC. Результати свідчать про ефективність схеми лікування відносно прищеплених пухлин і не обмежуються профілактикою. Результати представлені на фігурі 7.

Приклад 9

Комбінація циклофосфаміду й анти-CTLA4 може ліквідувати прищеплені пухлини

Мишам породи Balb/C у віці 9-11 тижнів вводили підшкірно $1,0 \times 10^5$ клітин колоректальної пухлини CT26. На 11-й день після введення пухлинних клітин миші отримували 100 мг/кг циклофосфаміду. Обробку анти-CTLA4 (антимишачі антитіла CTLA4 з гібридами хом'яка – депозитний номер ATCC UC10-4F10-11) починали на 1 день пізніше, на 12-й день. Миші отримували 100 мкг анти-CTLA4, 2 дози на тиждень, протягом 4 тижнів. 56 % мишей, які отримували лікування за схемою CTX + анти-CTLA4, не мали пухлини на 50-й день після введення пухлинних клітин, тоді як усі миші контрольної групи загинули в результаті зростання пухлини або були піддані евтаназії, оскільки розміри пухлин перевищували розміри, встановлені IACUC. Результати представлені на фігурі 8. Результати свідчать про ефективність схеми лікування відносно прищеплених пухлин і не обмежуються профілактикою.

Приклад 10

Схема лікування комбінацією циклофосфаміду й B7-DC-Ig приводить до зменшення Treg в мікрооточенні пухлини

На фігурі 9 представлені результати експериментів, у яких мишам породи Balb/C у віці 9-11 тижнів імплантували 1×10^5 клітин лінії CT26 підшкірно. На 9-й день мишам вводили 100 мг/кг CTX, IP. Через 24 години, на 10-й день, миші отримували 100 мкг B7-DC-Ig. Виділяли 5 груп: інтактні миші, яким не вводили пухлинні клітини, група, якій вводили носій, група CTX, група CTX+B7-DC-Ig і група, що отримувала лише B7-DC-Ig. Дві інтактні миші й 4 миші з інших груп були виведені з дослідження на 11-й день (2 дні після CTX) і на 16-й день (7 днів після CTX) для Т-клітинного аналізу. На лівій панелі показано, що на 11-й день, 2 дні після ін'єкції CTX, кількість Treg у селезінці мишей, отримуючих CTX, була значно нижчою за таку у мишей з імплантованими пухлинами, що отримували ін'єкції носія. На правій панелі показано, що на 16-й день, 7 днів після введення CTX і 6 днів після введення B7-DC-Ig, B7-DC-Ig значно зменшував кількість CD4+ Т-клітин, експресуючих високу кількість PD-1. Указаний факт спостерігали як у мишей, отримуючих B7-DC-Ig, так і у мишей, отримуючих CTX+B7-DC-Ig. Передбачалося, що миші з імплантованими пухлинними клітинами повинні мати більшу кількість PD-1+/CD4+ Т-клітин у дренажному LN в порівнянні з інтактними мишами.

Приклад 11

Комбінація циклофосфаміду й B7-DC-Ig може підвищити виживаність мишей у моделі метастатичного раку передміхурової залози

Мишам породи B10.D2 у віці 9-11 тижнів вводили внутрішньовенно $3,0 \times 10^5$ клітин SP-1, які були виділені з легневих метастазів після ін'єкції батьківських клітин TRAMP. Миші групи CTX отримували 3 дози CTX, 50 мг/кг, на 5-й, 12-й і 19-й день. Миші, оброблені B7-DC-Ig, отримували 3 дози B7-DC-Ig, 5 мг/кг, на 6-й, 13-й і 20-й день. До 100 дня серед мишей контрольних груп, інтактних мишей, мишей, що отримували лише CTX, лише B7-DC-Ig, вижили 17 %, тоді як серед мишей, що отримували комбінацію CTX і B7-DC-Ig, вижили 43 %. Результати представлені на фігурі 10.

Приклад 12

Комбінація протиракової вакцини на основі лістерії й B7-DC-Ig може збільшити виживаність мишей після імплантації клітин лінії CT26 в печінку

Мишам породи Balb/C у віці 11-13 тижнів імплантували клітини CT26 за допомогою ін'єкції в частину селезінки з її подальшим видаленням (hemispleen injection technique) (Yoshimura K et al., 2007, Cancer Research). На 10-й день миші отримували 1 ін'єкцію CTX в дозі 50 мг/кг, IP.

Через 24 год., на 11-й день, мишам вводили рекомбінантний пептид лістерії, що несе АН1, імунодомінантний епітоп CT26, у дозі 0,1 LD₅₀ (1×10^7 КОЕ), потім вводили на 14-й і на 17-й день. Мишам також вводили B7-DC-Ig на 11-й день і потім на 18-й день. На фігурі 11 показано, що всі інтактні миші або миші, отримуючі CTX і протиракову вакцину, на основі лістерії загинули до 45-го дня. Серед мишей, що отримували потрібну комбінацію CTX + протиракова вакцина на основі лістерії і B7-DC-Ig, вижили 60 % тварин.

Джерела інформації:

1. Brode S, Cooke A. Immune-potentiating effects of the chemotherapeutic drug cyclophosphamide. *Crit Rev.Immunol.* 2008;28(2):109-26
2. van der Most RG, Currie AJ, Mahendran S, Prosser A, Darabi A, Robinson BW, Nowak AK, Lake RA. Tumor eradication after cyclophosphamide depends on concurrent depletion of regulatory T cells: a role for cycling TNFR2-expressing effector-suppressor T cells in limiting effective chemotherapy. *Cancer Immunol.Immunother.* 2009 Aug;58(8):1219-28
3. Taieb J, Chaput N, Scharzt N, Roux S, Novault S, Menard C, Ghiringhelli F, Terme M, Carpentier AF, Darrasse-Jeze G, et al. Chemoimmunotherapy of tumors: cyclophosphamide synergizes with exosome based vaccines. *J.Immunol.* 2006 Mar 1;176(5):2722-9
4. Machiels JP, Reilly RT, Emens LA, Ercolini AM, Lei RY, Weintraub D, Okoye FI, Jaffee EM. Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice. *Cancer Res.* 2001 May 1;61(9):3689-97
5. Bass KK, Mastrangelo MJ. Immunopotential with low-dose cyclophosphamide in the active specific immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol.Immunother.* 1998 Sep;47(1):1-12
6. Hengst JC, Mokyr MB, Dray S. Cooperation between cyclophosphamide tumoricidal activity and host antitumor immunity in the cure of mice bearing large MOPC-315 tumors. *Cancer Res.* 1981 Jun;41(6):2163-7
7. Hengst JC, Mokyr MB, Dray S. Importance of timing in cyclophosphamide therapy of MOPC-315 tumor-bearing mice. *Cancer Res.* 1980 Jul;40(7):2135-41
8. Tsung K, Meko JB, Tsung YL, Peplinski GR, Norton JA. Immune response against large tumors eradicated by treatment with cyclophosphamide and IL-12. *J.Immunol.* 1998 Feb 1;160(3):1369-77
9. Honeychurch J, Glennie MJ, Illidge TM. Cyclophosphamide inhibition of anti-CD40 monoclonal antibody-based therapy of B cell lymphoma is dependent on CD11b+ cells. *Cancer Res.* 2005 Aug 15;65(16):7493-501
10. Wada S, Yoshimura K, Hipkiss EL, Harris TJ, Yen HR, Goldberg MV, Grosso JF, Getnet D, Demarzo AM, Netto GJ, Anders R, Pardoll DM, Drake CG. Cyclophosphamide augments antitumor immunity: studies in an autochthonous prostate cancer model. *Cancer Res.* 2009 May 15;69(10):4309-18.
11. Freeman,G.J. Structures of PD-1 with its ligands: sideways and dancing cheek to cheek. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 10275-10276 (2008).
12. Brode,S. & Cooke,A. Immune-potentiating effects of the chemotherapeutic drug cyclophosphamide. *Crit Rev. Immunol.* 28, 109-126 (2008).

13. van der Most,R.G. et al. Tumor eradication after cyclophosphamide depends on concurrent depletion of regulatory T cells: a role for cycling TNFR2-expressing effector-suppressor T cells in limiting effective chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 1219-1228 (2009).
14. Taieb,J. et al. Chemoimmunotherapy of tumors: cyclophosphamide synergizes with exosome based vaccines. *J. Immunol.* 176, 2722-2729 (2006).
15. Bass,K.K. & Mastrangelo,M.J. Immunopotential with low-dose cyclophosphamide in the active specific immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 47, 1-12 (1998).
16. Machiels,J.P. et al. Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice. *Cancer Res.* 61, 3689-3697 (2001).
17. Hengst,J.C., Mokyr,M.B., & Dray,S. Cooperation between cyclophosphamide tumoricidal activity and host antitumor immunity in the cure of mice bearing large MOPC-315 tumors. *Cancer Res.* 41, 2163-2167 (1981).
18. Hengst,J.C., Mokyr,M.B., & Dray,S. Importance of timing in cyclophosphamide therapy of MOPC-315 tumor-bearing mice. *Cancer Res.* 40, 2135-2141 (1980).
19. Tsung,K., Meko,J.B., Tsung,Y.L., Peplinski,G.R., & Norton,J.A. Immune response against large tumors eradicated by treatment with cyclophosphamide and IL-12. *J. Immunol.* 160, 1369-1377 (1998).
20. Honeychurch,J., Glennie,M.J., & Illidge,T.M. Cyclophosphamide inhibition of anti-CD40 monoclonal antibody-based therapy of B cell lymphoma is dependent on CD11b+ cells. *Cancer Res.* 65, 7493-7501 (2005).
21. Wada S, Yoshimura K, Hipkiss EL, Harris TJ, Yen HR, Goldberg MV, Grosso JF, Getnet D, Demarzo AM, Netto GJ, Anders R, Pardoll DM, Drake CG. Cyclophosphamide augments antitumor immunity: studies in an autochthonous prostate cancer model. *Cancer Res.* 2009 May 15;69(10):4309-18.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ЛАНГЕРМАН Соломон

<120> КОМПОЗИЦІЇ АНТАГОНІСТІВ PD-1 ТА СПОСОБИ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> 21682-7

<140>

<141>

<150> 61/211,697

<151> 2009-04-02

<150> 61/091,692

<151> 2008-08-25

<150> 61/091,709

<151> 2008-08-25

<150> 61/091,705

<151> 2008-08-25

<160> 20

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 273

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln
1 5 10 15

Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile
20 25 30

Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser
35 40 45

His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn
50 55 60

Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu
65 70 75 80

Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp
85 90 95

Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr
100 105 110

Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr
115 120 125

His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln
130 135 140

Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val
145 150 155 160

Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val
165 170 175

Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys
180 185 190

Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp
195 200 205

Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His
210 215 220

Ile Phe Ile Pro Phe Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val
225 230 235 240

Ile Ala Leu Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp
245 250 255

Thr Thr Lys Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala
260 265 270

Ile

<210> 2
<211> 254
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly
1 5 10 15

Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn
20 25 30

Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
35 40 45

Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly
50 55 60

Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln

65 70 75 80

Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu
85 90 95

Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu
100 105 110

Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly
115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
130 135 140

Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
145 150 155 160

Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp
165 170 175

Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser
180 185 190

Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His Ile Phe Ile
195 200 205

Pro Phe Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val Ile Ala Leu
210 215 220

Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp Thr Thr Lys
225 230 235 240

Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala Ile
245 250

<210> 3
<211> 202
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly
1 5 10 15

Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn
20 25 30

Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
35 40 45

Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly
50 55 60

Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln
65 70 75 80

Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu
85 90 95

Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu
100 105 110

Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly
115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
130 135 140

Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
145 150 155 160

Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp
165 170 175

Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser
180 185 190

Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp
195 200

<210> 4
<211> 202
<212> PRT
<213> murine

<400> 4

Leu Phe Thr Val Thr Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val Asp Val Gly
1 5 10 15

Ser Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu Cys Thr Glu
20 25 30

Leu Glu Gly Ile Arg Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
35 40 45

Leu Gln Ser Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly
50 55 60

Lys Ala Leu Phe His Ile Pro Ser Val Gln Val Arg Asp Ser Gly Gln

65					70					75					80				
Tyr	Arg	Cys	Leu	Val	Ile	Cys	Gly	Ala	Ala	Trp	Asp	Tyr	Lys	Tyr	Leu				
				85					90					95					
Thr	Val	Lys	Val	Lys	Ala	Ser	Tyr	Met	Arg	Ile	Asp	Thr	Arg	Ile	Leu				
			100					105					110						
Glu	Val	Pro	Gly	Thr	Gly	Glu	Val	Gln	Leu	Thr	Cys	Gln	Ala	Arg	Gly				
		115					120					125							
Tyr	Pro	Leu	Ala	Glu	Val	Ser	Trp	Gln	Asn	Val	Ser	Val	Pro	Ala	Asn				
	130					135					140								
Thr	Ser	His	Ile	Arg	Thr	Pro	Glu	Gly	Leu	Tyr	Gln	Val	Thr	Ser	Val				
145					150					155					160				
Leu	Arg	Leu	Lys	Pro	Gln	Pro	Ser	Arg	Asn	Phe	Ser	Cys	Met	Phe	Trp				
				165					170					175					
Asn	Ala	His	Met	Lys	Glu	Leu	Thr	Ser	Ala	Ile	Ile	Asp	Pro	Leu	Ser				
			180					185					190						
Arg	Met	Glu	Pro	Lys	Val	Pro	Arg	Thr	Trp										
		195					200												

```
<210> 5
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 5

Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln
1 5 10 15

Ile Ala Ala

```
<210> 6
<211> 232
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 6

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 7
<211> 233
<212> PRT
<213> мишачий

<400> 7

Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro
1 5 10 15

Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys

20	25	30
Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val 35 40 45		
Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe 50 55 60		
Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu 65 70 75 80		
Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His 85 90 95		
Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys 100 105 110		
Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser 115 120 125		
Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met 130 135 140		
Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro 145 150 155 160		
Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn 165 170 175		
Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met 180 185 190		
Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser 195 200 205		
Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr 210 215 220		
Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys 225 230		

<210> 8
 <211> 1365
 <212> ДНК
 <213> штучний

<220>
 <223> Мишачий B7-DC-Ig

<400> 8

```

atgtctgtcc tgctgccgat actgaacctg agcttacaac ttcattcctgt agcagcttta 60
ttcaccgtga cagcccctaa agaagtgtac accgtagacg tcggcagcag tgtgagcctg 120
gagtgcgatt ttgaccgcag agaatgcact gaactggaag ggataagagc cagtttgtag 180
aaggtagaaa atgatacgtc tctgcaaagt gaaagagcca ccctgctgga ggagcagctg 240
cccctgggaa aggcctttgtt ccacatccct agtgtccaag tgagagattc cgggcagtac 300
cgttgctctg tcattctcgg ggccgcctgg gactacaagt acctgacggt gaaagtcaaa 360
gcttcttaca tgaggataga cactaggatc ctggaggttc caggtacagg ggaggtgcag 420
cttacctgcc aggctagagg ttatccccta gcagaagtgt cctggcaaaa tgtcagtgtt 480
cctgccaaca ccagccacat caggaccccc gaaggcctct accaggtcac cagtgttctg 540
cgctcaagc ctcagcctag cagaaacttc agctgcatgt tctggaatgc tcacatgaag 600
gagctgactt cagccatcat tgaccctctg agtcggatgg aacccaaagt cccagaacg 660
tgggagccaa gaggtcctac gatcaagccc tgccgcctt gtaaagccc agctccaaat 720
ttgctgggtg gaccgtcagt ctttatcttc ccgcaaaga taaaggacgt cttgatgatt 780
agtctgagcc ccactcgtac atgcgttggt gtggatgttt cagaggatga cccgcagctg 840
caaatcagtt gggtcgttaa caacgtggag gtgcataccg ctcaaaccga gaccacaga 900
gaggattata acagaccctt ggggtagtg tccgcctgc cgatccagca tcaggattgg 960
atgagcggga aagagttcaa gtgtaaggta aacaacaaag atctgccagc gccgattgaa 1020
cgaaccatta gcaagccgaa agggagcgtg cgcgcacctc aggtttacgt ccttcctcca 1080
ccagaagagg agatgacgaa aaagcagggt accctgacat gcatggtaac tgactttatg 1140
ccagaagata ttacgtgga atggactaat aacgaaaga cagagctcaa ttacaagaac 1200
actgagcctg ttctggattc tgatggcagc tactttatgt actccaaatt gagggctcag 1260
aagaagaatt gggctgagag aaacagttat agttgctcag tggatcatga gggcctccat 1320
aatcatcaca ccacaaagtc cttcagccga acgcccggga aatga 1365

```

<210> 9
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> штучний

<220>
 <223> Мишачий B7-DC-Ig

<400> 9

Met Leu Leu Leu Leu Pro Ile Leu Asn Leu Ser Leu Gln Leu His Pro
 1 5 10 15

Val Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val
 20 25 30

Asp Val Gly Ser Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu
 35 40 45
 Cys Thr Glu Leu Glu Gly Ile Arg Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn
 50 55 60
 Asp Thr Ser Leu Gln Ser Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu
 65 70 75 80
 Pro Leu Gly Lys Ala Leu Phe His Ile Pro Ser Val Gln Val Arg Asp
 85 90 95
 Ser Gly Gln Tyr Arg Cys Leu Val Ile Cys Gly Ala Ala Trp Asp Tyr
 100 105 110
 Lys Tyr Leu Thr Val Lys Val Lys Ala Ser Tyr Met Arg Ile Asp Thr
 115 120 125
 Arg Ile Leu Glu Val Pro Gly Thr Gly Glu Val Gln Leu Thr Cys Gln
 130 135 140
 Ala Arg Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Gln Asn Val Ser Val
 145 150 155 160
 Pro Ala Asn Thr Ser His Ile Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val
 165 170 175
 Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Gln Pro Ser Arg Asn Phe Ser Cys
 180 185 190
 Met Phe Trp Asn Ala His Met Lys Glu Leu Thr Ser Ala Ile Ile Asp
 195 200 205
 Pro Leu Ser Arg Met Glu Pro Lys Val Pro Arg Thr Trp Glu Pro Arg
 210 215 220
 Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp
 245 250 255
 Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn
 275 280 285

Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn
290 295 300

Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp
305 310 315 320

Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro
325 330 335

Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys
355 360 365

Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile
370 375 380

Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn
385 390 395 400

Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys
420 425 430

Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe
435 440 445

Ser Arg Thr Pro Gly Lys
450

<210> 10
<211> 435
<212> PRT
<213> штучний

<220>
<223> Мишачий гібридний білок B7-DC-Ig без сигнальної
послідовності

<400> 10

Leu Phe Thr Val Thr Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val Asp Val Gly
1 5 10 15

Ser Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu Cys Thr Glu
20 25 30

Leu Glu Gly Ile Arg Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser

35	40	45
Leu Gln Ser Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly		
50	55	60
Lys Ala Leu Phe His Ile Pro Ser Val Gln Val Arg Asp Ser Gly Gln		
65	70	80
Tyr Arg Cys Leu Val Ile Cys Gly Ala Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu		
	85	90
Thr Val Lys Val Lys Ala Ser Tyr Met Arg Ile Asp Thr Arg Ile Leu		
	100	105
Glu Val Pro Gly Thr Gly Glu Val Gln Leu Thr Cys Gln Ala Arg Gly		
	115	120
Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Gln Asn Val Ser Val Pro Ala Asn		
	130	135
Thr Ser His Ile Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val		
	145	150
Leu Arg Leu Lys Pro Gln Pro Ser Arg Asn Phe Ser Cys Met Phe Trp		
	165	170
Asn Ala His Met Lys Glu Leu Thr Ser Ala Ile Ile Asp Pro Leu Ser		
	180	185
Arg Met Glu Pro Lys Val Pro Arg Thr Trp Glu Pro Arg Gly Pro Thr		
	195	200
Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly		
	210	215
Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met		
	225	230
Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu		
	245	250
Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val		
	260	265
His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu		
	275	280
Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly		

290 295 300

Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile
305 310 315 320

Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val
325 330 335

Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr
340 345 350

Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu
355 360 365

Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro
370 375 380

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val
385 390 395 400

Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val
405 410 415

His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr
420 425 430

Pro Gly Lys
435

<210> 11
<211> 1362
<212> ДНК
<213> штучний

<220>
<223> Людський В7-DC-Ig

<400> 11
atgatctttc ttctcttgat gctgtctttg gaattgcaac ttcaccaaat cgcggccctc 60
tttactgtga ccgtgccaaa agaactgtat atcattgagc acgggtccaa tgtgaccctc 120
gaatgtaact ttgacaccgg cagccacgtt aacctggggg ccatcactgc cagcttgcaa 180
aaagttgaaa acgacacttc acctcaccgg gagagggcaa ccctcttgga ggagcaactg 240
ccattgggga aggcctcctt tcatatccct caggtgcagg ttcgggatga gggacagtac 300
cagtgcatTA ttatctacgg cgtggcttgg gattacaagt atctgaccct gaaggtgaaa 360
gcgtcctatc ggaaaattaa cactcacatt cttaaggtgc cagagacgga cgaggtggaa 420
ctgacatgcc aagccaccgg ctaccggtg gcagaggtca gctggcccaa cgtgagcgta 480

```

cctgctaaca cttctcattc taggacaccc gagggcctct accaggttac atccgtgctc 540
cgccctcaaac cgccccagg ccggaatctt agttgctgtt tttggaatac ccacgtgcga 600
gagctgactc ttgcatctat tgatctgcag tcccagatgg agccacggac tcatccaact 660
tggaaccta aatcttgca taaaactcat acctgtccc cttgccagc ccccgagctt 720
ctgggaggtc ccagtgtgtt tctgtttccc ccaaacctc aggacacact tatgatattc 780
cgaacgccgg aagtgcacatg cgtggttgtg gacgtctcac acgaagaccc ggaggtgaaa 840
ttcaactggt acgttgacgg agttgaggtt cataacgcta agaccaagcc cagagaggag 900
caatacaatt ccacctatcg agtggtagt gtactgaccg ttttgacca agactggctg 960
aatgaaaag aatacaagtg caaagtatca aacaaggctt tgctgcacc catcgagaag 1020
acaatttcta aagccaaagg gcagcccagg gaaccgagg tgtaacacact cccaccatcc 1080
cgcgacgagc tgacaaagaa tcaagtatcc ctgacctgcc tgggtgaaagg cttttaccca 1140
tctgacattg ccgtggaatg ggaatcaaat ggacaacctg agaacaacta caaaaccact 1200
ccacctgtgc ttgacagcga cgggtccttt ttcctgtaca gtaagctcac tgtcgataag 1260
tctcgctggc agcagggcaa cgtcttttca tgtagtgtga tgcacgaagc tctgcacaac 1320
cattacaccc agaagtctct gtcactgagc ccaggtaaat ga 1362

```

<210> 12
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Штучний

<220>
 <223> Людський B7-DC-Ig

<400> 12

Met Ile Phe Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln
 1 5 10 15

Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile
 20 25 30

Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser
 35 40 45

His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn
 50 55 60

Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu
 65 70 75 80

Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp
 85 90 95

Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr
 100 105 110
 Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr
 115 120 125
 His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln
 130 135 140
 Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val
 145 150 155 160
 Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val
 165 170 175
 Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys
 180 185 190
 Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp
 195 200 205
 Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 13
<211> 434
<212> PRT
<213> Штучний

<220>
<223> Людський B7-DC-Ig без сигнальної послідовності

<400> 13

Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly
1 5 10 15

Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn
20 25 30

Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
35 40 45

Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly
50 55 60

Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln
65 70 75 80

Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu
85 90 95

Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu
100 105 110

Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly
 115 120 125
 Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
 130 135 140
 Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp
 165 170 175
 Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser
 180 185 190
 Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 195 200 205
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 210 215 220
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 225 230 235 240
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 245 250 255
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 260 265 270
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 275 280 285
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 290 295 300
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 305 310 315 320
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 325 330 335
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 340 345 350
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 355 360 365

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
370 375 380

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
385 390 395 400

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
405 410 415

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
420 425 430

Gly Lys

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Trp Asp Tyr Lys Tyr
1 5

<210> 15
<211> 202
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 15

Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly
1 5 10 15

Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn
20 25 30

Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
35 40 45

Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly
50 55 60

Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln
65 70 75 80

Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu
85 90 95

Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu
100 105 110

Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly
115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
130 135 140

Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
145 150 155 160

Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp
165 170 175

Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser
180 185 190

Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp
195 200

<210> 16
<211> 290
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val

```

130              135              140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145              150              155              160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165              170              175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
180              185              190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
195              200              205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210              215              220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
225              230              235              240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
245              250              255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
260              265              270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
275              280              285

Glu Thr
290

<210> 17
<211> 290
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 17

Met Arg Ile Phe Ala Gly Ile Ile Phe Thr Ala Cys Cys His Leu Leu
1              5              10              15

Arg Ala Phe Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20              25              30

Gly Ser Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu
35              40              45

Asp Leu Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val
50              55              60

```


Ile Gln Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn
65 70 75 80

Phe Arg Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Cys Cys Ile Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp
130 135 140

Pro Ala Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro
145 150 155 160

Glu Ala Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly
165 170 175

Lys Arg Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val
180 185 190

Thr Ser Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys
195 200 205

Thr Phe Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile
210 215 220

Ile Pro Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg Thr His Trp
225 230 235 240

Val Leu Leu Gly Ser Ile Leu Leu Phe Leu Ile Val Val Ser Thr Val
245 250 255

Leu Leu Phe Leu Arg Lys Gln Val Arg Met Leu Asp Val Glu Lys Cys
260 265 270

Gly Val Glu Asp Thr Ser Ser Lys Asn Arg Asn Asp Thr Gln Phe Glu
275 280 285

Glu Thr
290

<210> 18
<211> 290
<212> PRT
<213> Macaca mulatta

<400> 18

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Thr Ile Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45

Gly Leu Thr Ser Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Asn
65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Gln Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Arg Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Leu Asn
180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Ala Asn Glu Ile Phe Tyr
195 200 205

Cys Ile Phe Arg Arg Leu Gly Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala Leu Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Phe Leu Leu Leu Gly Val Ala Leu Thr
245 250 255

Phe Ile Phe Tyr Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Met Lys Lys Ser
260 265 270

Gly Ile Arg Val Thr Asn Ser Lys Lys Gln Arg Asp Thr Gln Leu Glu
275 280 285

Glu Thr
290

<210> 19
<211> 288
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Phe Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys

```

180              185              190
Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195              200              205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210              215              220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225              230              235              240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245              250              255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260              265              270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275              280              285

<210> 20
<211> 288
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 20

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1              5              10              15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Glu Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20              25              30

Asn Ala Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Leu Val Thr Glu Gly Asp
35              40              45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Ala Ser Glu Ser Phe Val
50              55              60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65              70              75              80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
85              90              95

Val Thr Arg Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
100             105             110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115             120             125

```

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

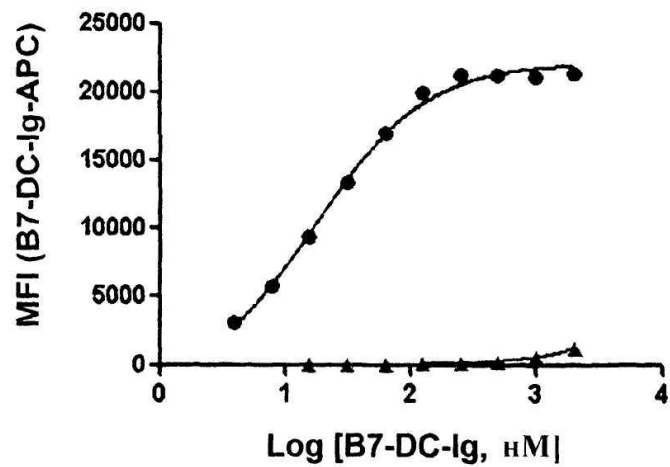
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Терапевтична комбінація, що включає гібридний білок, що включає першу й другу пептидні частини, де зазначена перша пептидна частина включає амінокислотну послідовність, вибрану з: B7-DC дикого типу, амінокислотної послідовності, що має 98 % ідентичності послідовності до амінокислот 20-221 або 20-121 SEQ ID NO: 1, та що конкурує *in vitro* з B7-DC дикого типу для зв'язування з PD-1, фрагмент B7-DC, який конкурує *in vitro* з B7-DC дикого типу для зв'язування з PD-1, та позаклітинний домен B7-DC, та зазначена друга пептидна частина включає частину імуноглобуліну (Ig), та потенціовальний агент, вибраний з групи, що включає циклофосфамід, аналог циклофосфаміду, сунітиніб, анти-TGNF β , іматиніб, антрацикліни, оксаліплатин та доксорубіцин, у фармацевтично прийнятному носії, де комбінація призначена для збільшення Т-клітинної відповіді, причому зазначений потенціовальний агент уводять перед зазначеним гібридним білком та зазначений гібридний білок уводять без зазначеного потенціовального агента.
- 10 2. Комбінація за п. 1, де вказаний потенціовальний агент являє собою циклофосфамід або аналог циклофосфаміду.
3. Комбінація за п. 1, де вказаний потенціовальний агент являє собою сунітиніб (SUTENT®), анти-TGNF β або іматиніб (GLEEVAC®), антрацикліни, оксаліплатин, доксорубіцин, антагоністи TLR4 і антагоністи IL-18.
- 20 4. Комбінація за п. 1, що додатково включає щонайменше один додатковий агент, вибраний з групи, що включає антитіло анти-PD-1, антитіло анти-CTLA4, інгібітор мітозу, інгібітор ароматази, антагоніст A2AR та інгібітор ангіогенезу.
- 25 5. Комбінація за будь-яким з пп. 1-4, де зазначена перша пептидна частина складається з поліпептиду дикого типу B7-DC.
6. Комбінація за будь-яким з пп. 1-4 та п. 5, де зазначений B7-DC являє собою B7-DC людини.

7. Комбінація за будь-яким з пп. 1-4 та пп. 5, 6, де зазначена перша пептидна частина складається з фрагменту B7-DC, що не містить жодної частини трансмембранної ділянки зазначеного поліпептиду B7-DC.
8. Комбінація за будь-яким з пп. 1-4 та пп. 5-7, де зазначена перша пептидна частина включає розчинну частину зазначеного поліпептиду B7-DC, і зазначена друга пептидна частина включає Fc-ділянку антитіла, але не включає жодної варіабельної області зазначеного антитіла.
9. Комбінація за будь-яким з пп. 1-4, де зазначена перша пептидна частина включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3 і зазначена друга поліпептидна частина включає Fc-ділянку антитіла, але не включає жодної варіабельної області зазначеного антитіла.
10. Комбінація за будь-яким з пп. 1-4, де зазначена перша пептидна частина складається з амінокислотної послідовності, що характеризується щонайменше 98 % ідентичністю з амінокислотами 20-221 або 20-121 SEQ ID NO: 1.
11. Комбінація за будь-яким з пп. 1-4, де зазначена перша пептидна частина складається з амінокислотної послідовності амінокислот 20-221 або 20-121 SEQ ID NO: 1.
12. Комбінація за будь-яким з пп. 1-4, де зазначений гібридний білок включає амінокислотну послідовність, що характеризується щонайменше 95 % ідентичністю з послідовністю SEQ ID NO: 9, 10, 12 або 13.
13. Комбінація за будь-яким з пп. 1-4, де зазначений гібридний білок включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9, 10, 12 або 13.
14. Комбінація за будь-яким з пп. 1-4 та 5-13, де зазначеним гібридним білком є мономер.
15. Комбінація за будь-яким з пп. 1-4 та 5-13, де зазначеним гібридним білком є частина димера.
16. Комбінація за п. 15, де зазначеним димером є гомодимер або гетеродимер.
17. Комбінація за будь-яким з пп. 1-4, де зазначений гібридний білок містить першу пептидну частину, що складається з 20-221 SEQ ID NO: 1, та другу пептидну частину, що складається з шарнірної ділянки, ділянок C_H2 і C_H3 C_γ1 імуноглобуліну людини.
18. Комбінація за будь-яким з пп. 1-4 та 5-17, де зазначена друга пептидна частина містить амінокислоти 245-476 людського IgG1.
19. Комбінація за будь-яким з пп. 1-4 та 5-18, яка **відрізняється** тим, що зазначений гібридний білок та потенціювальний агент подані у вигляді окремих лікарських засобів.
20. Комбінація за будь-яким з пп. 1-4 та 5-19, де зазначена перша пептидна частина складається з позаклітинного домену B7-DC або поліпептиду, яка відрізняється тільки консервативними замінами амінокислот.
21. Комбінація за будь-яким з пп. 1-4 та 5-19, що додатково містить фармацевтично прийнятний носій.
22. Комбінація за п. 1, що містить:
фармацевтичну композицію, що містить гібридний білок, який містить першу та другу пептидну частину, де перша пептидна частина складається з амінокислот 20-221 SEQ ID NO: 1, та друга пептидна частина містить амінокислоти 245-476 людського IgG1, та фармацевтично прийнятний носій;
та циклофосфамід.
23. Комбінація за будь-яким з пп. 1-22, де зазначений гібридний білок подано в кількості, достатній для дози від 1 до 40 мг/кг.
24. Комбінація за пп. 2, 22 або 23, де зазначений циклофосфамід подано в кількості від 0,45 мг до близько 4,5 мг.
25. Застосування комбінації за будь-яким з пп. 1-4 та 5-24, для виробництва лікарського засобу для збільшення Т-клітинної відповіді за допомогою комбінованої терапії.
26. Застосування за п. 25, яке **відрізняється** тим, що зазначений гібридний білок та потенціювальний агент вводять у вигляді окремих лікарських засобів у різний час.
27. Застосування за п. 26, яке **відрізняється** тим, що потенціювальний агент вводять за 24 години до введення гібридного білка.
28. Застосування за будь-яким з пп. 25-27, де зазначеним гібридним білком є циклофосфамід або аналог циклофосфаміду.
29. Застосування за будь-яким з пп. 25-27, де зазначеним потенціювальним агентом є агент, що зменшує активність регуляторних Т-лімфоцитів (T-reg).
30. Застосування за будь-яким з пп. 25-27, де зазначений потенціювальний агент вводять щонайменше за Х годин до введення зазначеного гібридного білка, де Х вибраний з 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 24 і 30.
31. Застосування за будь-яким з пп. 25-27, де зазначене застосування додатково включає введення принаймні одного додаткового агента, вибраного з групи, що включає анти-PD-1

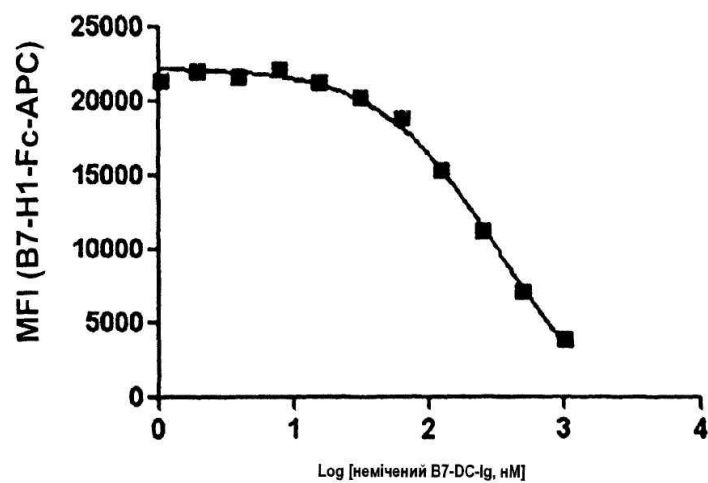
антитіло, анти-CTLA4 антитіло, інгібітор мітозу, інгібітор ароматази, антагоніст A2AR та інгібітор ангиогенезу.

32. Застосування за будь-яким з пп. 25-27, де зазначений гібридний білок та потенціовальний агент наявний у кількості, достатній для лікування захворювання, що піддається лікуванню шляхом збільшення Т-клітинно-опосередкованої імунної відповіді.
33. Застосування за п. 32, де зазначеним захворюванням є інфекційне захворювання.
34. Застосування за п. 32, де зазначеним захворюванням є рак.
35. Застосування за п. 34, де рак являє собою рак сечового міхура, рак мозку, рак молочної залози, рак шийки матки, колоректальний рак, рак стравоходу, рак нирок, рак печінки, рак легенів, назофарингеальний рак, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози, рак шкіри, рак шлунку, рак матки, рак яєчників, рак яєчка або гематологічний рак.
36. Спосіб збільшення Т-клітинної відповіді у ссавця, що включає введення ссавцеві комбінації за будь-яким з пп. 1-4 та 5-24, де зазначений потенціовальний агент вводять перед зазначеним гібридним білком та зазначений гібридний білок вводять без зазначеного потенціовального агента.
37. Спосіб за п. 36, де зазначеним гібридним білком є циклофосфамід або аналог циклофосфаміду.
38. Спосіб за п. 36 або 37, де зазначеним потенціовальним агентом є агент, що зменшує активність регуляторних Т-лімфоцитів (T-reg).
39. Спосіб за будь-яким з пп. 36-38, де зазначений потенціовальний агент вводять щонайменше за Х годин до введення зазначеного гібридного білка, де Х вибраний з 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 24 і 30.
40. Спосіб за будь-яким з пп. 36-38, де зазначений спосіб додатково включає введення принаймні одного додаткового агента, вибраного з групи, що включає анти-PD-1 антитіло, анти-CTLA4 антитіло, інгібітор мітозу, інгібітор ароматази, антагоніст A2AR та інгібітор ангиогенезу.
41. Спосіб за будь-яким з пп. 36-40, де зазначений гібридний білок та потенціовальний агент наявний у кількості, достатній для лікування захворювання, що піддається лікуванню шляхом збільшення Т-клітинно-опосередкованої імунної відповіді.
42. Спосіб за п. 41, де зазначеним захворюванням є інфекційне захворювання.
43. Спосіб за п. 41, де зазначеним захворюванням є рак.
44. Спосіб за п. 43, де рак являє собою рак сечового міхура, рак мозку, рак молочної залози, рак шийки матки, колоректальний рак, рак стравоходу, рак нирок, рак печінки, рак легенів, назофарингеальний рак, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози, рак шкіри, рак шлунку, рак матки, рак яєчників, рак яєчка або гематологічний рак.
45. Медичний набір для введення комбінації за пп. 1-4 або 5-24, де зазначений набір включає:
 - (a) запас доз зазначеного гібридного білка;
 - (b) запас потенціовального агента, вибраного з групи, яка включає: циклофосфамід, аналог циклофосфаміду, сунітиніб, анти-TGNF β , іматиніб, антрацикліни, оксаліплатин та доксорубіцин;
 - (c) запас фармацевтично прийнятного носія; та
 - (d) віддруковані інструкції з введення комбінації при застосуванні або способі відповідно до пп. 25-44,де зазначений гібридний білок та зазначений потенціовальний агент застосовують у кількості, достатній для збільшення Т-клітинної відповіді у ссавця.



Зв'язування B7-DC-Ig з клітинами CHO, що експресують PD01

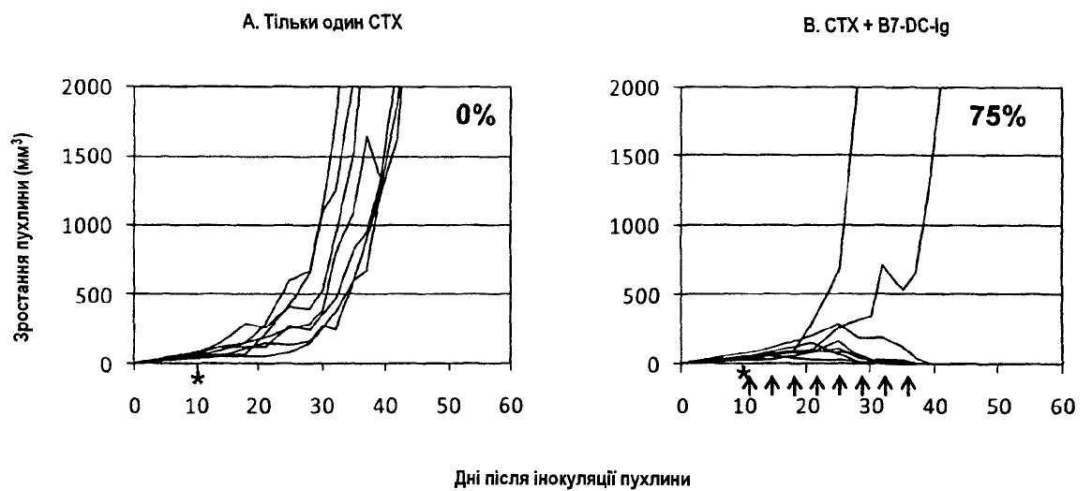
ФІГ. 1



B7-DC-Ig конкурує з B7-H1 за зв'язування з PD-1

ФІГ. 2

CTX в поєднанні з B7-DC-Ig



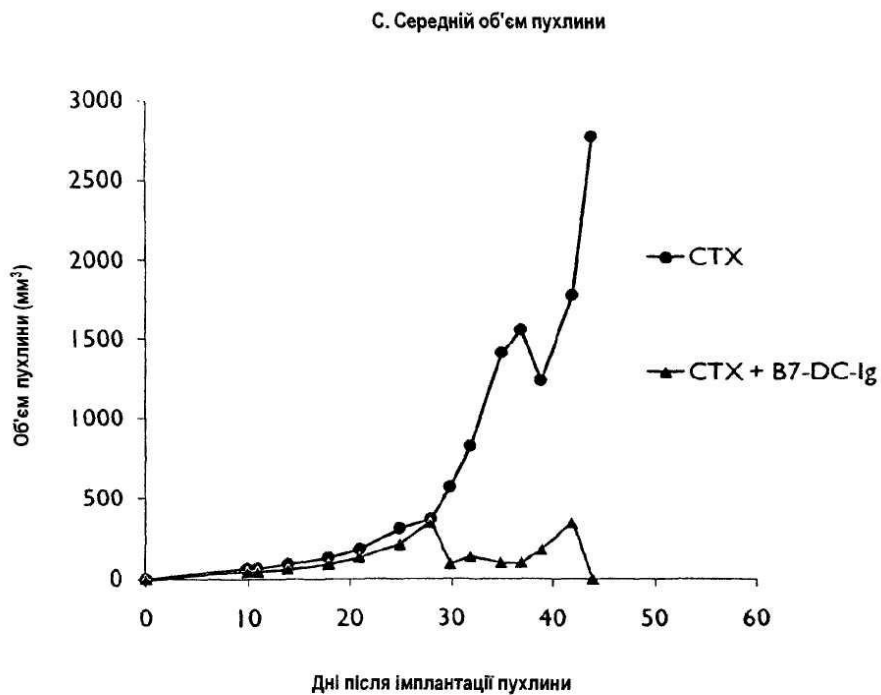
* CTX, 100 мг/кг на 10-й день

↑ B7-DC-Ig, 5 мг/кг, 11-й день, 2х/тиждень

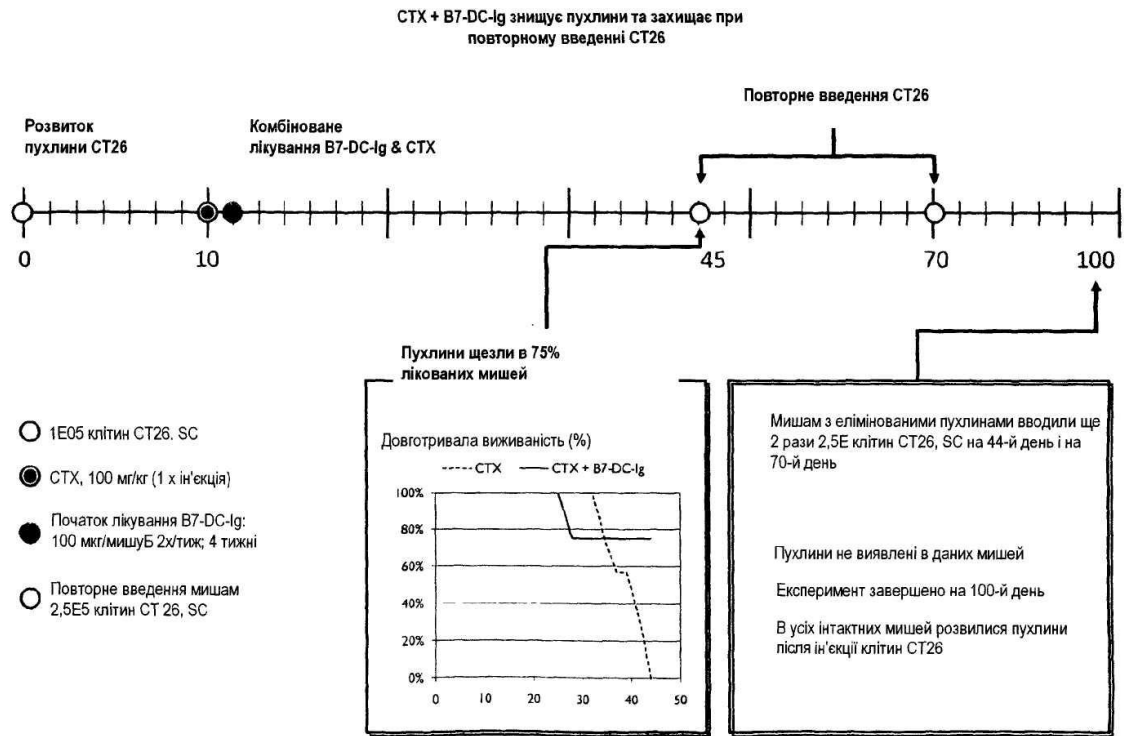
N=8

ФІГ. 3-1

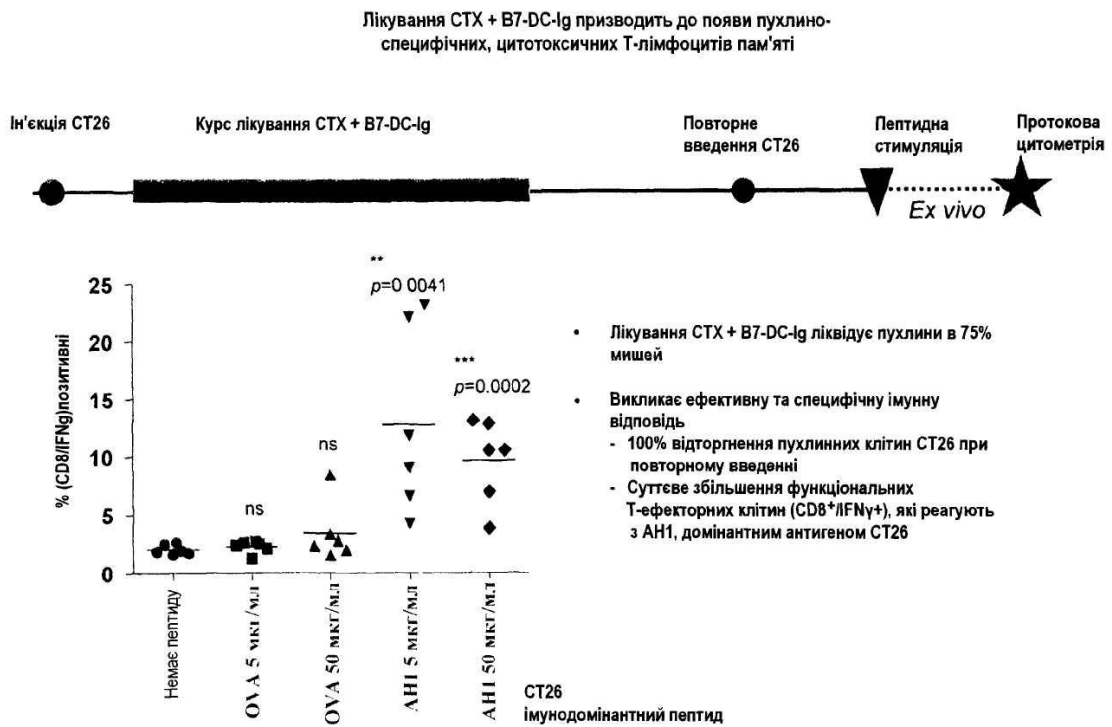
CTX в поєднанні з B7-DC-Ig



ФІГ. 3-2

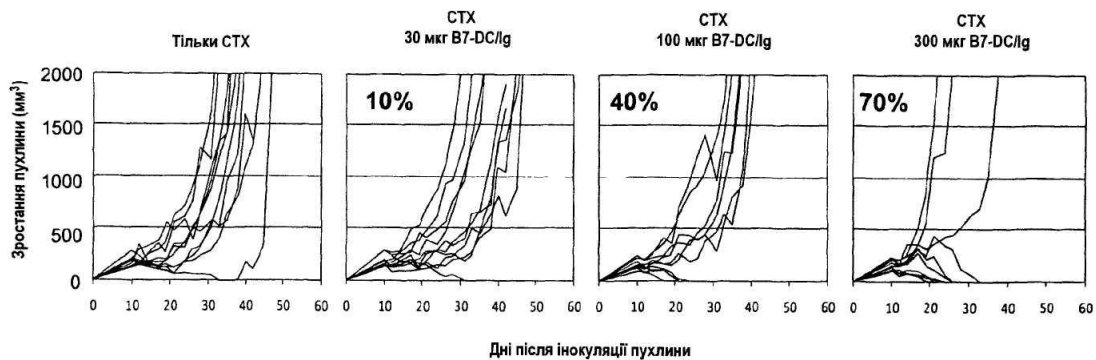


ФІГ. 4



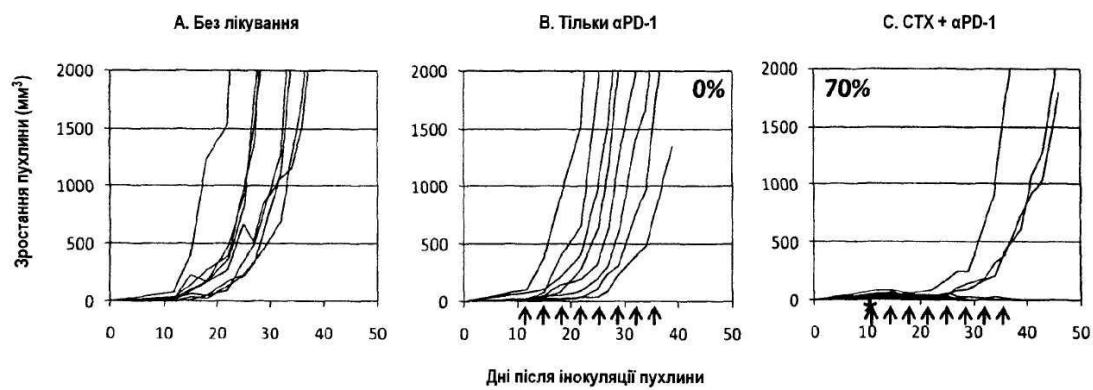
ФІГ. 5

Кореляція дози B7-DC/Ig та видалення пухлин: модель СТ26



ФІГ. 6

СТХ у комбінації з анти-PD-1



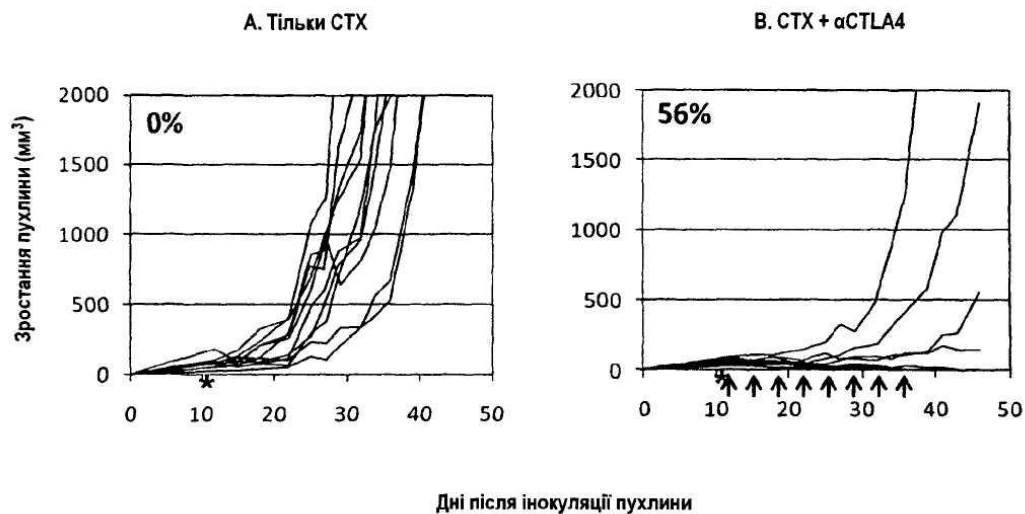
★ СТХ, 100 мг/кг на 11-й день

↑ αPD-1, 12,5 мг/кг, 12-й день, 2х/тиж.

N= 9 - 10

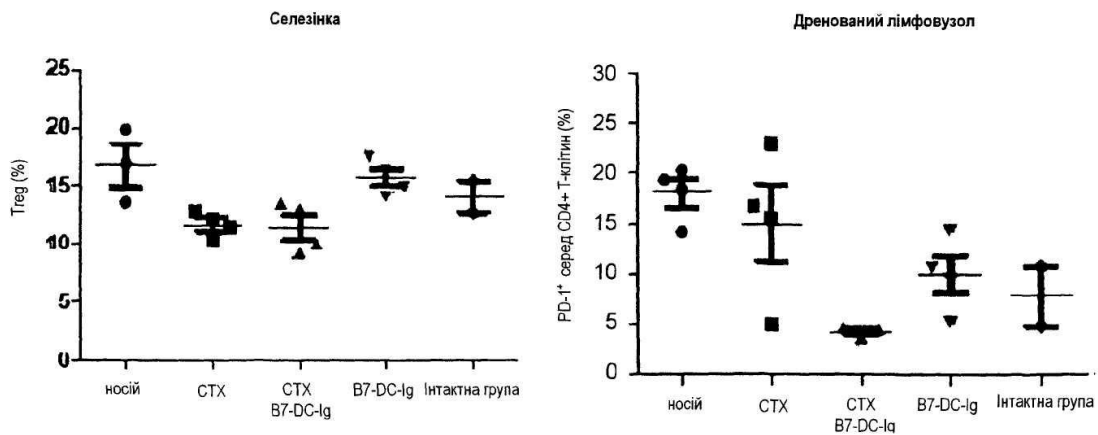
ФІГ. 7

CTX у комбінації з анти-CTLA4



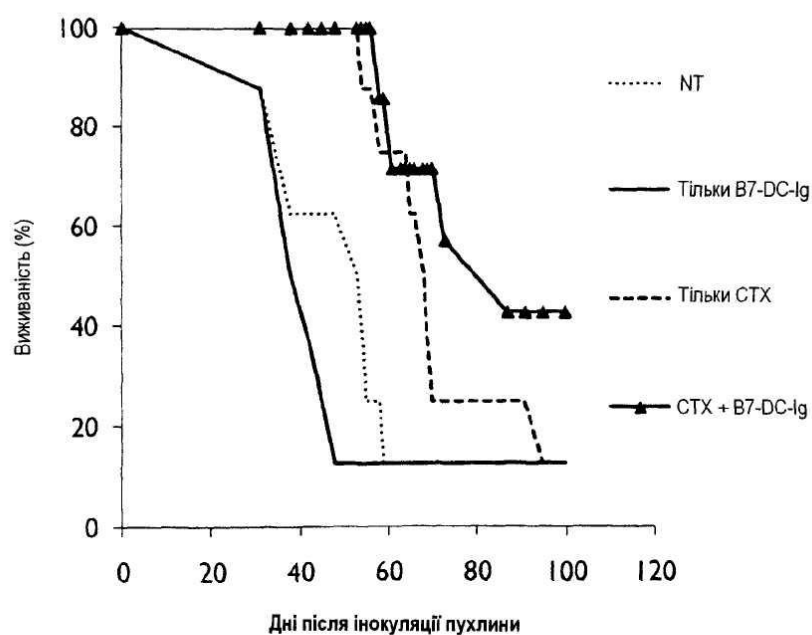
* CTX. 100 мг/кі на 11-й день
 ↑ α CTLA-4.5мкг/кг, 12-й день, 2х/тиж
N= 9 - 10

ФІГ. 8



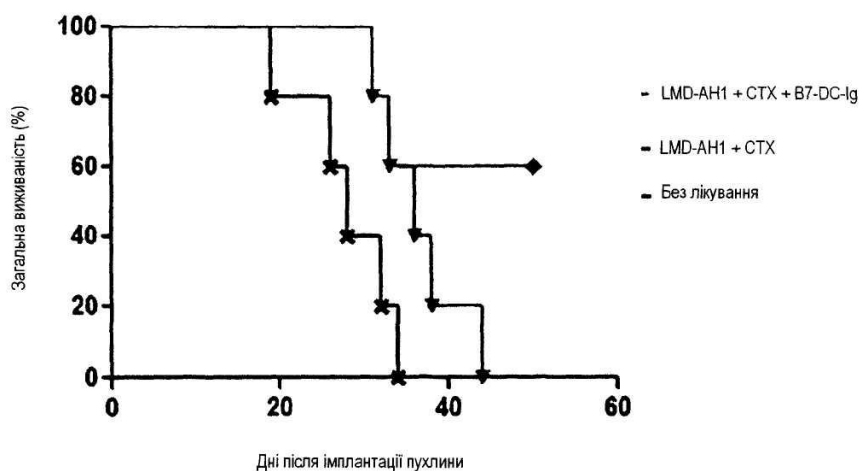
Включення CTX у схему лікування B7-DC-Ig приводить до зменшення Treg у селезінці через 2 дні. B7-DC-Ig суттєво знижує кількість PD-1^{high} / CD4⁺ Т-клітин у дренажному лімфовузлі

ФІГ. 9



Синергізм B7-DC-Ig та CTX у моделі метастатичного раку легень

ФІГ. 10



Синергізм B7-DC-Ig, CTX та вакцини на основі лістерії в моделі метастатичного раку печінки

ФІГ. 11

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601