



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118453** (13) **C2**
(51) МПК (2018.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2016 02684	(72) Винахідник(и):	Гу Даньлін (US), Біб Емі М. (US)
(22) Дата подання заявки:	18.08.2014	(73) Власник(и):	МЕРК ШАРП ЕНД ДОУМ КОРП., 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.01.2019	(74) Представник:	Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/867,976	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	Combined PD-1 blockade and GITR triggering induce a potent antitumor immunity in murine cancer models and synergizes with chemotherapeutic drugs / Lei Lu, Xiaobing Xu, Bin Zhang et al. // Journal of translational medicine. – 2014. – Vol. 12 (1). – P. 36 WO 2011028683 A1, 10.03.2011 Clinical development of immunostimulatory monoclonal antibodies and opportunities for combination / Ignacio Melero, Antonio M. Grimaldi, Jose L. Perez-Gracia et al. // Clinical cancer. – Vol. 19 (5). – P. 997-1008 WO 2013019906 A1, 07.02.2013 David A. Schaer Modulation of GITR for cancer immunotherapy / David A. Schaer, Judith T. Murphy, Jedd D. Wolchok // Current opinion in immunology. – 2012. – Vol. 24. – P. 217–224 Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor- infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells / Kuibeom Ko, Sayuri Yamazaki, Kyoko Nakamura et al. // The journal of experimental medicine. – 2005. – Vol. 202 (7). – P. 885-891
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	20.08.2013		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	11.07.2016, Бюл.№ 13		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.01.2019, Бюл.№ 2		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2014/051402, 18.08.2014		

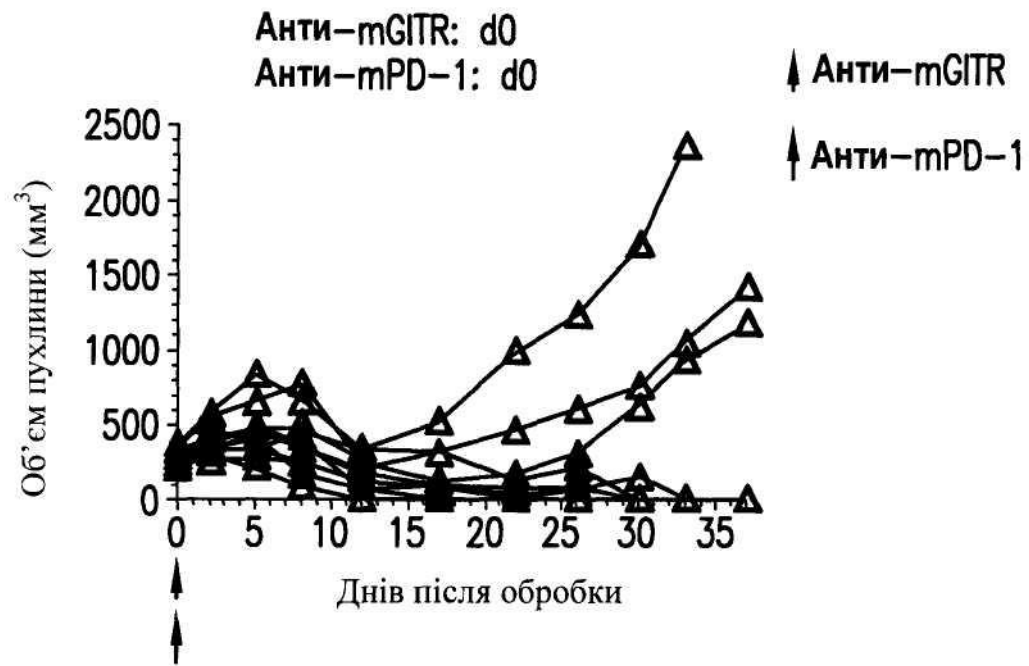
(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ПУХЛИН У ПАЦІЄНТА

(57) Реферат:

Винахід стосується способу лікування пухлини у пацієнта, який включає введення пацієнту антагоніста PD-1, який являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що зв'язується з PD-1, і агоніста GITR, який являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що зв'язується з GITR, де антагоніст PD-1 і агоніст GITR вводять одночасно або послідовно. Винахід також стосується фармацевтичної комбінації для лікування пухлини та

UA 118453 C2

застосування вказаних антагоніста PD-1 і агоніста GITR для лікування пухлини на останній стадії.



Фіг. 1А

Опис

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

[0001] Даний винахід стосується модулювання імунітету до пухлини при лікуванні пухлин пізніх стадій. Конкретно, даний винахід надає антагоністи PD-1 в комбінації з агоністами GITR для посилення протипухлинних відповідей на пухлини пізніх стадій.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ ВІНАХОДУ

[0002] Мікрооточення пухлини являє собою важливий аспект біології раку, грає роль в зародженні пухлини, прогресуванні пухлини і відповідях на терапію. Клітини і молекули імунної системи являють собою основний компонент мікрооточення пухлини. Важливо, що стратегії лікування здатні використовувати імунну систему для специфічного виділення пухлинних клітин, і це є особливо привабливим завдяки можливості індукування пухлиноспецифічної імунологічної пам'яті, яка могла б викликати довготривалу регресію і запобігти рецидиву у хворих на рак.

[0003] Композиція і характеристики мікрооточення пухлини широко варіюють і є важливими при визначенні протипухлинної імунної відповіді. Наприклад, певні клітини імунної системи, включаючи натуральні клітини-кілери, дендритні клітини (DC) і ефекторні Т-клітини, здатні до збудження потужних протипухлинних відповідей. Однак пухлинні клітини часто індукують імуносупресивне мікрооточення, яке сприяє розвитку імуносупресивних популяцій імунних клітин, таких як мієлоїдні супресорні клітини і регуляторні Т-клітини. Розуміння складності імуномодуляції пухлинами є важливим для розвитку імунотерапії. Для посилення протипухлинних імунних відповідей розробляються різноманітні стратегії, включаючи вакцини, основані на дендритних клітинах, і антагоністи інгібуючих сигнальних шляхів для подолання "імунних контрольних точок".

[0004] Білок, зв'язаний з глюкокортикоїд-індукованим TNFR (GITR), член суперсімейства TNFR, експресується в багатьох компонентах природженої і адаптивної імунної системи (див., наприклад, Hanabuchi et al. (2006), *Blood*, 107:3617-3623; і Nocentini and Riccardi (2005), *Eur. J. Immunol.* 2005. 35:1016-1022). Його мембранна експресія збільшується услід за активацією Т-клітин (Hanabuchi, вище; і Nocentini and Riccardi, вище); його стимуляція коактивує ефекторні Т-лімфоцити і модулює активність регуляторних Т-клітин (Treg) (див., наприклад, McHugh et al. (2002), *Immunity*, 2002, 16:311-323; Shimizu et al. (2002), *Nat. Immunol.* 3:135-142; Ronchetti et al. (2004), *Eur. J. Immunol.* 34:613-622; і Tone et al. (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:15059-15064).

[0005] GITR активується лігандом GITR (GITRL), який головним чином експресується на APC і, як передбачається, доставляє сигнали за допомогою свого цитоплазматичного домену, хоч необхідні додаткові дослідження для визначення біохімічної передачі сигналів (Nocentini, вище; Ronchetti, вище; Suvas et al. (2005), *J. Virol.* 79:11935-11942; і Shin et al. (2002), *Cytokine*, 19:187-192).

[0006] Активация GITR підвищує опірність пухлинам і вірусним інфекціям, вона бере участь в аутоімунних/запальних процесах і регулює екстравазацію лейкоцитів (Nocentini вище; Cuzzocrea et al. (2004), *J. Leukoc. Biol.* 76:933-940; Shevach et al. (2006), *Nat. Rev. Immunol.* 6:613-618; Cuzzocrea et al. (2006), *J. Immunol.* 177:631-641; і Cuzzocrea et al. (2007), *FASEB J.* 21:117-129). В мишачих пухлинних моделях, антитіло-агоніст GITR, DTA-1, комбінували з антитілом-антагоністом CTLA-4 і продемонстрували синергетичний ефект у вигляді повної регресії пухлини в пухлинах на пізній стадії в декількох тестованих групах мишей (Ko et al. (2005), *J. Exp. Med.* 7:885-891).

[0007] Рецептор програмованої смерті 1 (PD-1) являє собою імуоінгібуючий рецептор, який первинно експресується на активованих Т- і В-клітинах. Було показано, що взаємодія з його лігандами ослабляє Т-клітинні відповіді як *in vitro*, так і *in vivo*. Було показано, що блокування взаємодії між PD-1 і одним з його лігандів, PD-L1, підвищує пухлиноспецифічний CD8+ Т-клітинний імунітет і таким чином може бути корисним при очищенні від пухлинних клітин імунною системою.

[0008] PD-1 (кодований геном *Pdcd1*) являє собою член суперсімейства імуноглобулінів, зв'язаний з CD28 і CTLA-4. Було показано, що PD-1 негативно регулює передачу сигналу антигенного рецептора при залученні його лігандів (PD-L1 і/або PD-L2). Була з'ясована структура PD-1 миші, а також спільна кристалічна структура PD-1 миші з PD-L1 людини (Zhang X. et al. (2004), *Immunity*, 20:337-347; Lin et al. (2008), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105:3011-6). PD-1 і аналогічні члени сімейства являють собою трансмембранні глікопротеїни типу I, що містять домен Ig варіабельного типу (V-типу), відповідальний за зв'язування лігандів, і цитоплазматичний кінцевий сегмент, який є відповідальним за зв'язування сигнальних молекул. Цитоплазматичний кінцевий сегмент PD-1 містить два тирозинвмісних мотиви сигнальної

системи, ITIM (тирозинвмісний інгібіторний мотив імунорецептора) і ITSM (інгібіторний мотив перемикачів імунорецептора).

[0009] У людей експресія PD-1 (на проникаючих в пухлину лімфоцитах) і/або PD-L1 (на пухлинних клітинах) була виявлена в ряді біопсій первинних пухлин, оцінених за допомогою імуногістохімії. Дані тканини включають рак легені, печінки, яєчників, шийки матки, шкіри, ободової кишки, гліому, жовчного міхура, молочних залоз, нирок, стравоходу, шлунка, плоскоклітинний рак порожнини рота, уротеліальних клітин і підшлункової залози, а також пухлини голови і шиї (Brown J. A. et al. (2003), *J. Immunol.* 170:1257-1266; Dong H. et al. (2002), *Nat. Med.* 8:793-800; Wintterle et al. (2003), *Cancer. Res.* 63:7462-7467; Strome S. E. et al. (2003), *Cancer. Res.* 63:6501-6505; Thompson R. H. et al. (2006), *Cancer. Res.* 66:3381-5; Thompson et al. (2007), *Clin. Cancer. Res.* 13:1757-61; Nomi T. et al. (2007), *Clin. Cancer. Res.* 13:2151-7). Більш несподівано, експресія PD-ліганду на пухлинних клітинах корелювала з несприятливим прогнозом хворих на рак у багатьох типах пухлин (розглянуто у Okazaki and Honjo (2007), *Int. Immunol.* 813-824).

[0010] До даного часу численні дослідження показали, що взаємодія PD-1 з його лігандами (PD-L1 і PD-L2) приводить до інгібування проліферації лімфоцитів *in vitro* і *in vivo*. Блокування взаємодії PD-1/PD-L1 може привести до посиленого пухлиноспецифічного Т-клітинного імунітету і, внаслідок цього, бути корисним при ліквідації пухлинних клітин імунною системою. Для вирішення даної проблеми провели ряд досліджень. У мишачій моделі агресивного раку підшлункової залози (Nomi T. et al. (2007), *Clin. Cancer. Res.* 13:2151-2157) була продемонстрована терапевтична ефективність блокування PD-1/PD-L1. Введення антитіла, направлено на PD-1, або на PD-L1, значно уповільнювало пухлинний ріст. Блокування антитілами ефективно сприяло інфільтрації в пухлину пухлинореактивних CD8⁺ Т-клітин, приводячи до підвищувальної регуляції протипухлинних ефекторів, включаючи IFN-гамма, гранзим В і перфорин. Додатково автори показали, що блокування PD-1 можна ефективно комбінувати з хіміотерапією для одержання синергетичного ефекту. У іншому дослідженні, з застосуванням моделі плоскоклітинної карциноми у мишей, блокування PD-1 або PD-L1 антитілами значно уповільнювало пухлинний ріст (Tsushima F. et al. (2006), *Oral Oncol.* 42:268-274).

[0011] Існує потреба в поліпшених способах і композиціях для лікування імунних і проліферативних порушень, наприклад пухлин і видів раку, за допомогою застосування агентів, які модулюють імунітет до пухлини. Даний винахід заповнює дану потребу за допомогою надання антагоністів PD-1 в комбінації з агоністами GITR для лікування пухлин на пізній стадії.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

[0012] Фігури 1A-1K демонструють дію анти-GITR антитіл, що вводяться окремо або в комбінації з анти-PD-1 антитілом, на протипухлинну відповідь мишей з імплантованою клітинною лінією MC38 (n=10/група). Обробку починали, коли пухлини досягали 240-360 мм³.

[0013] Фігури 2A-2F демонструють протипухлинну ефективність однократної дози анти-GITR антитіл з подальшою однократною дозою анти-PD-1 антитіл через один тиждень (Фіг. 2B) або в протилежній послідовності (Фіг. 2C). Це порівнювали з кожним антитілом окремо (Фіг. 2E-2F; n=10/група).

[0014] Фігури 3A-3D показують протипухлинну ефективність монотерапії анти-GITR або анти-PD-1 антитілом окремо (Фіг. 3C-3D) в порівнянні зі спільним введенням обох антитіл (Фіг. 3A) в моделі пухлини CT26 (n=10/група).

[0015] Фігури 4A-4D показують дію анти-GITR і анти-PD-1 антитіл, із введенням окремо або введенням одночасно обох антитіл, на протипухлинну відповідь мишей з імплантованою клітинною лінією MB49 (n=10/група). Обробку починали, коли пухлини досягали 85-122 мм³.

[0016] Фігури 5A-5B показують дозозалежний ефект комбінації анти-GITR (МК-4166) і анти-PD-1 (МК-3475) на Treg (Фіг. 5A) і співвідношення клітин Treg:CD8 (Фіг. 5B) в реакції змішаних лімфоцитів (MLR).

[0017] Фігура 6 демонструє, що інкубування з комбінацією МК-4166 і МК-3475 приводить до зменшеної супресивної активності Treg в MLR.

СУТЬ ВИНАХОДУ

[0018] Даний винахід задовольняє дані потреби в галузі винаходу і в інших галузях за допомогою надання способу лікування пухлини у пацієнта, який включає введення пацієнту антагоніста PD-1 і агоніста GITR, при цьому антагоніст PD-1 і агоніст GITR вводять одночасно або послідовно. У певних варіантах здійснення антагоніст PD-1 являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, який зв'язує PD-1 або PD-L1; а агоніст GITR являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, який зв'язує GITR. Агоніст GITR і PD-1 або

антагоніст PD-L1 зв'язується з білками людини. Антитіло або його зв'язувальний фрагмент є гуманізованим або повністю людським.

[0019] У додаткових варіантах здійснення антагоніст PD-1 вибирають з групи, що складається з BMS-936558, MK-3475 і MPDL3280A; а агоніст GITR вибирають з групи, яка складається з антитіла, що має щонайменше одну CDR з SEQ ID NO:1-66; TRX518 і TRX385. Агоніст GITR може являти собою антитіло, що має: CDR1 важкого ланцюга з SEQ ID NO:1-11, CDR2 з SEQ ID NO:12-22 і CDR3 з SEQ ID NO:23-33 і/або CDR1 легкого ланцюга з SEQ ID NO:34-44, CDR2 з SEQ ID NO:45-55 і CDR3 з SEQ ID NO:56-66. У ще одному додатковому варіанті здійснення агоніст GITR являє собою антитіло, що має: варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO:67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85 і 87 і/або варіабельну ділянку легкого ланцюга з SEQ ID NO:68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86 і 88.

[0020] Даний винахід також передбачає, що антагоніст PD-1 і агоніст GITR вводять одночасно щонайменше один раз. У певних варіантах здійснення антагоніст PD-1 і агоніст GITR вводять одночасно щонайменше 2 рази. У певних варіантах здійснення пухлина являє собою пухлину на останній стадії і може бути вибрана з групи, що складається з плоскоклітинного раку, дрібноклітинного раку легені, недрібноклітинного раку легені, гастроінтестинального раку, раку підшлункової залози, гліобластоми, гліоми, раку шийки матки, раку яєчників, раку печінки, такого як карцинома печінки і гепатома, раку жовчного міхура, раку молочної залози, раку ободової кишки, колоректального раку, раку ендометрія, мієломи (такої як множинна мієлома), раку слинної залози, раку нирок, такого як нирковоклітинний рак і пухлина Вільмса, базальноклітинного раку, меланоми, раку простати, раку вульви, раку щитовидної залози, раку яєчка і раку стравоходу.

[0021] Даний винахід надає спосіб лікування пухлини за допомогою введення пацієнту біспецифічного антитіла, що включає перше плече, яке зв'язується з PD-1 або PD-L1 і протидіє активності PD-1, і друге плече, яке зв'язується з GITR і є агоністом активності GITR. У певних варіантах здійснення перше плече вибране з групи, що складається з антигензв'язувального фрагмента з BMS-936558, MK-3475 і MPDL3280A; і друге плече вибране з групи, що складається з антигензв'язувального фрагмента антитіла, що має щонайменше одну CDR з SEQ ID NO:1-66; TRX518 і TRX385. У ще одному додатковому варіанті здійснення друге плече має CDR1 важкого ланцюга з SEQ ID NO:1-11, CDR2 з SEQ ID NO:12-22 і CDR3 з SEQ ID NO:23-33 і/або CDR1 легкого ланцюга з SEQ ID NO:34-44, CDR2 з SEQ ID NO:45-55 і CDR3 з SEQ ID NO:56-66. У певних варіантах здійснення друге плече має варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO:67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85 і 87 і/або варіабельну ділянку легкого ланцюга з SEQ ID NO:68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86 і 88.

[0022] Даний винахід надає спосіб лікування пухлини, при цьому пухлина являє собою пухлину на останній стадії. У певних варіантах здійснення пухлину на останній стадії вибирають з групи, що складається з плоскоклітинного раку, дрібноклітинного раку легені, недрібноклітинного раку легені, гастроінтестинального раку, раку підшлункової залози, гліобластоми, гліоми, раку шийки матки, раку яєчників, раку печінки, такого як карцинома печінки і гепатома, раку жовчного міхура, раку молочної залози, раку товстої кишки, колоректального раку, раку ендометрія, мієломи (такої як множинна мієлома), раку слинної залози, раку нирок, такого як нирковоклітинний рак і пухлина Вільмса, базальноклітинного раку, меланоми, раку простати, раку вульви, раку щитовидної залози, раку яєчка і раку стравоходу.

[0023] Даний винахід надає фармацевтичну композицію, яка включає антагоніст PD-1 і агоніст GITR. Також надане застосування антагоніста PD-1 в комбінації з агоністом GITR для лікування пухлини на останній стадії.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС

[0024] Як використовується в даному документі, включаючи прикладену формулу винаходу, форми однини таких слів як "a", "an" і "the" включають їх відповідні множинні посилання, якщо з контексту однозначно не випливає інше. Таблиця 15 нижче надає список ідентифікаторів послідовностей, використовуваних в даній заявці. Всі посилання, цитовані в даному документі, включені за допомогою посилання такою ж мірою, як якби було окремо указано, що за допомогою посилання були конкретно і окремо включені кожна окрема публікація, значення бази даних (наприклад, GenBank послідовності або значення GeneID), патентна заявка або патент. Цитування посилань в даному документі не треба розглядати як визнання того, що все з перерахованого вище стосується попереднього рівня техніки, або робити припущення відносно змісту або дати даних публікацій або документів.

I. Визначення

[0025] Термін "глюкокортикоїд-індукований рецептор TNF" (скорочений в даному документі як "GITR"), також відомий як 18 член суперсімейства рецепторів TNF (TNFRSF18), TEASR і

312C2, як використовується в даному документі, стосується членів сімейства рецепторів до фактора некрозу пухлини/фактора росту нервів. G1TR являє собою трансмембранний білок типу I з 241 амінокислоти, що характеризується трьома цистеїновими псевдоповторами у позаклітинному домені, і специфічно захищає апоптоз, індукований T-клітинними рецепторами, хоч він сам по собі не захищає клітини від інших апоптотичних сигналів, включаючи ініціювання Fas, лікування дексаметазоном або УФ-випромінювання (Nocentini G. et al. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:6216-622). Нуклеїновокислотні і амінокислотні послідовності людського G1TR (hG1TR), в якому є три сплайс-варіанти, є відомими і можуть бути знайдені, наприклад, в GenBank Accession NO gi:40354198, gi:23238190, gi:23238193 і gi:23238196.

[0026] "Агоніст G1TR" означає будь-яку хімічну сполуку або біологічну молекулу, яка стимулює імунну реакцію через активацію сигнальної системи G1TR. Послідовності антитіл-агоністів анти-G1TR надані в WO 2011/028683 і WO 2006/105021, а також в TRX-385 і TRX-518. Також розглядаються розчинні білки G1TR-L, партнери по зв'язуванню G1TR.

[0027] "Антагоніст PD-1" означає будь-яку хімічну сполуку або біологічну молекулу, яка блокує зв'язування PD-L1, експресованого на раковій клітині, з PD-1, експресованим на імунній клітині (T-клітині, B-клітині або NKT-клітині), і переважно також блокує зв'язування PD-L2, експресованого на раковій клітині, з експресованим імунною клітиною PD-1. Альтернативні назви або синоніми PD-1 і його лігандів включають: рецептор 1 програмованої смерті; PDCD1, PD1, CD279 і SLEB2 для PD-1; PDCD1L1, PDL1, B7H1, B7-4, CD274 і B7-H для PD-L1; і ліганд 1 рецептора програмованої смерті, PDCD1L2, PDL2, B7-DC, Btdc і CD273 для PD-L2. У будь-якому способі лікування, використання медикаментів і застосування даного винаходу, при якому людський індивід піддається лікуванню, антагоніст PD-1 блокує зв'язування людського PD-L1 з людським PD-1 і переважно блокує зв'язування як людського PD-L1, так і PD-L2 з людським PD-1. Амінокислотні послідовності людського PD-1 можна знайти в NCBI Locus No.: NP_005009. Амінокислотні послідовності людських PD-L1 і PD-L2 можна знайти в NCBI Locus No.: NP_054862 і NP_079515, відповідно.

[0028] Антагоністи PD-1, придатні в будь-якому способі лікування, використання медикаментів і застосування даного винаходу, включають моноклональне антитіло (mAb) або його антигензв'язувальний фрагмент, що специфічно зв'язується з PD-1 або PD-L1 і переважно специфічно зв'язується з людським PD-1 або людським PD-L1. mAb може являти собою людське антитіло, гуманізоване антитіло або химерне антитіло і може включати людську константну область. У деяких варіантах здійснення людську константну область вибирають з групи, що складається з константних областей IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4, і в переважних варіантах здійснення людська константна область являє собою константну область IgG1 або IgG4. У деяких варіантах здійснення антигензв'язувальний фрагмент вибирають з групи, що складається з фрагментів Fab, Fab'-SH, F(ab')₂, scFv і Fv.

[0029] Приклади mAb, які зв'язуються з людським PD-1 і є придатними для способів лікування, використання медикаментів і застосування даного винаходу, описані в US 7521051, US 8008449 і US 8354509. Специфічні антилюдські PD-1 mAb, придатні як антагоніст PD-1 в способах лікування, використання медикаментів і застосування даного винаходу, включають: МК-3475, гуманізоване mAb IgG4 зі структурою, описаною в WHO Drug Information, Vol. 27, № 2, pp. 161-162 (2013), яке містить амінокислотні послідовності важкого і легкого ланцюгів, показані на Фігурі 6, ніволумаб (BMS-936558), людське mAb IgG4 зі структурою, описаною в WHO Drug Information, Vol. 27, № 1, pp. 68-69 (2013), яке містить амінокислотні послідовності важкого і легкого ланцюгів, показані на Фігурі 7; підилізумаб (CT-011, також відомий як hBAT або hBAT-1) і гуманізовані антитіла h409A11, h409A16 і h409A17, які описані в WO 2008/156712.

[0030] Приклади mAb, які зв'язуються з людським PD-L1 і є придатними в способах лікування, використання медикаментів і застосування даного винаходу, описані в WO 2013/019906, WO 2010/077634 A1 і US 8383796. Специфічні антилюдські PD-L1 mAb, придатні як антагоніст PD-1 в способах лікування, використання медикаментів і застосування даного винаходу, включають MPDL3280A, BMS-936559, MEDI4736, MSB0010718C і антитіло, яке включає варіабельні ділянки важких ланцюгів і легких ланцюгів з SEQ ID NO:24 і SEQ ID NO:21, відповідно, з WO 2013/019906.

[0031] Термін "введення", як використовується в даному документі, стосується механічного введення композиції, що включає агоніст G1TR і щонайменше один додатковий агент для терапії раку, наприклад антагоніст PD-1, пацієнту з раком. Будь-який і всі способи введення розглядаються відповідно до винаходу; спосіб є незалежним від якого-небудь конкретного засобу введення. Засоби введення добре відомі кваліфікованим фахівцям в галузі винаходу і їх приклади надані в даному документі.

[0032] Термін "спільне введення" як використовується в даному документі, означає процес, відповідно до якого комбінацію агоніста G1TR і щонайменше одного додаткового агента для терапії раку, наприклад антагоніста PD-1, вводять одному і тому ж пацієнту. Агоніст G1TR і антагоніст PD-1 можна вводити одночасно або послідовно. Якщо має місце послідовне введення, агоніст G1TR і/або антагоніст PD-1 можна вводити перед або після даного додаткового агента для терапії раку або лікування. Немає необхідності вводити агоніст G1TR і антагоніст PD-1 для лікування за допомогою одного і того ж середовища. Агоніст G1TR і антагоніст PD-1 можна вводити один або більше разів, і число введень кожного компонента комбінації може бути однаковим або різним. На доповнення, немає необхідності вводити агоніст G1TR і антагоніст PD-1 в одну і ту ж область.

[0033] Термін "терапевтично ефективна кількість" або "терапевтично ефективна комбінація", як використовується в даному документі, стосується кількості або дози агоніста G1TR, разом з кількістю або дозою додаткового агента або лікування, наприклад антагоніста PD-1, яка є достатньою для модулювання, наприклад стимулювання, системної імунної відповіді у індивіда. Кількість кожної молекули в даній терапевтично ефективній комбінації може бути різною для різних індивідів і різних типів пухлини і буде залежати від одного або більше додаткових агентів або видів лікування, включених в комбінацію. "Терапевтично ефективну кількість" визначають, застосовуючи методики, звичайно використовувані кваліфікованими фахівцями в галузі винаходу, таким чином, щоб одержати в результаті "поліпшений терапевтичний ефект".

[0034] Як використовується в даному документі, терміни "поліпшений терапевтичний ефект" і "підвищена терапевтична ефективність" відносно раку стосуються уповільнення або ослаблення росту ракових клітин або солідної пухлини або редукції загальної кількості ракових клітин або загального пухлинного навантаження. Внаслідок цього "поліпшений терапевтичний ефект" або "посилена терапевтична ефективність" означає наявність поліпшення в стані пацієнта відповідно до будь-яких клінічно прийнятних критеріїв, включаючи, наприклад, зменшення розміру пухлини, збільшення часу до прогресування пухлини, підвищення виживаності без прогресування захворювання, збільшення часу загальної виживаності, збільшення тривалості життя або поліпшення якості життя. Конкретно, "поліпшений" або "збільшений" стосується поліпшення або збільшення на 1 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 % або більше ніж на 100 % будь-якого клінічно прийнятного показника терапевтичного ефекту або ефективності.

[0035] Як використовується в даному документі, термін "антитіло" стосується будь-якої форми антитіла, яка демонструє необхідну біологічну активність. Таким чином, він застосовується в найбільш широкому значенні і конкретно охоплює моноклональні антитіла (включаючи повнорозмірні моноклональні антитіла), поліклональні антитіла, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла), химерні антитіла, гуманізовані антитіла, повністю людські антитіла і т. д., за умови, що вони демонструють необхідну біологічну активність.

[0036] Як використовується в даному документі, терміни "G1TR-, PD-1- або PD-L1-зв'язувальний фрагмент", "його зв'язувальний фрагмент" або "його антигензв'язувальний фрагмент" охоплюють фрагмент або похідне антитіла, що все ж по суті зберігає свою біологічну активність індукування передачі сигналів G1TR, згадувану в даному документі як "G1TR-індукована активність". Як альтернатива, PD-1- або PD-L1-зв'язувальний фрагмент охоплює фрагмент або похідне антитіла, що інгібує активність PD-1, наприклад, зв'язуючись з PD-L1 або PD-L2. Термін "фрагмент антитіла" або G1TR-, PD-1- або PD-L1-зв'язувальний фрагмент стосується ділянки повнорозмірного антитіла, загалом його антигензв'язувальної або варіабельної області. Приклади фрагментів антитіл включають Fab-, Fab'-, F(ab')₂- і Fv-фрагменти; діантитіла; лінійні антитіла; молекули одноланцюжкового антитіла, наприклад sc-Fv; і мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл. Звичайно зв'язувальний фрагмент або похідне зберігає щонайменше 10 % активності свого агоніста G1TR. Переважно, зв'язувальний фрагмент або похідне зберігає щонайменше 25 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % або 100 % (або більше) активності свого агоніста G1TR або антагоніста PD-1, хоч придатним буде будь-який зв'язувальний фрагмент з афінністю, достатньою для збудження необхідного біологічного ефекту. Також передбачається, що G1TR-, PD-1- або PD-L1-зв'язувальний фрагмент може включати варіанти, що мають заміщення консервативних амінокислот, які по суті не змінюють їх біологічну активність.

[0037] Термін "моноклональне антитіло", як використовується в даному документі, стосується антитіла, одержаного з популяції по суті гомогенних антитіл, тобто окремі антитіла, що містять популяцію, є ідентичними за винятком можливих мутацій природного походження, які можуть бути присутні в незначних кількостях. Моноклональні антитіла є високоспецифічними, будучи направленими проти окремого антигенного епітопа. На відміну від

цього, загальноприйнятті (поліклональні) препарати з антитілами звичайно включають різноманітні антитіла, направлені проти (або специфічні для) різних епітопів. Термін "моноклональне" вказує на характер антитіла, як одержаного з по суті гомогенної популяції антитіл, і не повинен тлумачитися як необхідність одержання антитіла яким-небудь конкретним способом. Наприклад, моноклональні антитіла для застосування відповідно до даного винаходу можуть бути виготовлені за допомогою гібридомного методу, вперше описаного у Kohler et al. (1975), *Nature*, 256:495, або можуть бути виготовлені за допомогою способів рекомбінантних ДНК (див., наприклад, Патент США № 4816567). "Моноклональні антитіла" також можуть бути виділені з фагових бібліотек антитіл із застосуванням методик, описаних, наприклад, у Clackson et al. (1991), *Nature*, 352:624-628, і Marks et al. (1991), *J. Mol. Biol.* 222:581-597.

[0038] Моноклональні антитіла в даному документі специфічно включають "химерні" антитіла (імуноглобуліни), в яких ділянка важкого і/або легкого ланцюга є ідентичною або гомологічною відповідним послідовностям в антитілах, які одержані від конкретного виду або належать до конкретного класу або підкласу антитіл, при цьому залишок ланцюга (ланцюгів) є ідентичним або гомологічним відповідним послідовностям в антитілах, які одержані від іншого виду або належать до іншого класу або підкласу антитіл, а також фрагментів даних антитіл, за умови, що вони демонструють необхідну біологічну активність. Патент США № 4816567; Morrison et al. (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855.

[0039] "Доменне антитіло" являє собою імунологічний функціональний фрагмент імуноглобуліну, що містить тільки варіабельну область важкого ланцюга або варіабельну область легкого ланцюга. У деяких випадках дві або більше VH-ділянок ковалентно зв'язані з пептидним лінкером для створення бівалентного доменного антитіла. Дві VH-ділянки бівалентного доменного антитіла можуть виділяти одні і ті ж або різні антигени.

[0040] "Бівалентне антитіло" включає дві антигензв'язувальні ділянки. У деяких випадках дві зв'язувальні ділянки мають однакову антигенну специфічність. Однак бівалентні антитіла можуть бути біспецифічними (див. нижче).

[0041] Як використовується в даному документі, термін "одноланцюжковий Fv" або "scFv"-антитіло стосується фрагментів антитіл, що включають VH- і VL-домени антитіла, при цьому дані домени присутні в простому поліпептидному ланцюзі. Загалом, Fv-поліпептид додатково включає поліпептидний лінкер між VH- і VL-доменами, який робить можливим формування для sFv необхідної структури для зв'язування антигену. Для огляду sFv див. Pluckthun (1994), *THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315.

[0042] Моноклональні антитіла в даному документі також включають верблюдячі ододоменні антитіла. "Фрагмент доменного антитіла" являє собою імунологічний функціональний фрагмент імуноглобуліну, що містить тільки варіабельну область важкого ланцюга або варіабельну область легкого ланцюга. У деяких випадках дві або більше VH-областей ковалентно зв'язані з пептидним лінкером для створення фрагмента мультівалентного доменного антитіла. Дві VH-області фрагмента бівалентного доменного антитіла можуть виділяти одні і ті ж або різні антигени. Див., наприклад, Muyldermans et al. (2001), *Trends Biochem. Sci.* 26:230; Reichmann et al. (1999), *J. Immunol. Methods*, 231:25; WO 94/04678; WO 94/25591; Патент США № 6005079). У одному варіанті здійснення даний винахід надає ододоменні антитіла, що включають два VH-домени з такими модифікаціями, які утворюють ододоменні антитіла.

[0043] Як використовується в даному документі, термін "діантитіла" стосується невеликих фрагментів антитіл з двома антигензв'язувальними ділянками, фрагменти яких включають варіабельний домен важкого ланцюга (VH), з'єднаний з варіабельним доменом легкого ланцюга (VL) в одному і тому ж поліпептидному ланцюзі (VH-VL або VL-VH). Шляхом застосування лінкера, який є дуже коротким, щоб дозволити об'єднання двох доменів на одному і тому ж ланцюзі, домени вимушені створювати пари з комплементарними доменами іншого ланцюга і створюють дві антигензв'язувальні ділянки. Діантитіла більш повно описані, наприклад, в EP 404097; WO 93/11161; і Holliger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448. Для огляду варіантів сконструйованих антитіл загалом див. Holliger and Hudson (2005), *Nat. Biotechnol.* 23:1126-1136.

[0044] Як використовується в даному документі, термін "гуманізоване антитіло" стосується форм антитіл, які містять послідовності з нелюдських (наприклад, мишачих) антитіл, а також людських антитіл. Дані антитіла містять мінімальну послідовність, похідну нелюдського імуноглобуліну. Загалом, гуманізоване антитіло буде включати по суті всі з щонайменше одного, і типово двох, варіабельного домену, в якому всі або по суті всі гіперваріабельні петльові фрагменти відповідають гіперваріабельним петльовим фрагментам нелюдського

імуноглобуліну, і всі або по суті всі FR-області є FR-областями послідовності людського імуноглобуліну. Гуманізоване антитіло також необов'язково буде включати щонайменше ділянку константної області (Fc) імуноглобуліну, звичайно константної області людського імуноглобуліну. Префікс "hum", "hu" або "h" додають до позначень клонів антитіл, коли

5 необхідно відрізнити гуманізовані антитіла від батьківських антитіл гризунів. Гуманізовані форми антитіл гризунів будуть загалом включати такі ж послідовності CDR батьківських антитіл гризунів, хоч деякі амінокислотні заміщення можуть бути включені для підвищення афінності, підвищення стабільності гуманізованого антитіла або через інші причини.

[0045] Термін "повністю людське антитіло" стосується антитіла, яке включає білкові послідовності тільки людського імуноглобуліну. Повністю людське антитіло може містити мишачі вуглеводні ланцюги при одержанні у мишей, в клітині миші або в гібридомі, одержаній з мишачої клітини. Таким же чином, "мишаче антитіло" або "щуряче антитіло" стосується антитіла, яке

10 включає послідовності тільки мишачого або щурячого імуноглобуліну, відповідно. Повністю людське антитіло може продукуватися в людині, в трансгенній тварині, що має послідовності імуноглобуліну зародкової лінії людини, за допомогою фагового дисплея або інших способів молекулярної біології. Ілюстративні методики, які можна застосовувати для виготовлення антитіл, описані в патентах США №№ 6150584; 6458592; 6420140. Інші методики, такі як застосування бібліотек, є відомими в галузі винаходу.

[0046] Антитіла даного винаходу також включають антитіла з модифікованими (або

20 блокованими) Fc-областями для надання змінених ефекторних функцій. Див., наприклад, Патент США № 5624821; WO 2003/086310; WO 2005/120571; WO 2006/0057702; Presta (2006), Adv. Drug Delivery Rev. 58:640-656. Дану модифікацію можна застосовувати для посилення або пригнічення різних реакцій імунної системи, з можливими корисними ефектами в діагностиці і терапії. Зміни Fc-області включають амінокислотні зміни (заміщення, делеції і вставки),

25 глікозилювання або деглікозилювання і додавання множинних Fc. Зміни в Fc також можуть змінювати час напівжиття антитіл в лікарських засобах на основі моноклональних антитіл, і більш тривалий час напівжиття може приводити до менш частого введення доз з супутнім підвищенням зручності і зменшенням використання матеріалу. See Presta (2005), J. Allergy Clin. Immunol. 116:731 at 734-35.

30 [0047] Антитіла даного винаходу також включають антитіла з інтактними Fc-областями, які надають повні ефекторні функції, наприклад антитіла ізотипу IgG1, які індують комплементозалежну цитотоксичність (CDC) або антитілозалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC) у виділеній клітині.

[0048] Антитіла даного винаходу також включають антитіла, кон'юговані з цитотоксичними навантаженнями, такими як цитотоксичні агенти або радіонукліди. Дані кон'югати антитіл можна застосовувати в імунотерапії в поєднанні з анти-GITR, анти-PD-1 або анти-PD-L1 лікуванням для селективного виділення і знищення клітин, експресуючих визначені антигени на своїй

35 поверхні. Ілюстративні цитотоксичні агенти включають рицин, алкалоїд барвінку, метотрексат, екзотоксин синьогнійної палички, сапорин, дифтерійний токсин, цисплатин, доксорубіцин, токсин абрин, гелонін і противірусний білок лакноса. Ілюстративні радіонукліди для застосування в імунотерапії з антитілами даного винаходу включають ¹²⁵I, ¹³¹I, ⁹⁰Y, ⁶⁷Cu, ²¹¹At, ¹⁷⁷Lu, ¹⁴³Pr і ²¹³Bi (див., наприклад, публікацію патентної заявки США № 2006/0014225).

[0049] Біспецифічні антитіла також є придатними в даних способах і композиціях. Як використовується в даному документі, термін "біспецифічне антитіло" стосується антитіла,

45 типово моноклонального антитіла, що має специфічність зв'язування щонайменше двох різних антигенних епітопів. У одному варіанті здійснення епітопи походять від одного і того ж антигену. У іншому варіанті здійснення епітопи походять від двох різних антигенів. Способи виготовлення біспецифічних антитіл є відомими в галузі винаходу. Наприклад, біспецифічні антитіла можуть бути одержані рекомбінантно із застосуванням коекспресії двох пар важких ланцюгів/легких ланцюгів імуноглобулінів. Див., наприклад, Milstein et al. (1983), Nature, 305:537-39. Як альтернатива, біспецифічні антитіла можна виготовити із застосуванням хімічного зв'язку. Див., наприклад, Brennan et al. (1985), Science, 229:81. Біспецифічні антитіла включають фрагменти біспецифічних антитіл. Див., наприклад, Holliger et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-48, Gruber et al. (1994), J. Immunol. 152:5368.

50 [0050] Термін "мультиспецифічні" включає зв'язувальні молекули, які мають специфічність для більше ніж одного антигену-мішені. Дані молекули мають більше ніж одну зв'язувальну ділянку, при цьому кожна зв'язувальна ділянка специфічно зв'язується (наприклад, вступає в імунну реакцію з) різними молекулами-мішенями або різним антигенними ділянками на одній і тій же мішені. У одному варіанті здійснення мультиспецифічна зв'язувальна молекула винаходу

60 являє собою біспецифічну молекулу (наприклад, антитіло, міні-антитіло, антитіло з видаленим

доменом або білок злиття), що має специфічність зв'язування щонайменше до двох мішеней, наприклад більше ніж однієї молекули-мішені або більше ніж одного епітопа на одній і тій же молекулі-мішені.

[0051] Як використовується в даному документі, термін "гіперваріабельна ділянка" стосується амінокислотних залишків антитіла, які є відповідальними за зв'язування антигену. Гіперваріабельна ділянка включає амінокислотні залишки від "області, що визначає комплементарність, " або "CDR" (наприклад, залишки 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) і 89-97 (CDRL3) у варіабельному домені легкого ланцюга і залишки 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) і 95-102 (CDRH3) у варіабельному домені важкого ланцюга (Kabat et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) і/або амінокислотні залишки з "гіперваріабельного петльового фрагмента" (наприклад, залишки 26-32 (L1), 50-52 (L2) і 91-96 (L3) у варіабельному домені легкого ланцюга і 26-32 (H1), 53-55 (H2) і 96-101 (H3) у варіабельному домені важкого ланцюга (Chothia and Lesk (1987), J. Mol. Biol. 196:901-917). Як використовується в даному документі, термін "каркасні" або "FR"-залишки стосується таких залишків варіабельних доменів, які відрізняються від залишків гіперваріабельних ділянок, визначених в даному документі як CDR-залишки. Нумерація залишків вище належить до нумерації Кебата.

[0052] "Зв'язувальна сполука" стосується молекули, невеликої молекули, макромолекули, поліпептиду, антитіла або його фрагмента або аналога або розчинного рецептора, здатного до зв'язування з мішенню. "Зв'язувальна сполука" також може стосуватися комплексу молекул, наприклад нековалентного комплексу, іонізованої молекули і ковалентно або нековалентно модифікованої молекули, наприклад модифікованої за допомогою фосфорилування, ацилювання, перехресного зшивання, циклізації або обмеженого розщеплення, яка здатна зв'язуватися з мішенню. З застосуванням відносно антитіл, термін "зв'язувальна сполука" стосується як антитіла, так і його антигензв'язувальних фрагментів. "Зв'язування" стосується асоціації зв'язувальної композиції з мішенню, коли асоціація приводить до зменшення нормального броунівського руху зв'язувальної композиції у випадках, коли зв'язувальна композиція може бути розчинена або суспендована в розчині. "Зв'язувальна композиція" стосується молекули, наприклад зв'язувальної сполуки, в комбінації зі стабілізатором, ексципієнтом, сіллю, буфером, розчинником або добавкою, здатною до зв'язування з мішенню.

[0053] Як використовується в даному документі, "консервативно модифіковані варіанти" або "консервативне заміщення" стосується заміщень амінокислот, які відомі кваліфікованим фахівцям в даній галузі і часто можуть бути зроблені навіть в суттєвих областях антитіла без зміни біологічної активності одержаного в результаті антитіла. Дані ілюстративні заміщення переважно зроблені відповідно до заміщень, викладених в Таблиці 1 наступним чином.

Таблиця 1

Ілюстративні консервативні заміщення амінокислот

Первинний залишок	Консервативне заміщення
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe

Первинний залишок	Консервативне заміщення
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

[0054] Кваліфіковані фахівці в даній галузі знають, що звичайно заміщення одиничних амінокислот в несуттєвих ділянках поліпептиду не можуть по суті змінювати біологічну активність. Див., наприклад, Watson et al. (1987), *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Edition).

[0055] Фраза "складається по суті з", або варіанти, такі як "складаються по суті з" або "які складаються по суті з", як використовується протягом опису і формули винаходу, вказує на включення яких-небудь перерахованих елементів або груп елементів і необов'язкове включення інших елементів, схожої або різної природи, що і перераховані елементи, які суттєво не змінюють основні або нові властивості зазначеної схеми лікування, способу або композиції. Як необмежувальний приклад, зв'язувальна сполука, яка складається по суті з перерахованої амінокислотної послідовності, також може включати одну або більше амінокислот, включаючи заміщення одного або більше амінокислотних залишків, які суттєво не впливають на властивості зв'язувальної сполуки.

[0056] "Імунний патологічний стан" або "імунне порушення" охоплює, наприклад, патологічне запалення, запальне порушення і аутоімунне порушення або захворювання. "Імунний патологічний стан" також стосується інфекцій, персистуючих інфекцій і проліферативних патологічних станів, таких як рак, пухлини і ангіогенез, включаючи інфекції, пухлини і види раку, які чинять опір ерадикації імунною системою. "Раковий стан" включає, наприклад, рак, ракові клітини, пухлини, ангіогенез і передракові стани, такі як дисплазія.

[0057] "Проліферативна активність" охоплює активність, яка сприяє, тобто є необхідною, або яка специфічно пов'язана, наприклад, з нормальним розподілом клітин, а також з раком, пухлинами, дисплазією, трансформацією клітин, метастазуванням і ангіогенезом.

[0058] Терміни "рак", "пухлина", "раковий" і "злоякісний" стосуються або описують фізіологічний стан у ссавців, який звичайно характеризується нерегульованим клітинним ростом. Приклади раку включають, але без обмеження, карциному, включаючи аденокарциному, лімфому, бластоми, меланому, саркому і лейкоз. Більш конкретні приклади даних видів раку включають плоскоклітинний рак, дрібноклітинний рак легені, недрібноклітинний рак легені, гастроінтестинальний рак, ходжкінську і неходжкінську лімфому, рак підшлункової залози, гліобластоми, гліому, рак шийки матки, рак яєчників, рак печінки, такий як карцинома печінки і гепатома, рак жовчного міхура, рак молочної залози, рак товстої кишки, колоректальний рак, рак ендометрія, мієломи (таку як множинна мієлома), рак слинної залози, рак нирок, такий як нирковоклітинний рак і пухлина Вільмса, базальноклітинний рак, меланому, рак простати, рак вульви, рак щитовидної залози, рак яєчка, рак стравоходу і різні типи раку голови і шиї.

[0059] Оскільки ракові клітини ростуть і множаться, вони формують масив ракової тканини, тобто пухлину, яка проростає і руйнує здорові прилеглі тканини. Злоякісні пухлини являють собою рак. Злоякісні пухлини звичайно можна видалити, але вони можуть вирости знову. Клітини із злоякісних пухлин можуть проростати і уражати сусідні тканини і органи. Також ракові клітини можуть відділятися від злоякісної пухлини і потрапляти в кровотік або лімфатичну систему, які є шляхом поширення ракових клітин з первинних пухлин (тобто первинний рак) для формування нових пухлин в інших органах. Поширення раку в організмі називається метастазуванням (What You Need to Know About Cancer-an Overview, NIH Publication No. 00-1566; posted Sept. 26, 2000, updated Sept. 16, 2002 (2002)).

[0060] Як використовується в даному документі, термін "солідна пухлина" стосується патологічного росту або масиву тканини, який звичайно не містить кіст або рідинних зон. Солідні пухлини можуть бути доброякісними (нераковими) або злоякісними (раковими). Різні типи солідних пухлин називають по типу клітин, які їх утворюють. Прикладами солідних пухлин є саркоми, карциноми і лімфоми. Лейкози (рак крові) загалом не утворюють солідні пухлини (National Cancer Institute, Dictionary of Cancer Terms).

[0061] "Пухлинне навантаження", також зване "пухлинна маса", стосується загальної кількості пухлинного матеріалу, поширеного по всьому організму. Пухлинне навантаження належить до загальної кількості ракових клітин або загального розміру пухлини (пухлин) у всьому організмі, включаючи лімфатичні вузли і кістковий мозок. Пухлинне навантаження можна визначити за допомогою ряду способів, відомих в галузі винаходу, таких як, наприклад, за допомогою вимірювання розмірів пухлини (пухлин) після витягання з хворого, наприклад із застосуванням циркулів, або в організмі із застосуванням методів візуалізації, наприклад

ультразвукового, сцинтиграфії кісток скелета, комп'ютерної томографії (СТ) або сканування за допомогою магнітної резонансної томографії (MRI).

[0062] Термін "розмір пухлини" стосується загального розміру пухлини, який можна виміряти у вигляді довжини і ширини пухлини. Розмір пухлини можна визначити за допомогою ряду способів, відомих в галузі винаходу, таких як, наприклад, за допомогою вимірювання розмірів пухлини (пухлин) після витягання з хворого, наприклад із застосуванням циркулів, або в організмі із застосуванням методів візуалізації, наприклад сцинтиграфії кісток скелета, ультразвукового, СТ- або MRI-сканування.

[0063] Як використовується в даному документі, термін "первинний рак" стосується вихідної пухлини або першої пухлини. Рак може починатися в будь-якому органі або тканині організму. Його звичайно називають по частині тіла або типу клітин, з яких він походить (Metastatic Cancer: Questions and Answers, Cancer Facts 6.20, National Cancer Institute, reviewed Sept. 1, 2004 (2004)).

[0064] Як використовується в даному документі, термін "карцинома in situ" стосується ракових клітин, які все ще знаходяться в межах тканини, де вони почали рости, і ще не стали інвазивними або поширюватися по інших частинах організму.

[0065] Як використовується в даному документі, термін "карциноми" стосується різновидів раку епітеліальних клітин, які являють собою клітини, що покривають поверхню тіла, продукують гормони і складають залози. Прикладами карцином є рак шкіри, легені, ободової кишки, шлунка, молочних залоз, простати і щитовидної залози.

[0066] Як використовується в даному документі, термін "молекула ізольованої нуклеїнової кислоти" стосується молекули нуклеїнової кислоти, яку ідентифікують і відділяють щонайменше від молекули однієї контамінантної нуклеїнової кислоти, з якою вона звичайно асоційована в природному джерелі нуклеїнових кислот антитіл. Виділена молекула нуклеїнової кислоти відрізняється за формою або характеристиками, з якими її виявляють в природі. Виділені молекули нуклеїнової кислоти внаслідок цього відрізняються від молекули нуклеїнової кислоти, як вона існує в природних клітинах. Однак, виділена молекула нуклеїнової кислоти включає молекулу нуклеїнової кислоти, що міститься в клітинах, які звичайно експресують антитіло, де, наприклад, молекула нуклеїнової кислоти знаходиться в хромосомному розташуванні, відмінному від розташування в природних клітинах.

[0067] Вираз "контрольні послідовності" стосується послідовностей ДНК, необхідних для експресії функціонально зв'язаної кодуєчої послідовності в конкретному організмі-хазяїні. Контрольні послідовності, які є придатними для прокаріотів, наприклад, включають промотор, необов'язково операторну послідовність і ділянку зв'язування рибосоми. Відомо, що еукаріотичні клітини використовують промотори, сигнали поліаденілювання і енхансери.

[0068] Нуклеїнова кислота є "функціонально зв'язаною", коли її вводять в функціональну взаємодію з ще однією послідовністю нуклеїнової кислоти. Наприклад, ДНК для передпослідовності або секреторного лідера функціонально зв'язують з ДНК для поліпептиду, якщо він експресується як білок-попередник, який бере участь в секреції поліпептиду; промотор або енхансер є функціонально зв'язаним з кодуєчою послідовністю, якщо він здійснює вплив на транскрипцію послідовності; або ділянка зв'язування рибосоми є функціонально зв'язаною з кодуєчою послідовністю, якщо вона розташована таким чином, щоб полегшити трансляцію. Загалом, "функціонально зв'язані" означає, що послідовності ДНК будучи зв'язаними є такими, що перекриваються, і, у випадку секреторного лідера, такими, що перекриваються і в фазі зчитування. Однак енхансери не повинні бути такими, що перекриваються. Зв'язування завершується лігуванням по зручних рестрикційних сайтах. Якщо такі сайти не існують, застосовують синтетичні олігонуклеотидні адаптори або лінкери, відповідно до загальноприйнятої практики.

[0069] Як використовується в даному документі, вирази "клітина", "клітинна лінія" і "клітинна культура" використовуються взаємозамінно, і всі подібні позначення включають потомство. Таким чином, слова "трансформанти" і "трансформовані клітини" включають первинну клітину хворого і одержані з неї культури безвідносно кількості перенесень. Також зрозуміло, що все потомство не може бути точно ідентичним по вмісту ДНК, внаслідок навмисних або ненавмисних мутацій. Включене мутантне потомство, яке має таку ж функцію або біологічну активність, яка скринувана в початково трансформованій клітині. Коли передбачаються різні позначення, буде ясно з контексту.

[0070] Як використовується в даному документі, "полімеразна ланцюгова реакція" або "ПЛР" стосується процедури або методики, в якій ампліфікують незначні кількості конкретної частини нуклеїнової кислоти, РНК і/або ДНК, як описано, наприклад, в Патенті США № 4683195. Загалом, необхідно, щоб була доступна інформація про послідовність з кінців області, що

представляє інтерес, або за межами таким чином, щоб могли бути одержані олігонуклеотидні праймери; послідовність даних праймерів буде ідентичною або аналогічною протилежним ниткам матриці, що підлягає ампліфікації. Нуклеотиди 5'-кінців двох праймерів можуть співпадати з кінцями ампліфікованого матеріалу. ПЛР можна застосовувати для ампліфікації специфічної послідовності РНК, специфічної послідовності ДНК із загальної геномної ДНК і кДНК, зчитаної із загальної клітинної РНК, послідовностей бактеріофагів або плазмід і т. д. див. загалом Mullis et al. (1987), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich, ed. (1989), PCR Technology (Material Press, N.Y.) Як використовується в даному документі, вважається, що ПЛР є одним, але не єдиним прикладом методу полімеразної реакції нуклеїнової кислоти для ампліфікування тестового зразка нуклеїнової кислоти, що включає застосування як праймера відомої нуклеїнової кислоти і полімерази нуклеїнової кислоти для ампліфікації або генерування конкретної частини нуклеїнової кислоти.

[0071] Як використовується в даному документі, термін "зародкова послідовність" стосується послідовності з неперебудованих послідовностей ДНК імуноглобуліну, включаючи гризунів (наприклад, мишачих) і людські зародкові послідовності. Можна застосовувати будь-яке придатне джерело неперебудованої ДНК імуноглобуліну. Людські зародкові послідовності можна одержувати, наприклад, із зародкових баз даних JOINSOLVER® на веб-сайті державного інституту артритних і скелетно-м'язових і шкірних захворювань з національних інститутів охорони здоров'я США. Зародкові послідовності мишей можна одержати, наприклад, як описано у Giudicelli et al. (2005), Nucleic. Acids. Res. 33:D256-D261.

[0072] Для дослідження ступеня посилення, наприклад активності GTR, зразки або аналізи, що містять заданий, наприклад, білок, ген, клітину або організм, обробляють потенційно активуючим або інгібуючим агентом і порівнюють з контрольними зразками, обробленими неактивною контрольною молекулою. Контрольним зразкам надане відносне значення активності, що дорівнює 100 %. Інгібування досягається, коли рівень активності відносно контролю становить приблизно 90 % або менше, типово 85 % або менше, більш типово 80 % або менше, найбільш типово 75 % або менше, загалом 70 % або менше, більш часто 65 % або менше, найчастіше 60 % або менше, звичайно 55 % або менше, звичайно 50 % або менше, частіше 45 % або менше, найчастіше 40 % або менше, переважно 35 % або менше, більш переважно 30 % або менше, ще більш переважно 25 % або менше і найбільш переважно менше ніж 20 %. Активації досягають, коли рівень активності відносно контролю становить приблизно 110 %, звичайно щонайменше 120 %, більш часто щонайменше 140 %, більш часто щонайменше 160 %, часто щонайменше 180 %, більш часто щонайменше в 2 рази, найчастіше щонайменше в 2,5 рази, звичайно щонайменше в 5 разів, більш часто щонайменше в 10 разів, переважно щонайменше в 20 разів, більш переважно щонайменше в 40 разів і найбільш переважно більше ніж в 40 разів вище.

[0073] Кінцеві точки активації або інгібуння можна піддавати моніторингу наступним чином. Активацію, інгібуння і відповідь на лікування, наприклад, клітини, фізіологічного текучого середовища, тканини, органа і хворої тварини або людини можна піддати моніторингу за допомогою кінцевої точки. Кінцева точка може являти собою попередньо задане кількісне або процентне вираження, наприклад, ознаки запалення, онкогенності або дегрануляції або секреції клітин, такої як вивільнення цитокіну, токсичного кисню або протеази. Кінцева точка може являти собою, наприклад, попередньо задану величину потоку або перенесення іонів; міграції клітин; адгезії клітин; проліферації клітин; потенціалу метастазування; диференціювання клітин і зміни фенотипу, наприклад зміни експресії гена, пов'язаного із запаленням, апоптозом, трансформацією, клітинним циклом або метастазуванням (див., наприклад, Knight (2000), Ann. Clin. Lab. Sci. 30:145-158; Hood and Cheresch (2002), Nature Rev. Cancer. 2:91-100; Timme et al. (2003), Curr. Drug Targets 4:251-261; Robbins and Itzkowitz (2002), Med. Clin. North Am. 86:1467-1495; Grady and Markowitz (2002), Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 3:101-128; Bauer et al. (2001), Glia, 36:235-243; Stanimirovic and Satoh (2000), Brain Pathol. 10:113-126).

[0074] Кінцева точка інгібуння звичайно становить 75 % контролю або менше, переважно 50 % контролю або менше, більш переважно 25 % контролю або менше і найбільш переважно 10 % контролю або менше. Звичайно кінцева точка активації складає щонайменше 150 % контролю, переважно щонайменше в два рази більше контролю, більш переважно щонайменше в чотири рази більше контролю, а найбільш переважно щонайменше в 10 разів більше контролю.

[0075] "Мікромолекулу" визначають як молекулу з молекулярною масою, яка складає менше ніж 10 кДа, звичайно менше ніж 2 кДа і переважно менше ніж 1 кДа. Мікромолекули включають, але без обмеження, неорганічні молекули, органічні молекули, органічні молекули, що містять

неорганічний компонент, молекули, що включають радіоактивний атом, синтетичні молекули, пептидоміметики і міметики антитіл. Як терапевтична речовина, мікромолекула може бути більш прохідна в клітини, менш схильна до розпаду і менш схильна до одержання імунної відповіді, ніж великі молекули. Описані мікромолекули, такі як пептидоміметики антитіл і цитокінів, а також

5 мікромолекулярні токсини. Див., наприклад, Casset et al. (2003), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307:198-205; Muyltermans (2001), *J. Biotechnol.* 74:277-302; Li (2000), *Nat. Biotechnol.* 18:1251-1256; Apostolopoulos et al. (2002), *Curr. Med. Chem.* 9:411-420; Monfardini et al. (2002), *Curr. Pharm. Des.* 8:2185-2199; Domingues et al. (1999), *Nat. Struct. Biol.* 6:652-656; Sato and Sone (2003), *Biochem. J.* 371:603-608; патент США № 6326482.

10 [0076] "Специфічно" або "селективно" зв'язує, при посиланні на ліганд/рецептор, антитіло/антиген або іншу пару, що зв'язується, вказує на реакцію зв'язування, яка є вирішальним фактором присутності білка в гетерогенній популяції білків і інших біологічних речовин. Таким чином, у відзначених умовах, вказаний ліганд зв'язується з конкретним

15 рецептором і не зв'язується в значній кількості з іншими білками, присутніми в зразку. Як використовується в даному документі, вказується, що антитіло специфічно зв'язується з поліпептидом, що містить дану послідовність (в цьому випадку G1TR), якщо воно зв'язується з поліпептидами, що включають послідовність G1TR, але не зв'язується з білками, що не мають послідовності G1TR. Наприклад, антитіло, яке специфічно зв'язується з поліпептидом, що

20 включає G1TR, може зв'язуватися з міченою FLAG® формою G1TR, але не буде зв'язуватися з іншими міченими FLAG® білками.

[0077] Термін "епітоп" або "антигенна детермінанта" стосується ділянки на антигені, з якою специфічно зв'язується зв'язувальна молекула. Епітопи можуть бути утворені як із замісних амінокислот, так і з незамінних амінокислот, помісних поруч за рахунок третинної структури білка. Епітопи, сформовані із замісних амінокислот, звичайно зберігаються, піддаючись впливу денатуруючих розчинників, тоді як епітопи, утворені третинною структурою, звичайно втрачаються при впливі денатуруючих розчинників. Епітоп звичайно містить щонайменше 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або 15 амінокислот в унікальній просторовій конформації. Способи визначення просторової конформації епітопів включають, наприклад, рентгеноструктурну кристалографію і 2-вимірний ядерно-магнітний резонанс.

30 [0078] Зв'язувальні молекули, які розпізнають один і той же епітоп, можна ідентифікувати в простому імунологічному аналізі, який демонструє здатність одного антитіла блокувати зв'язування іншого антитіла з антигеном-мішенню, тобто в аналізі конкурентного зв'язування. Конкурентне зв'язування визначають в аналізі, в якому тестована зв'язувальна молекула інгібує специфічне зв'язування контрольної зв'язувальної молекули із загальним антигеном, таким як G1TR. Відомий ряд типів аналізу конкурентного зв'язування, наприклад твердофазний прямий або непрямий радіоімуноаналіз (RIA); твердофазний прямий або непрямий ферментний імуноаналіз (EIA); конкурентний сендвіч-аналіз (див. Stahli et al. (1983), *Methods in Enzymology*, 9:242); твердофазний прямий EIA біотин-авідин (див. Kirkland et al. (1986), *J. Immunol.* 137:3614); твердофазний прямий мічений аналіз, твердофазний прямий мічений сендвіч-аналіз (див. Harlow and Lane (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press);

40 твердофазний прямий мічений RIA із застосуванням мітки I-¹²⁵ (див. Morel et al. (1988), *Mol. Immunol.* 25(1):7); твердофазний прямий біотин-авідин EIA (Cheung et al. (1990), *Virology* 176:546) і прямий мічений RIA (Moldenhauer et al. (1990), *Scand. J. Immunol.* 32:77).

[0079] Звичайно, даний аналіз включає застосування очищеного антигену, зв'язаного з твердою поверхнею або клітинами, що несуть будь-який з них, неміченої тестованої зв'язувальної молекули і міченої контрольної зв'язувальної молекули. Конкурентне інгібування вимірюють за допомогою визначення кількості мітки, зв'язаної з твердою поверхнею або клітинами в присутності тестованої зв'язувальної молекули.

[0080] Звичайно тестована зв'язувальна молекула присутня в надлишку. Звичайно, якщо конкуруюча зв'язувальна молекула присутня в надлишку, вона буде інгібувати специфічне зв'язування контрольної зв'язувальної молекули із загальним антигеном щонайменше на 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 %, 70-75 % або більше.

[0081] Антитіло, або зв'язувальна композиція, одержана з антигензв'язувальної ділянки антитіла способу, що розглядається, зв'язується зі своїм антигеном з афінністю, яка щонайменше в два рази більше, переважно щонайменше в десять разів більше, більш переважно щонайменше в 20 разів більше і найбільш переважно щонайменше в 100 разів більше, ніж афінність з незв'язаними антигенами. У переважному варіанті здійснення антитіло буде мати афінність, яка складає більше ніж приблизно 10⁹ літрів/моль, як визначено, наприклад, за допомогою аналізу Скетчарда. Munsen et al. (1980), *Analyt. Biochem.* 107:220-239.

60 II. Загальні положення

[0082] Даний винахід надає способи лікування пухлин на пізній стадії комбінацією агоністів G1TR і антагоністів PD-1, включаючи анти-G1TR і анти-PD-1 або анти-PD-L1 антитіла.

III. Фармацевтичні композиції

[0083] Для приготування фармацевтичних або стерильних композицій, антитіла G1TR, PD-1 або PD-L1 змішують з фармацевтично прийнятним носієм або ексципієнтом. Див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences і U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984).

[0084] Лікарські форми терапевтичних і діагностичних агентів можуть бути приготовані за допомогою змішування з фізіологічно прийнятними носіями, ексципієнтами або стабілізаторами у формі, наприклад, ліофілізованих порошків, кашок, водних розчинів або суспензій. Див., наприклад, Hardman et al. (2001), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000), Remington: The Science і Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams and Wilkins, New York, NY; Avis et al. (eds.) (1993), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman et al. (eds.) (1990), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman et al. (eds.) (1990), Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000), Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NY.

[0085] Токсичність і терапевтичну ефективність композицій антитіл, що вводяться окремо або в комбінації з імуносупресивним агентом, можна визначити за допомогою стандартних фармацевтичних процедур в клітинних культурах або експериментальних тваринах, наприклад, для визначення LD₅₀ (дози, летальної для 50 % популяції) і ED₅₀ (дози, терапевтично ефективною у 50 % популяції). Співвідношення дози між токсичним і терапевтичним ефектами являє собою терапевтичний індекс і може бути виражене як співвідношення LD₅₀ і ED₅₀. Переважними є антитіла, що демонструють високі терапевтичні індекси. Дані, одержані з аналізів клітинних культур і вивчення тварин, можна застосовувати для складання діапазону доз для застосування у людини. Переважно, щоб дозування даних сполук знаходилося в межах діапазону циркулюючих концентрацій, які включають ED₅₀ з невеликою токсичністю або її відсутністю. Дозування може варіювати в межах даного діапазону залежно від використовуваної форми випуску і шляху введення.

[0086] Спосіб введення не є особливо важливим. Придатні шляхи введення можуть включати, наприклад, пероральне, ректальне, черезслизове або інтестинальне введення; парентеральну доставку, включаючи внутрішньом'язові, підшкірні, інтремедулярні ін'єкції, а також інтратекальні, прямі інтравентрикулярні, внутрішньовенні, внутрішньоочеревинні, інтраназальні або внутрішньоочні ін'єкції. Введення антитіла, застосовуваного в фармацевтичній композиції або для практичної реалізації способу даного винаходу, можна здійснювати множиною загальноприйнятих способів, таких як пероральний прийом, інгаляція, місцеве нанесення або нашкірна, підшкірна, внутрішньоочеревинна, парентеральна, внутрішньоартеріальна або внутрішньовенна ін'єкція.

[0087] Почергово, можна вводити антитіло локальним, а не системним чином, наприклад, за допомогою ін'єкції антитіла безпосередньо в артритичний суглоб або викликане патогеном пошкодження, що характеризується імунопатологією, часто в лікарській формі пролонгованої дії або тривалого вивільнення. Крім того, можна вводити антитіло в системі доставки направленою лікарського засобу, наприклад в ліпосомі, покритій тканиноспецифічним антитілом, що виділяє, наприклад, артритичний суглоб або викликане патогеном пошкодження, яке характеризується імунопатологією. Ліпосоми будуть направлятися і селективно поглинатися пошкодженою тканиною.

[0088] Вибір схеми введення ліків залежить від декількох факторів, включаючи метаболізм сироватки або тканини суб'єкта, рівень симптомів, імуногенність суб'єкта і доступність клітин-мішеней в біологічній матриці. Переважно, схема введення робить максимальною кількість ліків, що доставляється пацієнту, узгоджену з прийнятним рівнем побічних ефектів. Відповідно, кількість біологічного препарату, що доставляється, частково залежить від конкретного суб'єкта і тяжкості патологічного стану, що піддається лікуванню. Доступне керівництво при виборі придатних доз антитіл, цитокінів і мікромолекул. Див., наприклад, Wawrzynczak (1996), Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd., Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991), Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993), Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, NY; Baert et al. (2003), New Engl. J. Med. 348:601-608; Milgrom et al. (1999), New Engl. J. Med. 341:1966-1973; Slamon et al. (2001), New Engl. J. Med. 344:783-792; Beniaminovitz et al. (2000), New Engl. J. Med. 342:613-619; Ghosh et al. (2003), New Engl. J. Med. 348:24-32; Lipsky et al. (2000), New Engl. J. Med. 343:1594-1602.

[0089] Визначення придатної дози виконується лікарем-клініцистом, наприклад, із застосуванням параметрів або факторів, відомих або передбачуваних в галузі винаходу для впливу на лікування або прогнозованого впливу на лікування. Звичайно доза починається з кількості, небагато меншої, ніж оптимальна доза, і після цього вона підвищується з невеликими приростами доти, поки не буде досягнутий необхідний або оптимальний ефект відносно яких-небудь негативних побічних ефектів. Важливі діагностичні заходи включають вимірювання симптомів, наприклад запалення або рівня продукуваних запальних цитокінів. Переважно, щоб біологічний препарат, який буде використаний, був одержаний по суті від того ж самого виду, що і тварина, намічена для лікування (наприклад, гуманізоване антитіло для лікування хворих людей), мінімізуючи тим самим яку-небудь імунну відповідь на реагент.

[0090] Антитіла і фрагменти антитіл можуть надаватися за допомогою безперервної інфузії або за допомогою доз з інтервалами, наприклад, один день, 1-7 разів на тиждень, один тиждень, два тижні, щомісяця, два рази на місяць і т. д. Дози можуть надаватися внутрішньовенно, підшкірно, місцево, перорально, назально, ректально, внутрішньом'язово, інтрацеребрально, інтраспінально або за допомогою інгаляції. Переважним протоколом введення ліків дозами є протокол, що задіює максимальну дозу або частоту введення доз, який уникає значних небажаних побічних ефектів. Загальна щотижнева доза звичайно складає щонайменше 0,05 мкг/кг, 0,2 мкг/кг, 0,5 мкг/кг, 1 мкг/кг, 10 мкг/кг, 100 мкг/кг, 0,2 мг/кг, 1,0 мг/кг, 2,0 мг/кг, 10 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг маси тіла або більше. Див., наприклад, Yang et al. (2003), New Engl. J. Med. 349:427-434; Herold et al. (2002), New Engl. J. Med. 346:1692-1698; Liu et al. (1999), J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67:451-456; Portielji et al. (20003), Cancer. Immunol. Immunother. 52:133-144. Необхідна доза мікромолекулярного терапевтичного засобу, наприклад пептидоміметика, натурального продукту або органічного хімічного засобу, є приблизно такою ж, як для антитіла або поліпептиду, на основі моль/кг.

[0091] Способи спільного введення або лікування другим терапевтичним агентом, наприклад цитокіном, антитілом, стероїдом, хіміотерапевтичним агентом, антибіотиком, противірусним препаратом або опроміненням, добре відомі в галузі винаходу, див., наприклад, Hardman et al. (eds.) (2001), Goodman and Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York, NY; Poole and Peterson (eds.) (2001), Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner and Longo (eds.) (2001), Cancer. Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA. Конкретно, введення PD-1 або PD-L1 антитіл може відбуватися одночасно або послідовно. У конкретних варіантах здійснення анти-GITR антитіло можна вводити першим з подальшим періодичним (наприклад, через один тиждень або щотижня) введенням доз анти-PD-1 або анти-PD-L1 антитіл. Як альтернатива, за лікуванням анти-PD-1 або PD-L1 антитілами може іти лікування анти-GITR антитілами з аналогічним графіком. У додаткових варіантах здійснення анти-GITR антитіла вводять спільно з анти-PD-1 або анти-PD-L1 в щонайменше єдиний або множинних дозах лікування (наприклад, введення щотижня).

[0092] Антитіла GITR, PD-1 або PD-L1 можна комбінувати з хіміотерапевтичними агентами, включаючи алкілувальні агенти, такі як тіотепа і циклофосфамід CYTOXAN®; алкілсульфонати, такі як бусульфан, імпросульфан і піпосульфан; азиридины, такі як бензодопа, карбоквон, метуредопа і уредопа; етиленіміни і метиламеламіни, включаючи альтретамін, триетиленемеламін, триетиленіфосфорамід, триетилентіофосфорамід і триметилломеламін; ацетогеніни (особливо булатацин і булатацинон); камптотецин (включаючи синтетичний аналог топотекан); бріостатин; калістатин; CC-1065 (включаючи його синтетичні аналоги адозелезин, карцелезин і бізелезин); криптофіцини (зокрема криптофіцин 1 і криптофіцин 8); доластатин; дуокарміцин (включаючи синтетичні аналоги, KW-2189 і CB1-TM1); елеутеробін; панкреатистатин; саркодиктин; спонгістатин; азотистий іприт, такий як хлоамбуцил, хлорнафазин, холофосфамід, естрамустин, іфосфамід, мехлоретамін, мехлоретаміноксидгідрохлорид, мелфалан, новембіхін, фенестерин, преднімустин, трофосфамід, урацилмустин; нітрозосечовини, такі як кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, німустин і ранімустин; антибіотики, такі як енедіїнові антибіотики (наприклад, каліхеаміцин, особливо каліхеаміцин гамма11 і каліхеаміцин омега11 (див., наприклад, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)); динеміцин, включаючи динеміцин А; біфосфонати, такі як хлордронат; еспераміцин; також неокарцинонстатин хромофор і споріднені хромопротейнові енедіїнові антибіотичні хромофори), аклациноміцини, актиноміцин, аутраміцин, азасерин, блеоміцини, кактиноміцин, карабіцин, каміноміцин, карцинофілін, хромоміцин, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубіцин ADRIAMYCIN® (включаючи морфолінодоксорубіцин, ціаноморфолінодоксорубіцин, 2-піролінодоксорубіцин і деоксидоксорубіцин), епірубіцин, ізорубіцин, ідарубіцин, марцеломіцин, мітоміцини, такі як

мітоміцин С, мікофенолова кислота, ногаламіцин, оливоміцини, пепломіцин, портфіроміцин, пуроміцин, квеламіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидин, убенімекс, циностатин, зорубіцин; антиметаболіти, такі як метотрексат і 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолієвої кислоти, такі як деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; пуринові аналоги, такі як флударабін, 6-меркаптопурин, тіаміприн, тіогуанін; піримідинові аналоги, такі як анцитабін, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, кутарабін, дидеооксиуридин, доксифлуридин, еноцитабін, флоксуридин; андрогени, такі як калустерон, дромостанолону пропіонат, епітіостанол, мепітіостан, тестостерон; засоби, пригнічуючі функції надниркових залоз, такі як аміноглютетимід, мітотан, трилостан; компенсатори фолієвої кислоти, такі як фролінова кислота; ацеглатон; алдофосфаміду глікозид; амінолевулінова кислота; енілурацил; амсакрин; бестрабуцил; бісантрен; едотраксат; дефотамін; демеколцин; діазикон; елфорнітин; еліптініуму ацетат; епотилон; етоглуцид; нітрат галію; гідроксисечовина; лентинан; лонідаїнін; майтанзиноїди, такі як майтанзин і анзаміцини; мітогуазон; мітоксантрон; мопіданмол; нітраерин; пентостатин; фенамет; пірарубіцин; лозоксантрон; подофілінова кислота; 2-етилгідразид; прокарбазин; PSK® полісахаридний комплекс (компанії JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); разоксан; ризоксин; сизофуран; спірогерманій; теназонова кислота; триазикон; 2,2',2"-трихлортриетиламін; трихотецени (особливо Т-2 токсин, веракурин А, роридин А і ангуїдин); уретан; віндезин; дакарбазин; маномустин; мітобронітол; мітолактон; піпоброман; гацитозин; арабінозид (Ара-С); циклофосфамід; тіотепа; таксоїди, наприклад паклітаксел (TAXOL®) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), паклітаксел у формі наночастинок, зв'язаних з альбуміном, що не містить кремофор (ABRAXANE™), (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.), і доксетаксел (TAXOTERE®) (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); хлорамбуцил; гемцитабін GEMZAR®; 6-тіогуанін; меркаптопурин; метотрексат; платинові аналоги, такі як цисплатин і карбоплатин; вінбластин; платин; етопозид (VP-16); іфосфамід; мітоксантрон; вінкрестин; вінорелбін (NAVELBINE®); новантрон; теніпозид; едотраксат; дауноміцин; аміноптерин; капецитабін XELODA®; ібандронат; СРТ-11; інгібітор топоізомерази RFS2000; дифторметилорнітин (DMFO); ретиноїди, такі як ретиноева кислота; і фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-якого з перерахованих вище.

[0093] Також включені антигормональні агенти, які діють, регулюючи або інгібуючи дію гормонів на пухлини, такі як антиестрогени і селективні модулятори естрогенових рецепторів (SERM), що включають, наприклад, тамоксифен (включаючи тамоксифен NOLVADEX®), ралоксифен, дролоксифен, 4-гідрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон і тореміфен (FARESTON); інгібітори ароматази, які інгібують фермент ароматазу, що регулює вироблення естрогену в надниркових залозах, такі як, наприклад, 4(5)-імідазоли, аміноглютетимід, мегестролу ацетат (MEGASE®), екземестан (AROMASIN®), форместан, фадрозол, ворозол (RIVIZOR®), летрозол (FEMARA®) і анастрозол (ARIMIDEX®), і антиандрогени, такі як флутамід, нілутамід; бікалутамід; леупролід і гозерелін; а так само троксацитабін (1,3-діоксоланнуклеозид цитозинового аналогу); антисмислові олігонулеотиди, особливо ті, які інгібують експресію генів сигнальних шляхів, залучених в аберантну проліферацію клітин, таких як, наприклад, PKC-альфа, Raf, H-Ras; рибозими, такі як інгібітор експресії VEGF (наприклад, рибозим ANGIOZYME®) і інгібітор експресії HER2; вакцини, такі як генно-терапевтичні вакцини, наприклад вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® і вакцина VAXID®; інгібітор топоізомерази I PROLEUKIN® rIL-2; LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; і фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-якої з вищеперелічених сполук.

[0094] Комбіновану терапію використовують для лікування пухлини на останній стадії, яка має розміри, що складають щонайменше приблизно 175 мм³. У іншому варіанті здійснення винаходу, комбіновану терапію використовують для лікування пухлини, яка складає щонайменше приблизно 200 мм³, 300 мм³, 400 мм³, 500 мм³, 750 мм³, аж до 1000 мм³. Комбіновану терапію винаходу використовують для лікування пухлини, яка є достатньо великою для виявлення за допомогою пальпації або за допомогою методів візуалізації, добре відомих в галузі винаходу, таких як MRI, ультразвукове або CAT сканування.

[0095] "Синергетичним ефектом" двох сполук є ефект, при якому дія комбінації двох агентів більше, ніж сума їх окремих ефектів, і статистично відрізняється від контролю і окремих лікарських засобів. У іншому варіанті здійснення комбінаційна терапія винаходу має додатковий ефект. "Додатковим ефектом" двох сполук є ефект, при якому дія комбінації двох агентів є сумою їх окремих ефектів і статистично відрізняється від контролю і/або окремих лікарських засобів.

[0096] Способи, що розглядаються, приводять до зниження розміру пухлини більше ніж приблизно на 10 %, більше ніж приблизно на 20 %, більше ніж приблизно на 30 %, більше ніж

приблизно на 35 %, більше ніж приблизно на 42 %, більше ніж приблизно на 43 %, більше ніж приблизно на 44 %, більше ніж приблизно на 45 %, більше ніж приблизно на 46 %, більше ніж приблизно на 47 %, більше ніж приблизно на 48 %, більше ніж приблизно на 49 %, більше ніж приблизно на 50 %, більше ніж приблизно на 51 %, більше ніж приблизно на 52 %, більше ніж приблизно на 53 %, більше ніж приблизно на 54 %, більше ніж приблизно на 55 %, більше ніж приблизно на 56 %, більше ніж приблизно на 57 %, більше ніж приблизно на 58 %, більше ніж приблизно на 59 %, більше ніж приблизно на 60 %, більше ніж приблизно на 65 %, більше ніж приблизно на 70 %, більше ніж приблизно на 75 %, більше ніж приблизно на 80 %, більше ніж приблизно на 85 %, більше ніж приблизно на 90 %, більше ніж приблизно на 95 % або більше ніж приблизно на 100 %. У одному варіанті здійснення введення GITR-зв'язувальної молекули в поєднанні з молекулою антагоніста PD-1 може приводити до повної регресії пухлини на пізній стадії.

[0097] Також розглядається спільне введення комбінації агоніста GITR/антагоніста PD-1 з протівірусними терапевтичними засобами. Протівірусні препарати включають будь-який лікарський засіб, який руйнує віруси. Протівірусні препарати можуть містити інтерферони, які функціонують, інгібуючи реплікацію вірусу, інгібітори протеази і інгібітори зворотної транскриптази або агенти, що містяться в комбінації високоактивної антиретровірусної терапії (HAART) для ВІЛ.

[0098] Звичайні ветеринарні, експериментальні або дослідницькі об'єкти включають мавп, собак, кішок, щурів, мишей, кроликів, морських свинок, коней і людей.

IV. Варіанти застосування

Рак

[0099] Антитіла або антигензв'язувальні фрагменти GITR, PD-1 або PD-L1 можна застосовувати для лікування раку (тобто для інгібування росту або життєздатності клітин пухлини). Переважні різновиди раку, ріст яких може бути уповільнений із застосуванням антитіл винаходу, включають різновиди раку, звичайно реагуючі на імунотерапію, але також різновиди раку, які до цього часу не були пов'язані з імунотерапією. Необмежувальні приклади переважних різновидів раку для лікування включають меланому (наприклад, метастатичні злоякісні меланоми), рак нирки (наприклад, світлоклітинний рак), рак простати (наприклад, гормонорезистентна аденокарцинома передміхурової залози), аденокарцинома підшлункової залози, рак молочної залози, рак товстої кишки, рак легені (наприклад, недрібноклітинний рак легені), рак стравоходу, плоскоклітинна карцинома голови і шиї, рак печінки, рак яєчників, рак шийки матки, рак щитовидної залози, гліобластома, гліома, лейкоз, лімфома і інші злоякісні новоутворення. Додатково, винахід включає рефракторні або рецидивуючі злоякісні новоутворення, ріст яких може бути уповільнений із застосуванням антитіл винаходу.

[0100] Антитіла-агоністи GITR/антагоністи PD-1 або антигензв'язувальні фрагменти можна застосовувати окремо або в комбінації з: іншими протипухлинними засобами або імунотерапевтичними засобами (наприклад, які ослаблюють ракові клітини), пухлинними антигенами (включаючи рекомбінантні білки, пептиди і вуглеводні молекули), антигенпрезентуючими клітинами, такими як дендритні клітини, активовані одержаним з пухлини антигеном або нуклеїновими кислотами, імуностимулюючими цитокінами (наприклад, IL-2, IFN α 2, GM-CSF) і клітинами, трансфікованими генами, кодуєчими імуностимулюючі цитокіни, такі як, але без обмеження, GM-CSF; стандартними способами лікування раку (наприклад, хіміотерапією, радіотерапією або хірургією) або іншими антитілами (включаючи, але без обмеження, антитіла до VEGF, EGFR, Her2/neu, рецепторів VEGF, рецепторів інших факторів росту, CD20, CD40, CTLA-4, OX-40, 4-1BB і ICOS).

Інфекційні захворювання

[0101] Комбінація агоніста GITR/антагоніста PD-1 також може бути використана для запобігання або лікування інфекцій і інфекційних захворювань. Комбінацію агоніста GITR/антагоніста PD-1 можна застосовувати окремо або в поєднанні з вакцинами для стимулювання імунної відповіді до патогенів, токсинів і власних антигенів. Антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти можна застосовувати для стимулювання імунної відповіді до вірусів, інфекційних для людей, таких як, але без обмеження, віруси імунodefіциту людини, віруси гепатиту класів A, B і C, вірус Епштейна-Барра, цитомегаловірус людини, віруси папіломи людини, віруси герпесу. Антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти можна застосовувати для стимулювання імунної відповіді на інфікування бактеріальними або грибовими паразитами і іншими патогенами.

Ад'юванти для вакцинації

[0102] Комбінацію антитіл або фрагментів антитіл-агоністів GITR/антагоністів PD-1 можна застосовувати в поєднанні з іншими рекомбінантними білками і/або пептидами (такими як

пухлинні антигени або ракові клітини) для того, щоб підвищувати імунну відповідь до даних білків (тобто в протоколі вакцинації).

[0103] Наприклад, антитіла-агоністи GITR/антагоністи PD-1 і фрагменти їх антитіл можна застосовувати для стимулювання антигенспецифічних імунних відповідей за рахунок спільного введення комбінації агоніста GITR/антагоніста PD-1 з антигеном, що представляє інтерес (наприклад, вакциною). Відповідно, в іншому аспекті винахід надає спосіб посилення імунної відповіді на антиген у пацієнта, який включає введення пацієнту: (i) антигену; і (ii) комбінації агоніста GITR/антагоніста PD-1, таким чином, щоб посилити у пацієнта імунну відповідь на антиген. Антигеном може бути, наприклад, пухлинний антиген, вірусний антиген, бактеріальний антиген або антиген від патогену.

Активация Т-клітин *ex vivo*

[0104] Антитіла і фрагменти антигенів винаходу також можна використовувати для активації *ex vivo* і нарізання антигенспецифічних Т-клітин і адаптивного перенесення даних клітин реципієнтам для того, щоб збільшувати кількість антигенспецифічних Т-клітин проти пухлини. Дані способи також можна використовувати для активації Т-клітинних відповідей до інфекційних агентів, таких як CMV. Можна очікувати, що активация *ex vivo* в присутності комбінації агоніста GITR/антагоніста PD-1 підвищить частоту і активність адаптивно переносимих Т-клітин.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1

Загальні способи

[0105] Описані стандартні способи в молекулярній біології. Maniatis et al. (1982), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook and Russell (2001), *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993), *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA. Стандартні способи також є у Ausbel et al. (2001), *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, який описує клонування в бактеріальних клітинах і мутагенез ДНК (Vol. 1), клонування в клітинах ссавців і дріжджів (Vol. 2), глікокон'югати і експресію білків (Vol. 3) і біоінформатику (Vol. 4).

[0106] Описані способи очищення білків, включаючи імунопреципітацію, хроматографію, електрофорез, центрифугування і кристалізацію (Coligan et al. (2000), *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York). Описаний хімічний аналіз, хімічні модифікації, посттрансляційні модифікації, одержання злитих білків, глікозилювання білків (див., наприклад, Coligan et al. (2000), *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel et al. (2001), *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16,0,5-16,22,17; Sigma-Aldrich, Co. (2001), *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001), *BioDirectory*, Piscataway, N.J., pp. 384-391). Описані одержання, очищення і фрагментація поліклональних і моноклональних антитіл (Coligan et al. (2001), *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999), *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow and Lane, вище). Доступні стандартні способи визначення характеристик взаємодій ліганд/рецептор (див., наприклад, Coligan et al. (2001), *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York).

[0107] Можуть бути одержані моноклональні, поліклональні і гуманізовані антитіла (див., наприклад, Sheperd and Dean (eds.) (2000), *Monoclonal Antibodies*, Oxford Univ. Press, New York, NY; Kontermann and Dubel (eds.) (2001), *Antibody Engineering*, Springer-Verlag, New York; Harlow and Lane (1988), *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 139-243; Carpenter et al. (2000), *J. Immunol.* 165:6205; He et al. (1998), *J. Immunol.* 160:1029; Tang et al. (1999), *J. Biol. Chem.* 274:27371-27378; Baca et al. (1997), *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684; Chothia et al. (1989), *Nature*, 342:877-883; Foote and Winter (1992), *J. Mol. Biol.* 224:487-499; U.S. Pat. No. 6,329,511).

[0108] Альтернативою гуманізації є застосування бібліотек людських антитіл на фагах або бібліотек людських антитіл у трансгенних мишей (Vaughan et al. (1996), *Nature Biotechnol.* 14:309-314; Barbas (1995), *Nature Medicine*, 1:837-839; Mendez et al. (1997), *Nature Genetics*, 15:146-156; Hoogenboom and Chames (2000), *Immunol. Today*, 21:371-377; Barbas et al. (2001), *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Kay et al. (1996), *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego, CA; de Bruin et al. (1999), *Nature Biotechnol.* 17:397-399).

[0109] Для одержання антитіл очищення антигену не є необхідним. Тварин можна імунізувати клітинами, які несуть антиген, що представляє інтерес. Потім у імунізованих тварин можна виділити спленоцити, а для одержання гібридами спленоцити можна зливати з

мієломною клітинною лінією (див., наприклад, Meyaard et al. (1997), *Immunity*, 7:283-290; Wright et al. (2000), *Immunity*, 13:233-242; Preston et al., вище; Kaithamana et al. (1999), *J. Immunol.* 163:5157-5164).

[0110] Антитіла можуть бути кон'юговані, наприклад, з мікромолекулами лікарського засобу, ферментами, ліпосомами, поліетиленгліколем (PEG). Антитіла придатні для терапевтичних, діагностичних наборів або інших цілей і включають антитіла, сполучені, наприклад, з барвниками, радіоізотопами, ферментами або металами, наприклад колоїдним золотом (див., наприклад, Le Doussal et al. (1991), *J. Immunol.* 146:169-175; Gibellini et al. (1998), *J. Immunol.* 160:3891-3898; Hsing and Bishop (1999), *J. Immunol.* 162:2804-2811; Everts et al. (2002), *J. Immunol.* 168:883-889).

[0111] Доступні методи проточної цитометрії, включаючи системи виявлення сортування флуоресцентно-активованих клітин (FACS®) (1994), *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken N.J.; Givan (2001), *Flow Cytometry*, 2nd ed.; Wiley-Liss, Hoboken N.J.; Shapiro (2003), *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken N.J. Доступні флуоресцентні реагенти, придатні для модифікації нуклеїнових кислот, включаючи праймери і зонди для нуклеїнових кислот, поліпептиди і антитіла для застосування, наприклад, як діагностичних реагентів. *Molecular Probes* (2003), Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene OR; Sigma-Aldrich (2003), Catalogue, St. Louis, MO.

[0112] Описані стандартні методи гістології імунної системи. Див., наприклад, Muller-Harmelink (ed.) (1986), *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, New York, NY; Hiatt et al. (2000), *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams and Wilkins, Phila, PA; Louis et al. (2002), *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, New York, NY.

[0113] Доступні пакети програм і бази даних для визначення, наприклад, антигенних фрагментів, лідерних послідовностей, згортання білка, функціональних доменів, сайтів глікозилювання і вирівнювання послідовностей. Див., наприклад, GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc., Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCyphero (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne et al. (2000), *Bioinformatics*, 16:741-742; Menne et al. (2000), *Bioinformatics Applications Note*, 16:741-742; Wren et al. (2002), *Comput. Methods Programs Biomed.* 68:177-181; von Heijne (1983), *Eur. J. Biochem.* 133:17-21; von Heijne (1986), *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690.

Приклад 2

Способи лікування in vivo

[0114] Самиць мишей C57Bl/6J або BALB/c/AnN віком приблизно вісім-десять тижнів одержали з лабораторії Jackson (Bar Harbor, Maine або Sacramento, California) або лабораторії Taconic (Oxnard, California), відповідно. Загальноприйняті їжа і вода для тварин були надані без обмеження. Всі протоколи із застосуванням тварин були підтверджені комітетом по догляду за тваринами і їх використанню Palo Alto Merck & Co., Inc. і Merck Research Labs (MRL).

[0115] Перед обробкою мишей зважували, і вимірювали пухлини окремих мишей. Для запобігання необ'єктивності, викидали будь-які спостереження, що різко виділяються по масі або об'єму пухлин, а мишей, що залишилися, рандомізували на різні групи лікування з еквівалентним середнім розміром пухлини.

[0116] Тестовані матеріали і ізотипічний контроль одержували в департаменті Palo Alto Protein Sciences у вигляді заморожених матеріалів (-80 °C). Для стабілізування білків і запобігання преципітації рецептурні буфери були специфічними для кожного антитіла, подробиці цього наведені нижче.

[0117] Лікарські форми/розріджувачі одержували в департаменті Palo Alto Protein Sciences у вигляді матеріалів при 4 °C. Для стабілізації білків і запобігання преципітації були призначені ізотопічний контроль mIgG2a і лікарська форма анти-PD-1/розріджувач з 20 mM ацетату Na, 7 % сахарози, pH 5,5, лікарська форма mIgG1/розріджувач з 75 mM NaCl, 10 mM фосфату, 3 % сахарози, pH 7,3, і лікарська форма mDTA-1 (анти-mGITR)/розріджувач з 20 mM ацетату Na, 7 % сахарози, 0,02 % Tween80 слабкий пероксид, pH 5,5.

Приклад 3

Одержання і імплантація пухлинної клітинної лінії

[0118] Клітини карциноми ободової кишки MC38 або CT26 культивували в середовищі RPMI, доповненому 10 % термоінактивованою фетальною бичачою сироваткою. 1×1 клітин карциноми жовчного міхура MB49 культивували в середовищі Ігла, модифікованому за способом Дульбекко (DMEM), доповненому 10 % фетальною бичачою сироваткою і 1 % GlutaMAX™. 1×10⁶ клітин MC38, 3×10⁵ клітин CT26 або 0,5×10⁶ клітин MB49 ін'єктували SC в об'ємі 100 мкл забуференого фосфатом фізіологічного розчину в лівій області живота або правій поверхні кожної миші.

Звичайно мишей спершу голили електричними ножицями в області, яка повинна використовуватися для імплантації.

Приклад 4

Вимірювання пухлин і маси тіла

5 [0119] Пухлини вимірювали за день перед першою дозою і два рази на тиждень після неї. Довжину і ширину пухлини вимірювали із застосуванням електронних циркулів, а об'єм пухлини визначали із застосуванням формули $\text{Об'єм (мм}^3\text{)} = 0,5 \times \text{Довжина} \times \text{Ширина}^2$, де довжиною є більший розмір.

10 [0120] Мишей періодично зважували для контролю загального здоров'я, але при необхідності також для оцінки фактичної доставки дози мг/кг на мишу.

Приклад 5

Одержання, введення і аналіз дозованого розчину

15 [0121] Заморожені матеріали розморожували і переміщували в мокрий лід. Щоб уникнути повторного заморожування і розморожування, кожний флакон з матеріалом розморожували один раз, і аліквоти готували в об'ємах, достатніх для використання один раз. Для цієї мети використовували поліпропіленові пробірки з низькою адгезією. Аліквоти різко заморожували в сухому льоду і зберігали при 80 °C. Перед кожним введенням дози, одну аліквоту розморожували і розводили до номінальної концентрації у придатному розріджувачі і негайно вводили дозу. Аліквоти дозованих розчинів різко заморожували в сухому льоду і зберігали при -

20 80 °C до аналізу. Дозовані розчини оцінювали із застосуванням платформи для дослідження середнього масштабу (MSD®, Rockville, MD), яка основана на технології з множиною решіток; комбінації електрохемілюмінесцентного виявлення і структурованих решіток.

25 [0122] Введення доз тестованих матеріалів починали, як тільки пухлини MC38 і CT26 досягали середнього розміру, що дорівнює приблизно 300 мм³ і 220 мм³, відповідно, звичайно приблизно через два тижні після імплантації. Введення доз тестованих матеріалів починали, як тільки пухлина MB49 досягала середнього розміру, що дорівнює приблизно 105 мм³, через один тиждень після імплантації. Тестували коливання частоти введення доз (в діапазоні від однократної дози до 6 доз щотижня) при концентрації дози, що вводиться, яка дорівнює 5 мг/кг, подробиці чого наведені нижче.

Приклад 6

Муринізація антитіла DTA-1

30 [0123] Щурячі проти мишачих антитіла DTA-1 G1TR (Sakaguchi S., Kyoto University, Kyoto, Japan), муринізували наступним чином. Послідовність щурячих антитіл DTA-1 визначали для варіабельних важких (VH) і варіабельних легких (VL) доменів. Щурячу VH-послідовність DTA-1 порівнювали з мишачими зародковими VH-послідовностями з бази даних IMGT по імуногенетиці (www.imgt.org) (Lefranc M.-P. et al. (1999), Nuc. Acids Res. 27:209-212). VH-послідовність DTA-1 вирівнювали з зародковими VH-послідовностями і підраховували аналогічно з попередньою системою гуманізації (див., наприклад, WO 2005/047326). Щуряча DTA-1 VH була найбільш схожа на мишачі зародкові IGVH5-4, IGVH5-6 і IGVH5-9. Залишки CDR переносили з щурячих

40 DTA-1 VH в мишачі зародкові IGVH5-4; два IGVH5-4 каркасних залишки були замінені на їх відповідні IGVH5-6, а мишачий J-області IGJH-4 (IMGT) використовували для з'єднання з мишачим IgG1 і мишачим IgG2a Fc-ділянками.

45 [0124] Щурячу DTA-1 VL (лямбда) послідовність вирівнювали з мишачою VL (лямбда) послідовністю з GenBank: AAN02129.1. Залишки CDR переносили з щурячої DTA-1 VL (лямбда) в мишачу AAN02129 каркасну послідовність. Сім каркасних залишків на муринізованих DTA1 були змінені на основі комп'ютерних графічних моделей щурячих і муринізованих VL-доменів. Муринізований DTA-1 VL (лямбда) домен злився з мишачим константним легким доменом.

50 [0125] Для всіх трьох конструктів (один VH і два VL (лямбда)), були синтезовані кодоноптомізовані гени, які вставили в експресійні вектори. Антитіла експресували за допомогою транзитornoї експресії в клітинах HEK293 і очищали з застосуванням білкової-А хроматографії.

Приклад 7

Результати лікування анти-G1TR/анти-PD-1

55 [0126] Мишей C57BL/6J, що несуть пухлину MC38 на пізній стадії, обробляли за допомогою однієї або двох ін'єкцій на тиждень муринізованого анти-mG1TR (Merck Research Labs, Palo Alto, CA) підшкірно (SC) і муринізованого анти-mPD-1 (Merck Research Labs, Palo Alto, CA) внутрішньоочеревинно (IP) з дозуванням по 5 мг/кг в кожній. Лікування починали після того, як розміри пухлини досягали 240-360 мм³. Пухлини вимірювали два рази на тиждень. Повна регресія (CR) пухлин служила як відображення протипухлинної ефективності. Введення комбінованих доз приводило до надійної, синергістичної ефективності з 100 % CR після двох

60

комбінованих доз на тиждень. Обмеження режиму однією дозою кожного антитіла (Ab) зменшувало CR до 70 %, аналогічно CR, що досягається з комбінацією анти-mGITR з подальшими чотирма щотижневими введеннями анти-mPD-1, починаючи через один тиждень. Двотижневий інтервал між введеннями анти-mGITR і анти-mPD-1 не був настільки ефективним.

5 Тільки 20-30 % CR спостерігалось при монотерапії з аж до шести щотижневими обробками анти-mGITR або 2-4 щотижня обробками анти-mPD-1 Ab (див. Фігури 1A-1K).

[0127] Мишей C57BL/6J, що несуть пухлину MC38 на пізній стадії, лікували анти-mGITR (SC) і анти-mPD-1 (IP) з дозуванням по 5 мг/кг кожного. Лікування починали після того, як розмір пухлини досягав 200-350 мм³. Пухлини вимірювали два рази щотижня. Повна регресія (CR) пухлин служила як відображення протипухлинної ефективності. Введення комбінованих доз приводило до надійної, синергістичної ефективності з 100 % CR після двох комбінованих доз на тиждень. Це порівнянно з результатами, детально викладеними вище. Однак, зменшена CR, що дорівнює 60 %, спостерігалася, коли антитіла доставляли окремо з інтервалом в один тиждень. Дві щотижневі монотерапевтичні дози або анти-mGITR, або анти-mPD-1 уповільнювали

15 пухлинний ріст, але не приводили до CR (див. Фігури 2A-2F).

[0128] Мишей BALB/cAnN, що несуть пухлину CT26 на пізній стадії, лікували анти-mGITR (SC) і анти-mPD-1 (IP) з дозуванням по 5 мг/кг кожного. Лікування починали після того, як розмір пухлини складав в середньому 220 мм³ (180-260 мм³). Пухлини вимірювали два рази щотижня. Повна регресія (CR) пухлин служила як відображення протипухлинної ефективності. Єдине введення комбінованих доз приводило до надійної, синергістичної ефективності з 70 % CR. Протипухлинна ефективність з кожним антитілом, що доставляється у вигляді монотерапії, становила 0-10 % CR (див. Фігури 3A-3D).

[0129] Мишей C57BL/6J, що несуть пухлину MB49, обробляли однократною дозою анти-GITR (SC) і анти-PD-1 (IP) з 5 мг/кг і 10 мг/кг, відповідно. Лікування починали після того, як розмір пухлини складав в середньому 105 мм³ (85-122 мм³). Пухлини вимірювали два рази щотижня. Повна регресія (CR) пухлин служила як відображення протипухлинної ефективності. Лікування комбінацією анти-GITR і анти-PD-1 приводило до підвищеної ефективності з 40 % CR. CR не спостерігалася в групах лікування єдиним агентом (див. Фігури 4A-4D).

Приклад 8

30 Вплив комбінації анти-PD-1 і анти-GITR на співвідношення регуляторних Т-клітин і клітин CD8

А. Способи

1. Реакція змішаної культури лімфоцитів

[0130] Мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) виділяли з лейкоцитарних плівки із застосуванням центрифугування в градієнті щільності в Ficoll Raque Plus при 1200×г протягом 20 хвилин. Мононуклеарні клітини периферичної крові збирали з поверхні розділу середовища:плазма і промивали 2 рази фізіологічним розчином, забуференим фосфатом Дульбекко (DPBS). Червоні кров'яні клітини (RBC), що залишилися, лізували із застосуванням розчину хлористого калію-амонію для лізису еритроцитів (розчину для лізису еритроцитів).

40 [0131] Дендритні клітини (DC) одержували з моноцитів CD14+ із застосуванням наступної процедури. Спочатку моноцити виділяли з лейкоцитарних плівки із застосуванням коктейлю збагачення людських моноцитів RosetteSep і центрифугування в градієнті щільності в Ficoll Raque Plus при 1200×г протягом 20 хвилин. Моноцити витягували з поверхні розділу середовища:плазма і промивали 2 рази з DPBS. RBC, що залишилися, лізували із застосуванням розчину для лізису еритроцитів. Збагачені моноцити культивували в модифікованому за способом Дульбекко середовищі Ігла, збагаченому 10 % фетальною бичачою сироваткою (FBS), 1000 од./мл гранулоцитарно-макрофагальним колонієстимулюючим фактором (GM-CSF) і 400 од./мл інтерлейкіном (IL)-4 з густиною клітин, що дорівнює 2×10⁶/мл. На 6 день в культуру додавали 0,5 мкг/мл ліпополісахариду; потім клітини культивували

50 протягом ще 2 днів.

[0132] Культури для реакції змішаних лімфоцитів розміщували в 24-ямкових планшетах. Мононуклеарні клітини периферичної крові (2×10⁶/мл) культивували з γ-опроміненими (30 Гр) алогенними DC (0,2×10⁶/мл) в присутності 100 од./мл IL-2; 5 нг/мл IL-15; анти-hGITR антитіла (МК-4166), анти-hPD-1 антитіла (МК-3475), комбінації МК-3475 і МК-4166 або ізотопічного контролю mAb (анти-RSV). Кількість регуляторних Т-клітин (Treg) в культурах MLR оцінювали на 7 день із застосуванням проточної цитометрії.

2. Проточно-цитометричне виявлення регуляторних Т-лімфоцитів в культурах для реакції змішаних лімфоцитів

60 [0133] Для виявлення Treg (CD3+CD4+CD25+FoxP3+) і Т-клітин CD8+, 1-2×10⁶ клітин з MLR-культури інкубували з анти-CD3, анти-CD4, анти-CD25 і анти-CD8 в 50 мкл забарвленого

буфера BD Pharmingen. Мертві клітини виключали із застосуванням Fixable Viability Dye eFluor 506. Після забарвлення поверхні анти-CD3, анти-CD4, анти-CD8 і анти-CD25 mAb внутрішньоклітинне забарвлення FoxP3 проводили із застосуванням набору FoxP3 фіксація/проникність, відповідно до інструкцій виготовлювача (eBioscience). Одержання зразків виконували на проточному цитометрі LSR II, і дані аналізували із застосуванням програмного забезпечення FlowJo, версія 10.0.6 (Tree Star, Inc.). Treg ідентифікували за допомогою установки дискримінаційного вікна для клітин CD3+CD4+ з подальшою установкою дискримінаційного вікна для клітин CD25+FoxP3+.

3. Аналіз супресії регуляторних Т-клітин

[0134] CD4+ Т-клітини виділяли з лейкоцитарних плівки із застосуванням набору для збагачення Т-клітин CD4+RosetteSep людини і центрифугування в градієнті щільності в Ficoll Paque Plus при 1200×g протягом 20 хвилин. Т-клітини CD4+ збирали з поверхні розділу середовище:плазма і промивали 2 рази DPBS. RBC, що залишилися, лізували із застосуванням розчину для лізису еритроцитів. CD4+CD25+Treg і CD4+CD25- ефекторні Т-клітини (Teffs) розділяли із застосуванням набору II людських CD25-кон'югованих мікрокульок, відповідно до інструкцій виробника (Miltenyi Biotec). Чистота CD4+CD25+CD127-Treg становила приблизно 40-70 %. Людські DC одержували, як описано вище.

[0135] Для аналізу Т-клітинної супресії всього 1×10^5 Т-клітин (Treg і Teffs) і 2×10^4 γ-опромінених (30 Гр) DC на ямку культивували в 96-ямкових планшетах з круглим дном протягом 7 днів в присутності МК-4166, МК-3475, комбінації МК-3475 і МК-4166 або ізотопічного контролю mAb (анти-RSV). CD4+CD25-Teff і CD4+CD25+Treg змішували у співвідношенні 4:1. На 6 день мічений тритієм тимідин додавали в культури протягом 20 годин. Після інкубування з міченим тритієм тимідином клітини збирали, лізували із застосуванням води і аналізували із застосуванням β-лічильника (мікропланшетного лічильника 2450, PerkinElmer). Рівень проліферації Т-клітин відображається рівнями включеного міченого тритієм тимідину. Всі аналізи проводили в трьох повтореннях.

В. Результати

[0136] Здатність антимишачого агоніста GITRic mAb DTA-1 змінювати стабільність і внутрішньопухлинне накопичення Treg є суттєвою для механізму дії DTA-1 (див., наприклад, Cohen et al. (2010), PLoS One 5(e10436):1-12; і Schaer et al. (2013), Cancer. Immunol. Res. 1:320-331). Здатність МК-4166 окремо або в комбінації з МК-3475 впливати на індукування людських Treg і їх супресивну активність досліджували із застосуванням аналізу людини *in vitro*.

[0137] Індукування Treg в MLR добре документоване (див., наприклад, Levitsky et al. (2013), Transplantation, 96:689-696). Таким чином, MLR використовували для збільшення кількості людських Treg, існуючих в природі в крові, і для оцінки дії МК-4166 окремо або в комбінації з МК-3475 на людські Treg і співвідношення CD8:Treg. Додавання в культури MLR 10 мкг/мл МК-4166 привело до зменшених кількостей CD4+CD25+FoxP3+Treg через 7 днів (Фігура 5A). Окремо МК-3475 не надавали впливу на кількість Treg. Однак комбінація МК-3475 і МК-4166 надавала найбільш тривалий вплив на кількість Treg і співвідношення CD8:Treg (Фігура 5B).

[0138] Для оцінки дії МК-4166 на супресивну активність людського Treg був створений аналіз супресії Treg. У даному аналізі рівень проліферації Т-клітин відображається за допомогою рівнів включеного міченого тритієм тимідину. Залежне від дози підвищення проліферації Т-клітин спостерігалось, коли МК-4166 комбінували з МК-3475 (Фігура 6). Дані результати забезпечують доказ, що інкубування з МК-4166 і МК3475 знижує кількість MLR-індукованого Treg, підвищує співвідношення CD8:Treg і ослабляє супресивну функцію людського Treg *in vitro*.

Таблиця 2 надає короткий опис послідовностей в списку послідовностей.

Таблиця 2

SEQ ID NO:	Опис
1	36E5 CDRH1
2	3D6 CDRH1
3	61G6 CDRH1
4	6H6 CDRH1
5	61F6 CDRH1
6	1D8 CDRH1
7	17F10 CDRH1
8	35D8 CDRH1
9	49A1 CDRH1
10	9E5 CDRH1

SEQ ID NO:	Опис
11	31H6 CDRH1
12	36E5 CDRH2
13	3D6 CDRH2
14	61G6 CDRH2
15	6H6 CDRH2
16	61F6 CDRH2
17	1D8 CDRH2
18	17F10 CDRH2
19	35D8 CDRH2
20	49A1 CDRH2
21	9E5 CDRH2
22	31H6 CDRH2
23	36E5 CDRH3
24	3D6 CDRH3
25	61G6 CDRH3
26	6H6 CDRH3
27	61F6 CDRH3
28	1D8 CDRH3
29	17F10 CDRH3
30	35D8 CDRH3
31	49A1 CDRH3
32	9E5 CDRH3
33	31H6 CDRH3
34	36E5 CDRL1
35	3D6 CDRL1
36	61G6 CDRL1
37	6H6 CDRL1
38	61F6 CDRL1
39	1D8 CDRL1
40	17F10 CDRL1
41	35D8 CDRL1
42	49A1 CDRL1
43	9E5 CDRL1
44	31H6 CDRL1
45	36E5 CDRL2
46	3D6 CDRL2
47	61G6 CDRL2
48	6H6 CDRL2
49	61F6 CDRL2
50	1D8 CDRL2
51	17F10 CDRL2
52	35D8 CDRL2
53	49A1 CDRL2
54	9E5 CDRL2
55	31H6 CDRL2
56	36E5 CDRL3
57	3D6 CDRL3
58	61G6 CDRL3
59	6H6 CDRL3
60	61F6 CDRL3
61	1D8 CDRL3
62	17F10 CDRL3
63	35D8 CDRL3
64	49A1 CDRL3
65	9E5 CDRL3
66	31H6 CDRL3

SEQ ID NO:	Опис
67	Гуманізований 1D8 VH
68	Гуманізований 1D8 VL
69	Гуманізований 3D6 VH
70	Гуманізований 3D6 VL
71	Гуманізований 6H6 VH
72	Гуманізований 6H6 VL
73	Гуманізований 9E5 VH
74	Гуманізований 9E5 VL
75	Гуманізований 31H6 VH
76	Гуманізований 31H6 VL
77	Гуманізований 17F10 VH
78	Гуманізований 17F10 VL
79	Гуманізований 35D8 VH
80	Гуманізований 35D8 VL
81	Гуманізований 36E5 VH
82	Гуманізований 36E5 VL
83	Гуманізований 49A1 VH
84	Гуманізований 49A1 VL
85	Гуманізований 61F6 VH
86	Гуманізований 61F6 VL
87	Гуманізований 61G6 VH
88	Гуманізований 61G6 VL

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

- 5 <110> Merck, Sharp & Dohme Corp.
Gu, Danling
Beebe, Amy M.
- <120> Модулювання імунітету до пухлини
- 10 <130> 23565-WO-PCT
- <150> US 61/867,976
<151> 2013-08-20
- 15 <160> 88
- <170> PatentIn version 3.5
- 20 <210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus
- 25 <400> 1
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
1 5 10
- 30 <210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus
- 35 <400> 2
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala
1 5 10
- 40 <210> 3
<211> 11

<212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 3
 5 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
 1 5 10
 10 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 15 <400> 4
 Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr Trp Ile Glu
 1 5 10
 20 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25 <400> 5
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Thr Met His
 1 5 10
 30 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35 <400> 6
 Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly
 1 5 10
 45 <210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 7
 50 Gly Phe Thr Val Arg Asn Tyr Ala Met Ser
 1 5 10
 55 <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 8
 60 Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Trp Asn
 1 5 10
 65 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 70 <400> 9

Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Trp Asn
 1 5 10
 5
 <210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 10
 <400> 10
 Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Gly Val Gly Val Gly
 1 5 10
 15
 <210> 11
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 20
 <400> 11
 Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Gly Val Gly Val Gly
 1 5 10
 25
 <210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 30
 <400> 12
 Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15
 35
 <210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 40
 <400> 13
 Tyr Ile His Ala Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Arg
 1 5 10 15
 45
 Gly
 50
 <210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 55
 <400> 14
 Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 60
 <210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 65
 <400> 15
 70

Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 5 Asp
 10 <210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 15 <400> 16
 Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Val Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 20 Asp
 25 <210> 17
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 30 <400> 17
 His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 35 <210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 40 <400> 18
 Ser Ile Ser Thr Gly Asp Arg Ser Tyr Leu Pro Asp Ser Met Lys Gly
 1 5 10 15
 45 <210> 19
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 50 <400> 19
 Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 55 <210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 60 <400> 20
 65 Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser
 1 5 10 15
 70 <210> 21
 <211> 16

<212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 21
 5 Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Asn Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Ile His
 1 5 10 15
 10 <210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 15 <400> 22
 Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
 1 5 10 15
 20 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25 <400> 23
 Val Gly Gly Tyr Tyr Asp Ser Met Asp Tyr
 1 5 10
 30 <210> 24
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 35 <400> 24
 Gly Ser Phe Met Tyr Ala Ala Asp Tyr Tyr Ile Met Asp Ala
 1 5 10
 45 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 25
 50 Gln Leu Gly Leu Arg Phe Phe Asp Tyr
 1 5
 55 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 26
 60 Lys Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Phe
 1 5
 65 <210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 70 <400> 27

Leu Gly Gly Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr
 1 5 10
 5
 <210> 28
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 10
 <400> 28
 Ser Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 1 5 10 15
 15
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 20
 20
 <210> 29
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25
 <400> 29
 Tyr Phe Asp Phe Asp Ser Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 1 5 10 15
 30
 Thr Val Ser Ala
 20
 35
 <210> 30
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 40
 <400> 30
 Arg His Leu Gly Ser Gly Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 1 5 10 15
 45
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 20
 50
 <210> 31
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 55
 <400> 31
 Arg His Leu Ile Ser Gly Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 1 5 10 15
 60
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 20
 65
 <210> 32
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 70

<400> 32

Ile Lys Glu Pro Arg Asp Trp Phe Phe Glu Phe Trp Gly Pro Gly Thr
1 5 10 15

5

Met Val Ser Val Ser Ser
20

10

<210> 33
<211> 22
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

15

<400> 33

Ile Lys Glu Pro Arg Asp Trp Phe Phe Glu Phe Trp Gly Pro Gly Thr
1 5 10 15

20

Met Val Ser Val Ser Ser
20

25

<210> 34
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus

30

<400> 34

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Val Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

35

<210> 35
<211> 16
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

40

<400> 35

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Asn Thr Phe Leu Ser
1 5 10 15

45

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

50

<400> 36

Ser Ala Asn Ser Thr Val Asn Tyr Met Tyr
1 5 10

55

<210> 37
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

60

<400> 37

Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Phe His
1 5 10

65

<210> 38

70

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 5 <400> 38
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn
 1 5 10 15
 10
 <210> 39
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 15 <400> 39
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15
 20
 <210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25 <400> 40
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Phe Leu Asn
 1 5 10
 30
 <210> 41
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35 <400> 41
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
 1 5 10
 40
 <210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 45 <400> 42
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Ser Ala Val Ala
 1 5 10
 50
 <210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 55 <400> 43
 Arg Ala Ser Gln Gly Val Asn Asn Phe Leu Thr
 1 5 10
 60
 <210> 44
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 65
 70

<400> 44
 Arg Ala Ser Gln Gly Val Asn Asn Tyr Leu Thr
 1 5 10
 5
 <210> 45
 <211> 7
 <212> PRT
 10 <213> Mus musculus
 <400> 45
 Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
 1 5
 15
 <210> 46
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 46
 25 Leu Ala Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5
 30 <210> 47
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 47
 35 Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 40 <210> 48
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 45 <400> 48
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 50 <210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 55 <400> 49
 Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
 1 5
 60 <210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 65 <213> Mus musculus
 <400> 50
 70 Lys Val Ser Lys Arg Phe Ser
 1 5

5	<210>	51
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	Mus musculus
	<400>	51
10	Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser	
	1	5
15	<210>	52
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	Mus musculus
	<400>	52
20	Trp Ala Ser Thr Arg His Thr	
	1	5
25	<210>	53
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	Mus musculus
30	<400>	53
	Trp Ala Ser Thr Arg His Thr	
	1	5
35	<210>	54
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	Rattus norvegicus
40	<400>	54
	Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser	
	1	5
45	<210>	55
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	Rattus norvegicus
50	<400>	55
	Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser	
	1	5
55	<210>	56
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Mus musculus
60	<400>	56
65	Gln Gln Thr Lys Glu Val Thr Trp Thr	
	1	5
70	<210>	57
	<211>	9

<212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 57
 5 Phe Gln His Thr His Leu Pro Leu Thr
 1 5
 10 <210> 58
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 15 <400> 58
 Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr
 1 5
 20 <210> 59
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25 <400> 59
 His Gln Tyr His Arg Ser Pro Arg Thr
 1 5
 30 <210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35 <400> 60
 Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Phe Thr
 1 5
 40 <210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 45 <400> 61
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr
 1 5
 50 <210> 62
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 55 <400> 62
 60 Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro Thr
 1 5
 65 <210> 63
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 70 <400> 63

	Gln	Gln	His	Ser	Tyr	Thr	Pro	Pro	Trp	Thr
	1				5					10
5		<210>	64							
		<211>	10							
		<212>	PRT							
		<213>	Mus musculus							
10		<400>	64							
	Gln	Gln	His	Ser	Tyr	Thr	Pro	Pro	Trp	Thr
	1				5					10
15		<210>	65							
		<211>	9							
		<212>	PRT							
20		<213>	Rattus norvegicus							
		<400>	65							
	Gln	Gln	Tyr	His	Gly	Phe	Pro	Asn	Thr	
25	1				5					
		<210>	66							
		<211>	9							
30		<212>	PRT							
		<213>	Rattus norvegicus							
		<400>	66							
35	Gln	Gln	Tyr	His	Gly	Phe	Pro	Asn	Thr	
	1				5					
		<210>	67							
40		<211>	122							
		<212>	PRT							
		<213>	штучна послідовність							
		<220>								
		<223>	послідовність гуманізованого антитіла							
45		<220>								
		<221>	варіант							
		<222>	(24)..(24)							
50		<223>	може бути А або F							
		<220>								
		<221>	варіант							
		<222>	(69)..(69)							
55		<223>	може бути F або L							
		<220>								
		<221>	варіант							
		<222>	(73)..(73)							
60		<223>	може бути R або K							
		<220>								
		<221>	варіант							
		<222>	(75)..(75)							
65		<223>	може бути N або T							
		<220>								
		<221>	варіант							
		<222>	(80)..(80)							
70		<223>	може бути L або V							

<220>
 <221> варіант
 <222> (98)..(98)
 5 <223> може бути А або V

 <400> 67

 10 Gln val Gln Leu val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

 15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Xaa Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

 20 Gly Met Gly Val Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

 20 Trp val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Pro Ser
 50 55 60

 25 Leu Lys Ser Arg Xaa Thr Ile Ser Xaa Asp Xaa Ser Lys Asn Thr Xaa
 65 70 75 80

 30 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

 35 Cys Xaa Arg Ser Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

 40 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 <210> 68
 <211> 113
 <212> PRT
 45 <213> штучна послідовність

 <220>
 <223> послідовність гуманізованого антитіла

 <400> 68

 50 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

 55 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

 60 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

 65 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

 70 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

5 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

10 Arg

15 <210> 69
<211> 123
<212> PRT
<213> штучна послідовність

20 <220>
<223> послідовність гуманізованого антитіла

25 <220>
<221> варіант
<222> (97)..(97)
<223> може бути А або Т

30 <220>
<221> варіант
<222> (98)..(98)
<223> може бути R або Т

<400> 69

35 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

40 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

45 Ala Tyr Ile His Ala Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

50 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

55 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

60 Xaa Xaa Gly Ser Phe Met Tyr Ala Ala Asp Tyr Tyr Ile Met Asp Ala
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

65 <210> 70
<211> 113
<212> PRT
<213> штучна послідовність

70

<220>
 <223> послідовність гуманізованого антитіла
 <400> 70
 5 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 10 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 15 Asp Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 20 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 25 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln His
 85 90 95
 30 Thr His Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 35 Arg
 <210> 71
 <211> 118
 40 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> послідовність гуманізованого антитіла
 45
 <220>
 <221> варіант
 <222> (48)..(48)
 50 <223> може бути M або I
 <220>
 <221> варіант
 <222> (68)..(68)
 55 <223> може бути V або A
 <220>
 <221> варіант
 <222> (70)..(70)
 60 <223> може бути M або F
 <220>
 <221> варіант
 <222> (72)..(72)
 65 <223> може бути T або A
 <400> 71
 70 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

5 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Xaa
 35 40 45
 10 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 15 Lys Asp Arg Xaa Thr Xaa Thr Xaa Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 20 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 25 Ala Arg Lys Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 30 <210> 72
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 35 <220>
 <223> послідовність гуманізованого антитіла
 40 <220>
 <221> варіант
 <222> (48)..(48)
 <223> може бути L або W
 45 <220>
 <221> варіант
 <222> (72)..(72)
 <223> може бути F або Y
 50 <400> 72
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 55 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 60 Tyr Phe His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Xaa
 35 40 45
 65 Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 70 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Xaa Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro
85 90 95

5 Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

10 <210> 73
<211> 121
<212> PRT
<213> штучна послідовність

15 <220>
<223> послідовність гуманізованого антитіла

20 <220>
<221> варіант
<222> (24)..(24)
<223> може бути V або F

25 <220>
<221> варіант
<222> (50)..(50)
<223> може бути I або L

30 <220>
<221> варіант
<222> (51)..(51)
<223> може бути G або A

35 <220>
<221> варіант
<222> (69)..(69)
<223> може бути V або L

40 <220>
<221> варіант
<222> (71)..(71)
<223> може бути I або V

45 <220>
<221> варіант
<222> (73)..(73)
<223> може бути V або K

50 <220>
<221> варіант
<222> (80)..(80)
<223> може бути F або A

55 <220>
<221> варіант
<222> (99)..(99)
<223> може бути R або Q

60 <400> 73
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

65 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Xaa Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
20 25 30

70 Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

5 Trp Xaa Xaa Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Asn Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 10 Leu Ile His Arg Xaa Thr Xaa Ser Xaa Asp Thr Ser Lys Asn Gln Xaa
 65 70 75 80
 15 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 20 Cys Ala Xaa Ile Lys Glu Pro Arg Asp Trp Phe Phe Glu Phe Trp Gly
 100 105 110
 25 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 30 <210> 74
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> послідовність гуманізованого антитіла
 35 <220>
 <221> варіант
 <222> (46)..(46)
 <223> може бути L або P
 40 <220>
 <221> варіант
 <222> (49)..(49)
 <223> може бути Y або F
 45 <220>
 <221> варіант
 <222> (71)..(71)
 <223> може бути F або Y
 <400> 74
 50 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 55 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Asn Asn Phe
 20 25 30
 60 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Xaa Leu Ile
 35 40 45
 65 Xaa Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 70 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Xaa Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Gly Phe Pro Asn
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105
 5
 <210> 75
 <211> 121
 <212> PRT
 10 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> послідовність гуманізованого антитіла
 15
 <220>
 <221> варіант
 <222> (24)..(24)
 <223> може бути V або F
 20
 <220>
 <221> варіант
 <222> (50)..(50)
 <223> може бути I або L
 25
 <220>
 <221> варіант
 <222> (51)..(51)
 <223> може бути G або A
 30
 <220>
 <221> варіант
 <222> (69)..(69)
 <223> може бути V або L
 35
 <220>
 <221> варіант
 <222> (73)..(73)
 <223> може бути V або K
 40
 <220>
 <221> варіант
 <222> (80)..(80)
 <223> може бути F або A
 45
 <220>
 <221> варіант
 <222> (99)..(99)
 <223> може бути R або Q
 50
 <400> 75
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 55
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Xaa Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
 20 25 30
 60
 Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 65
 Trp Xaa Xaa Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 70
 Leu Lys Asn Arg Xaa Thr Ile Ser Xaa Asp Thr Ser Lys Asn Gln Xaa
 65 70 75 80

5 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90
 Cys Ala Xaa Ile Lys Glu Pro Arg Asp Trp Phe Phe Glu Phe Trp Gly
 100 105 110
 10 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 15 <210> 76
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 20 <220>
 <223> послідовність гуманізованого антитіла
 25 <220>
 <221> варіант
 <222> (46)..(46)
 <223> може бути L або P
 30 <220>
 <221> варіант
 <222> (49)..(49)
 <223> може бути Y або F
 35 <220>
 <221> варіант
 <222> (71)..(71)
 <223> може бути F або Y
 40 <400> 76
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 45 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Asn Asn Tyr
 20 25 30
 50 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Xaa Leu Ile
 35 40 45
 55 Xaa Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 60 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Xaa Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 65 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Gly Phe Pro Asn
 85 90 95
 70 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105
 <210> 77
 <211> 117

<212> PRT
 <213> штучна послідовність

 <220>
 5 <223> послідовність гуманізованого антитіла

 <220>
 10 <221> варіант
 <222> (96)..(96)
 <223> може бути A або Q

 <400> 77
 15 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 20 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Arg Asn Tyr
 20 25 30
 25 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 30 Ala Ser Ile Ser Thr Gly Asp Arg Ser Tyr Leu Pro Asp Ser Met Lys
 50 55 60
 35 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 40 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa
 85 90 95
 45 Arg Tyr Phe Asp Phe Asp Ser Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 50 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 78
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність

 <220>
 55 <223> послідовність гуманізованого антитіла

 <400> 78
 60 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 65 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Phe
 20 25 30
 70 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

5 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro
 85 90 95
 10 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105
 15 <210> 79
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 20 <220>
 <223> послідовність гуманізованого антитіла
 25 <220>
 <221> варіант
 <222> (47)..(47)
 <223> може бути W або Y
 30 <220>
 <221> варіант
 <222> (48)..(48)
 <223> може бути I або M
 35 <220>
 <221> варіант
 <222> (71)..(71)
 <223> може бути V або R
 40 <220>
 <221> варіант
 <222> (96)..(96)
 <223> може бути A або S
 <400> 79
 45 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 50 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
 55 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Xaa Xaa
 35 40 45
 60 Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg
 50 55 60
 65 Gly Arg Val Thr Ile Ser Xaa Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 65 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa
 85 90 95

Arg Arg His Leu Gly Ser Gly Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

5 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 80
<211> 109
<212> PRT
<213> штучна послідовність

15 <220>
<223> послідовність гуманізованого антитіла

20 <220>
<221> варіант
<222> (71)..(71)
<223> може бути F або Y

25 <400> 80

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

30 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

35 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

40 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Xaa Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

45 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Tyr Thr Pro Pro
85 90 95

50 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

55 <210> 81
<211> 118
<212> PRT
<213> штучна послідовність

60 <220>
<223> послідовність гуманізованого антитіла

<400> 81

65 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

70 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

5 Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60

10 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

15 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

20 Arg Val Gly Gly Tyr Tyr Asp Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

25 Leu Val Thr Val Ser Ser
115

30 <210> 82
<211> 112
<212> PRT
<213> штучна послідовність

35 <220>
<221> варіант
<222> (31)..(31)
<223> може бути N або Q

40 <220>
<221> варіант
<222> (57)..(57)
<223> може бути N або Q

45 <400> 82

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

50 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Xaa Tyr
20 25 30

55 Gly Val Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

60 Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Xaa Gln Gly Ser Gly Ile Pro Asp
50 55 60

65 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

70 Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Lys
85 90 95

Glu Val Thr Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

5 <210> 83
<211> 120
<212> PRT
<213> штучна послідовність

10 <220>
<223> послідовність гуманізованого антитіла

15 <220>
<221> варіант
<222> (47)..(47)
<223> може бути W або Y

20 <220>
<221> варіант
<222> (48)..(48)
<223> може бути I або M

25 <220>
<221> варіант
<222> (67)..(67)
<223> може бути V або I

30 <220>
<221> варіант
<222> (71)..(71)
<223> може бути V або R

35 <220>
<221> варіант
<222> (78)..(78)
<223> може бути F або Y

40 <220>
<221> варіант
<222> (96)..(96)
<223> може бути A або S

<400> 83

45 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

50 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

55 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Xaa Xaa
35 40 45

Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg
50 55 60

60 Ser Arg Xaa Thr Ile Ser Xaa Asp Thr Ser Lys Asn Gln Xaa Ser Leu
65 70 75 80

65 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa
85 90 95

Arg Arg His Leu Ile Ser Gly Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

5 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 84
<211> 109
<212> PRT
<213> штучна послідовність

15 <220>
<223> послідовність гуманізованого антитіла

20 <220>
<221> варіант
<222> (1)..(1)
<223> може бути D або V

25 <400> 84

Xaa Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

30 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Ser Ala
20 25 30

35 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

40 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

45 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Tyr Thr Pro Pro
85 90 95

50 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

55 <210> 85
<211> 119
<212> PRT
<213> штучна послідовність

60 <220>
<223> послідовність гуманізованого антитіла

65 <220>
<221> варіант
<222> (48)..(48)
<223> може бути M або I

70 <220>
<221> варіант
<222> (68)..(68)

<223> може бути V або A
 <220>
 <221> варіант
 5 <222> (70)..(70)
 <223> може бути M або L
 <220>
 <221> варіант
 10 <222> (72)..(72)
 <223> може бути T або A
 <220>
 <221> варіант
 15 <222> (74)..(74)
 <223> може бути T або K
 <400> 85
 20 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 25 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 30 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Xaa
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Val Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 35 Lys Asp Arg Xaa Thr Xaa Thr Xaa Asp Xaa Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 40 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 45 Ala Arg Leu Gly Gly Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 50 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 86
 <211> 112
 <212> PRT
 55 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> послідовність гуманізованого антитіла
 60 <400> 86
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 65 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

5 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

10 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

15 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

20 Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 87
<211> 118
<212> PRT
25 <213> штучна послідовність

<220>
<223> послідовність гуманізованого антитіла

30 <220>
<221> варіант
<222> (49)..(49)
<223> може бути I або M

35 <220>
<221> варіант
<222> (68)..(68)
<223> може бути V або I

40 <220>
<221> варіант
<222> (72)..(72)
<223> може бути V або R

45 <400> 87

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

50 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

55 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

60 Xaa Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

65 Lys Ser Arg Xaa Thr Ile Ser Xaa Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

70

Ala Arg Gln Leu Gly Leu Arg Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

5 Leu Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 88
<211> 107
<212> PRT
<213> штучна послідовність

15 <220>
<223> послідовність гуманізованого антитіла

20 <220>
<221> варіант
<222> (45)..(45)
<223> може бути L або P

25 <220>
<221> варіант
<222> (46)..(46)
<223> може бути L або C

30 <400> 88

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

35 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Asn Ser Thr Val Asn Tyr Met
20 25 30

40 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Xaa Xaa Ile Tyr
35 40 45

45 Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

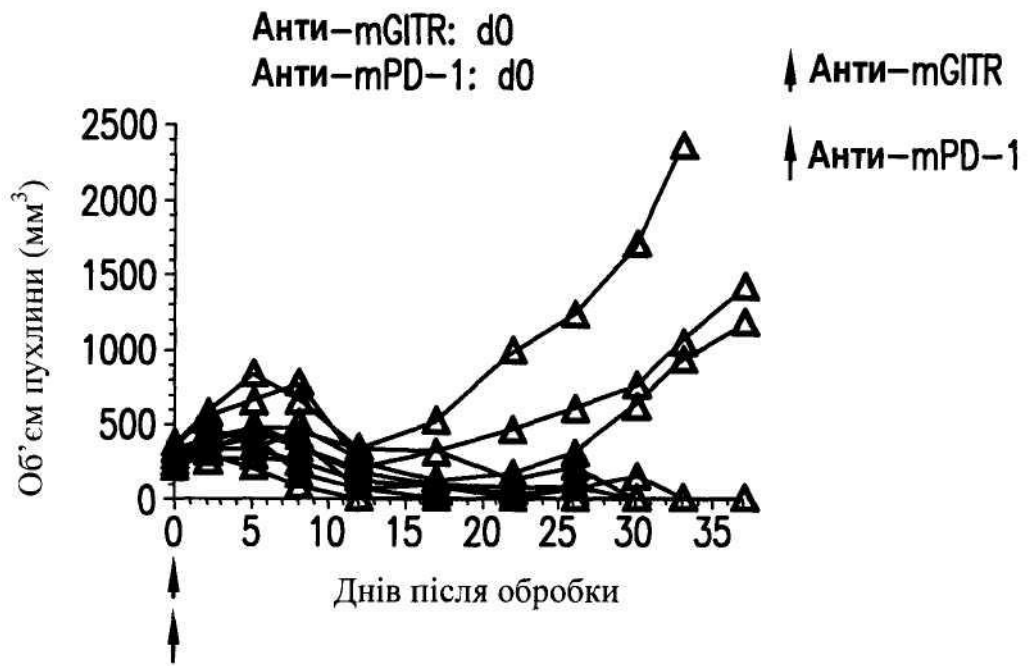
50 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95

55 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

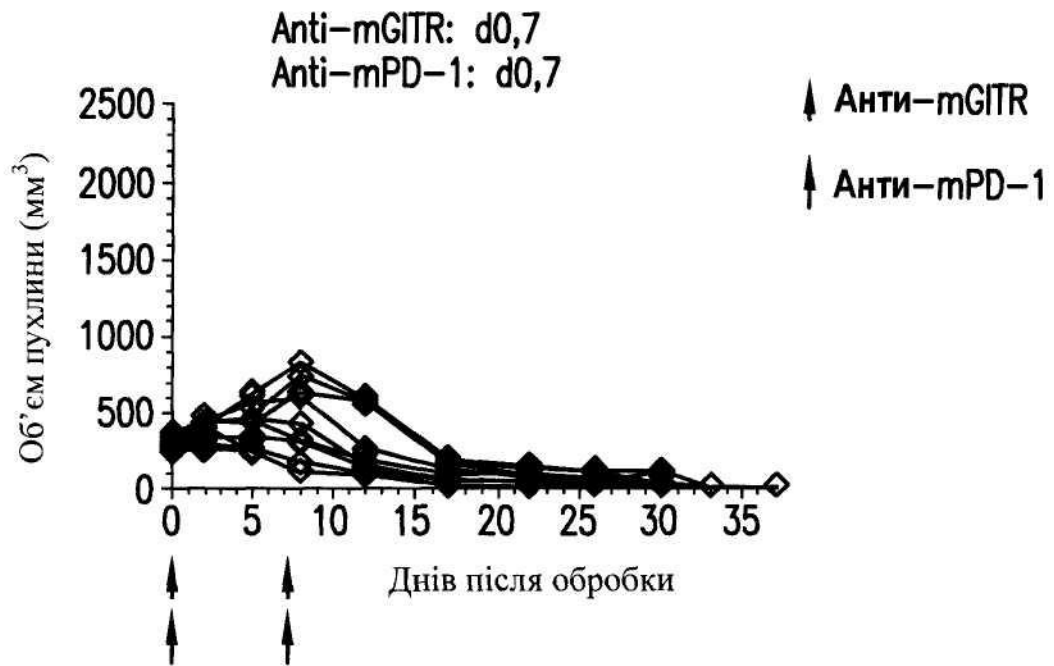
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 60 1. Спосіб лікування пухлини у пацієнта, який включає введення пацієнту антагоніста PD-1, який являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що зв'язується з PD-1, і агоніста GITR, який являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що зв'язується з GITR, де антагоніст PD-1 і агоніст GITR вводять одночасно або послідовно.
2. Спосіб за п. 1, в якому
- 65 а) антагоніст PD-1 являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що зв'язується з людським PD-1; і
- б) агоніст GITR являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що зв'язується з людським GITR.

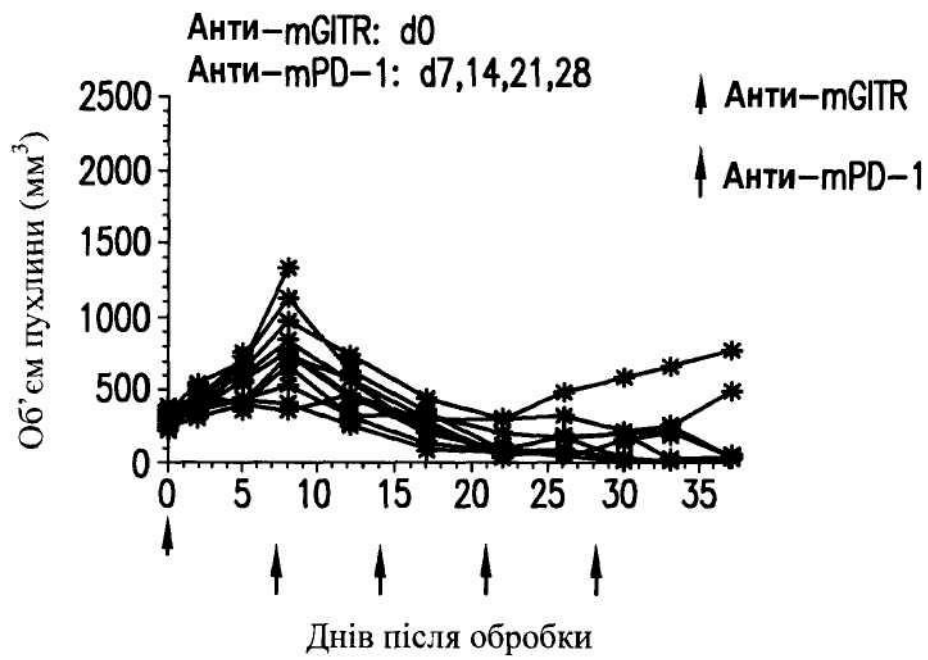
3. Спосіб за п. 2, в якому антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент є гуманізованим.
4. Спосіб за п. 1, в якому
 - а) антагоніст PD-1 являє собою МК-3475; і
 - б) агоніст GITR являє собою антитіло, яке має варіабельну ділянку легкого ланцюга імуноглобуліну, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 82, та варіабельну ділянку важкого ланцюга імуноглобуліну, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 81.
5. Спосіб за п. 4, в якому агоніст GITR являє собою антитіло, що має:
 - а) варіабельну ділянку легкого ланцюга імуноглобуліну, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 82, де амінокислота 31 є Q і амінокислота 57 є Q; і
 - б) варіабельну ділянку важкого ланцюга імуноглобуліну, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 81.
6. Спосіб за п. 1, в якому антагоніст PD-1 і агоніст GITR вводять одночасно щонайменше один раз.
7. Спосіб за п. 1, в якому антагоніст PD-1 і агоніст GITR вводять одночасно щонайменше 2 рази.
8. Спосіб за п. 1, в якому пухлина являє собою пухлину на останній стадії.
9. Спосіб за п. 8, в якому пухлину на останній стадії вибирають з групи, що складається з плоскоклітинного раку, дрібноклітинного раку легені, недрібноклітинного раку легені, гастроінтестинального раку, раку підшлункової залози, гліобластоми, гліоми, раку шийки матки, раку яєчників, раку печінки, такого як карцинома печінки і гепатома, раку жовчного міхура, раку молочної залози, раку товстої кишки, колоректального раку, раку ендометрію, мієломи (такої як множинна мієлома), раку слинної залози, раку нирок, такого як нирково-клітинний рак і пухлина Вільмса, базально-клітинного раку, меланоми, раку простати, раку вульви, раку щитовидної залози, раку яєчка і раку стравоходу.
10. Фармацевтична комбінація для лікування пухлини, яка містить антагоніст PD-1 і агоніст GITR, де:
 - а) антагоніст PD-1 являє собою МК-3475; а
 - б) агоніст GITR являє собою антитіло, яке має варіабельну ділянку легкого ланцюга імуноглобуліну, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 82, де амінокислота 31 є Q та амінокислота 57 є Q і варіабельну ділянку важкого ланцюга імуноглобуліну, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 81.
11. Застосування антагоніста PD-1 і агоніста GITR для лікування пухлини на останній стадії, де:
 - а) антагоніст PD-1 являє собою МК-3475; а
 - б) агоніст GITR являє собою антитіло, яке має варіабельну ділянку легкого ланцюга імуноглобуліну, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 82, де амінокислота 31 є Q та амінокислота 57 є Q і варіабельну ділянку важкого ланцюга імуноглобуліну, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 81.



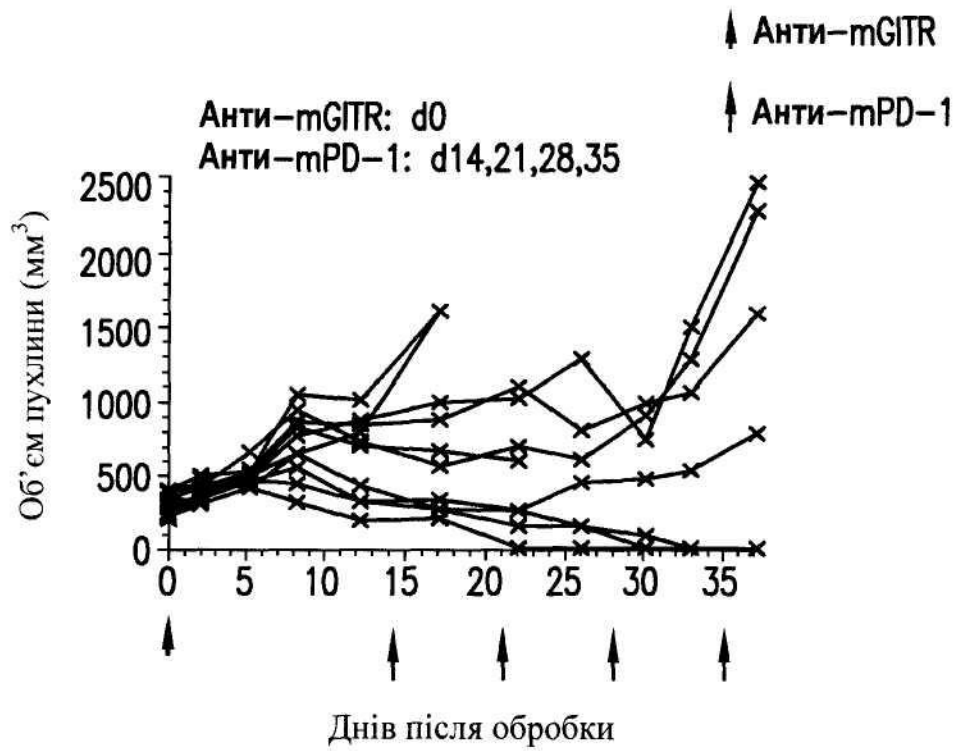
Фіг. 1А



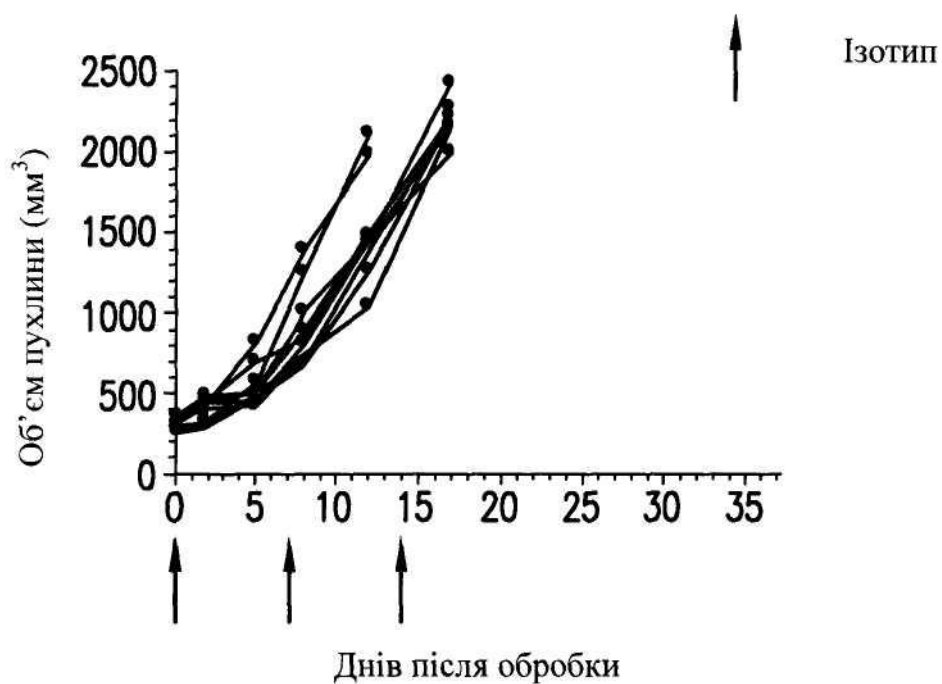
Фіг. 1В



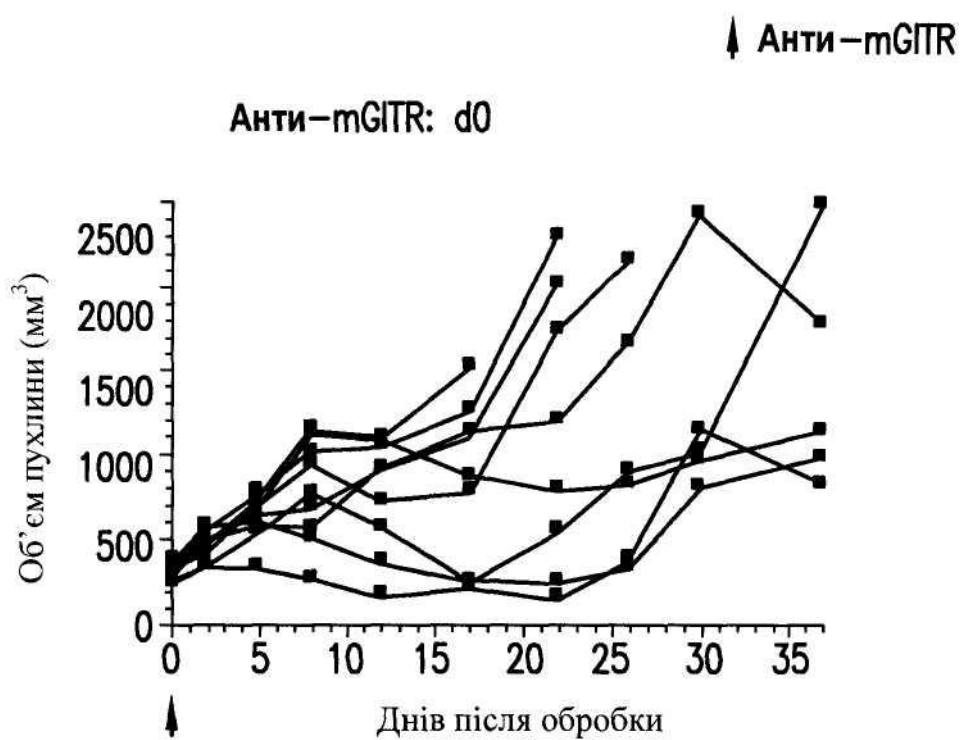
Фіг. 1С



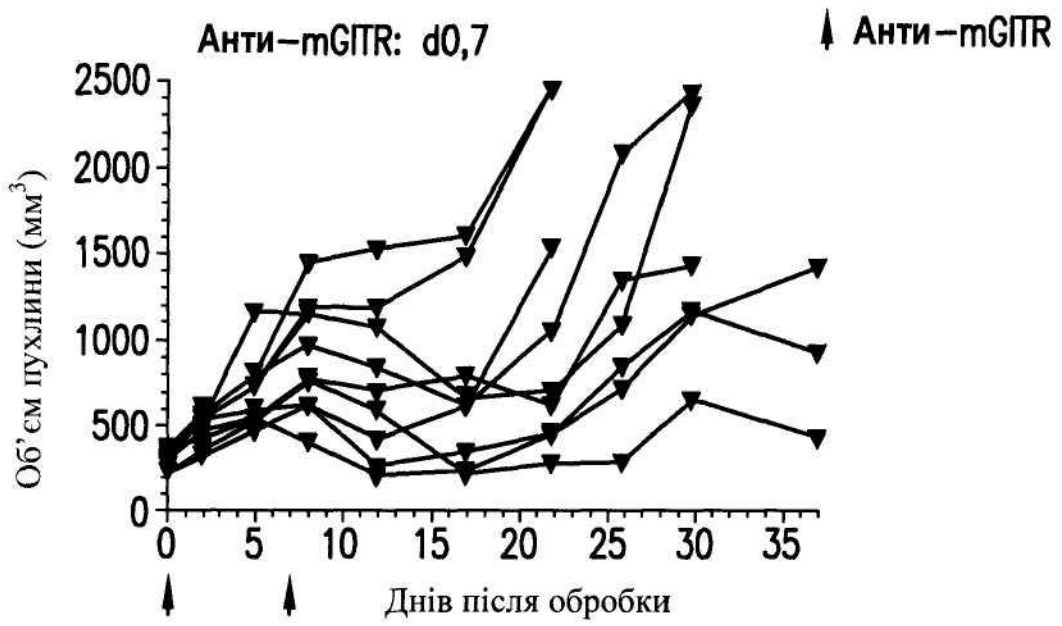
Фіг. 1D



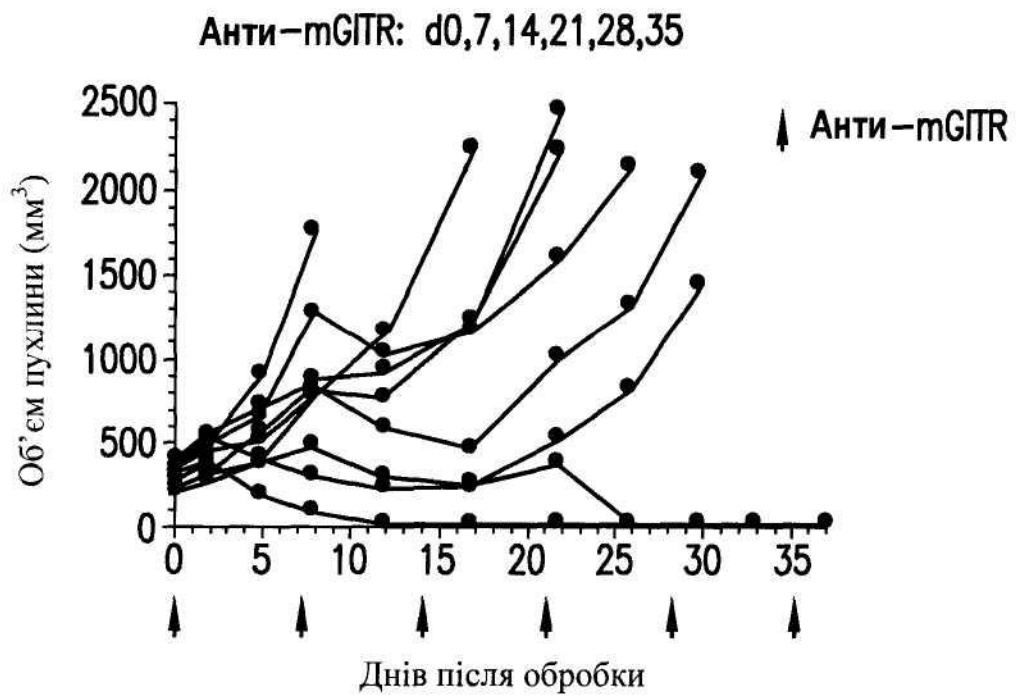
Фіг. 1Е



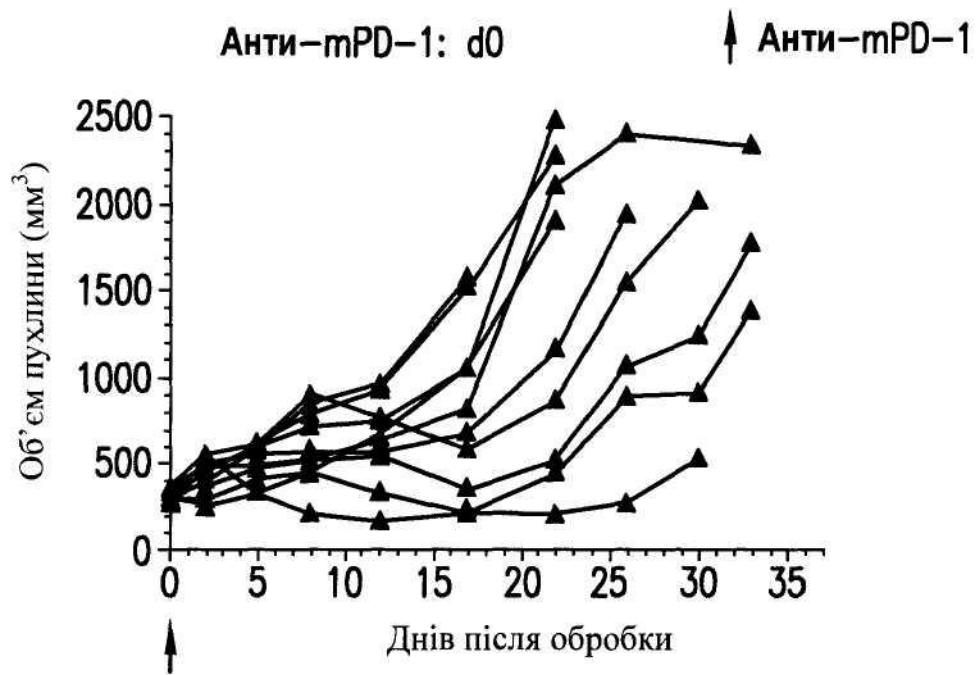
Фіг. 1F



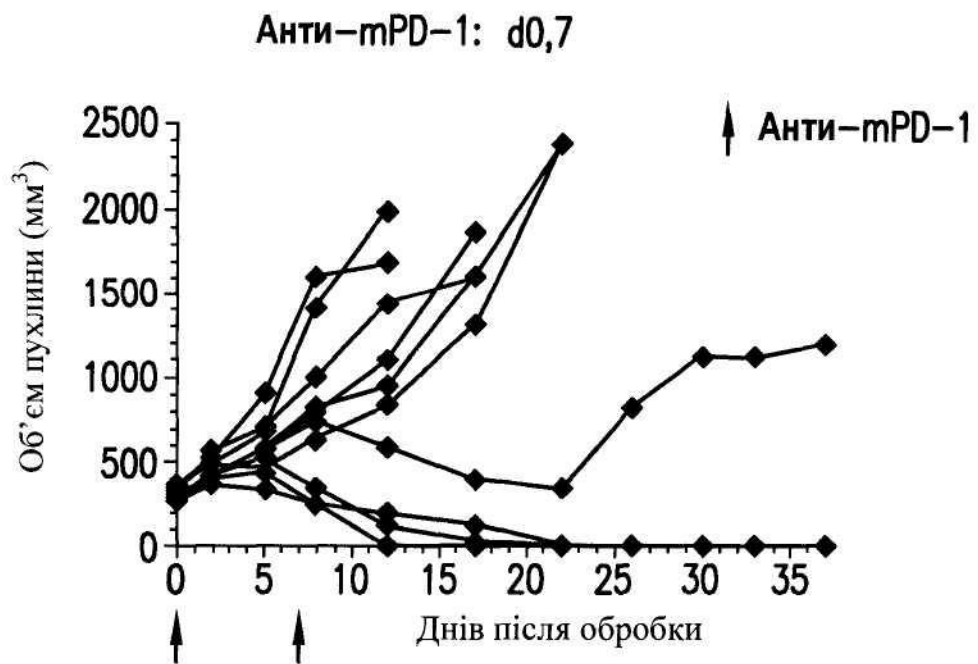
Фіг. 1Г



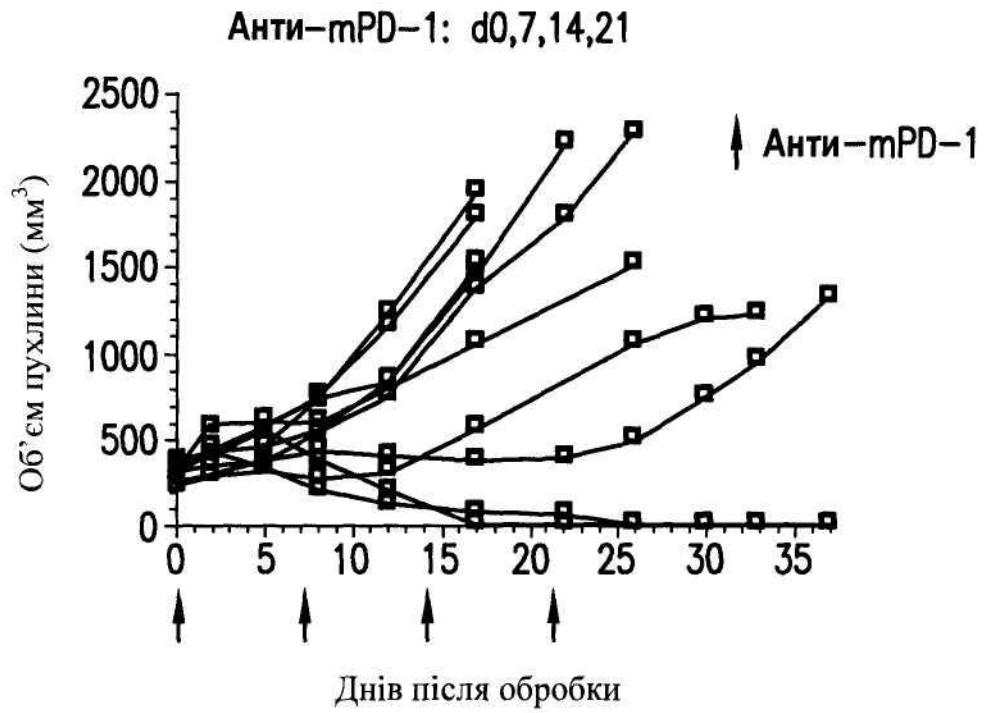
Фіг. 1Н



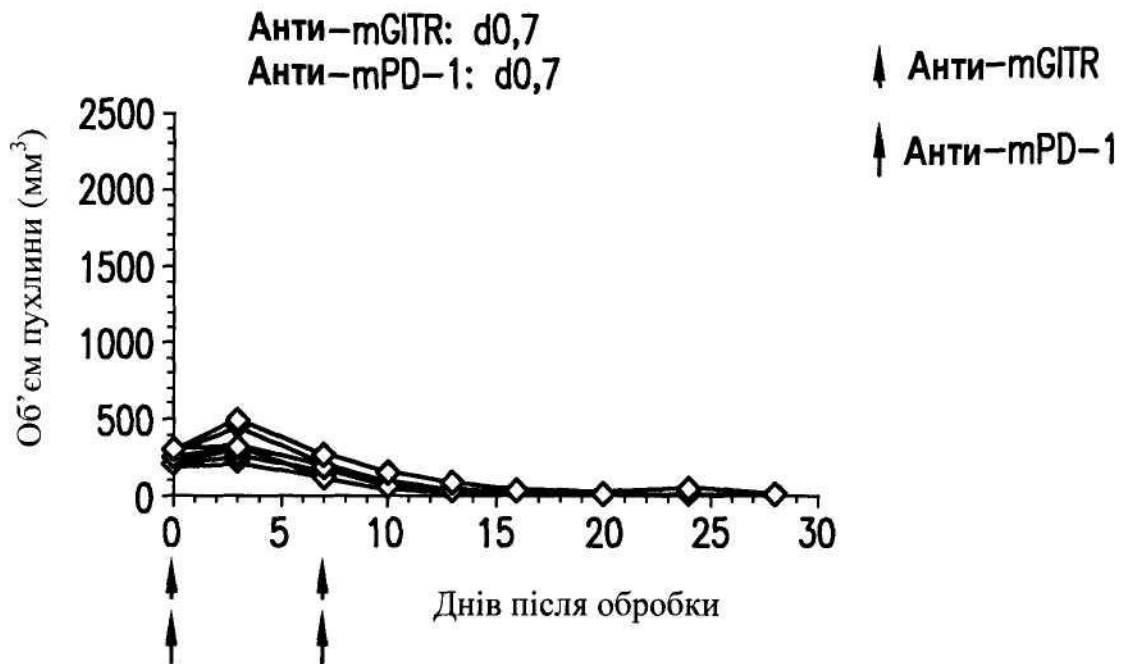
Фіг. 1I



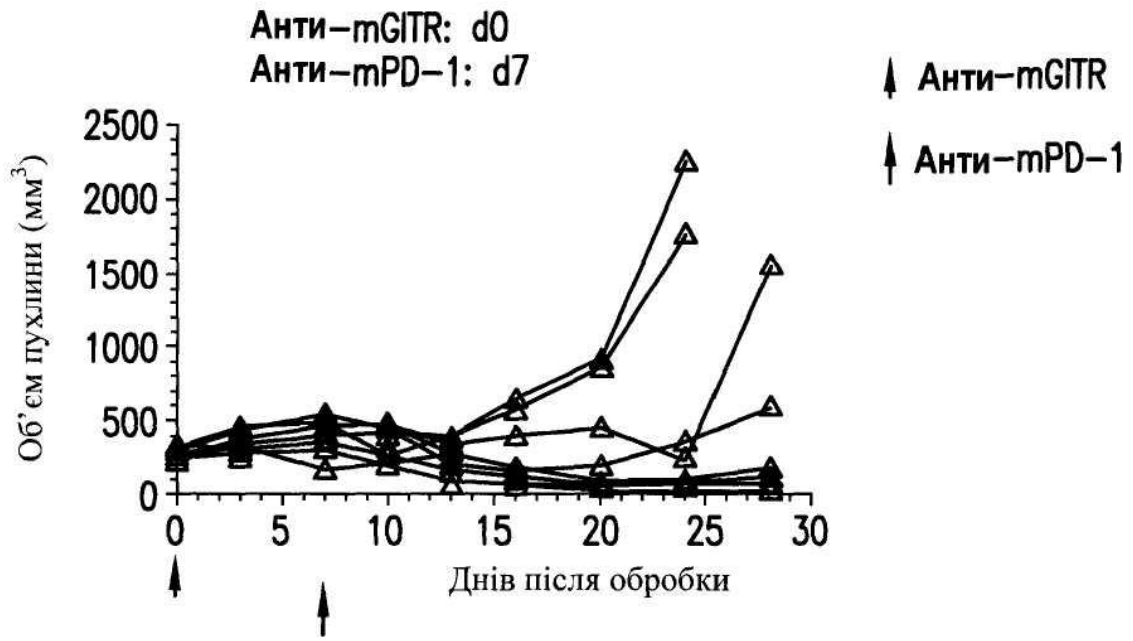
Фіг. 1J



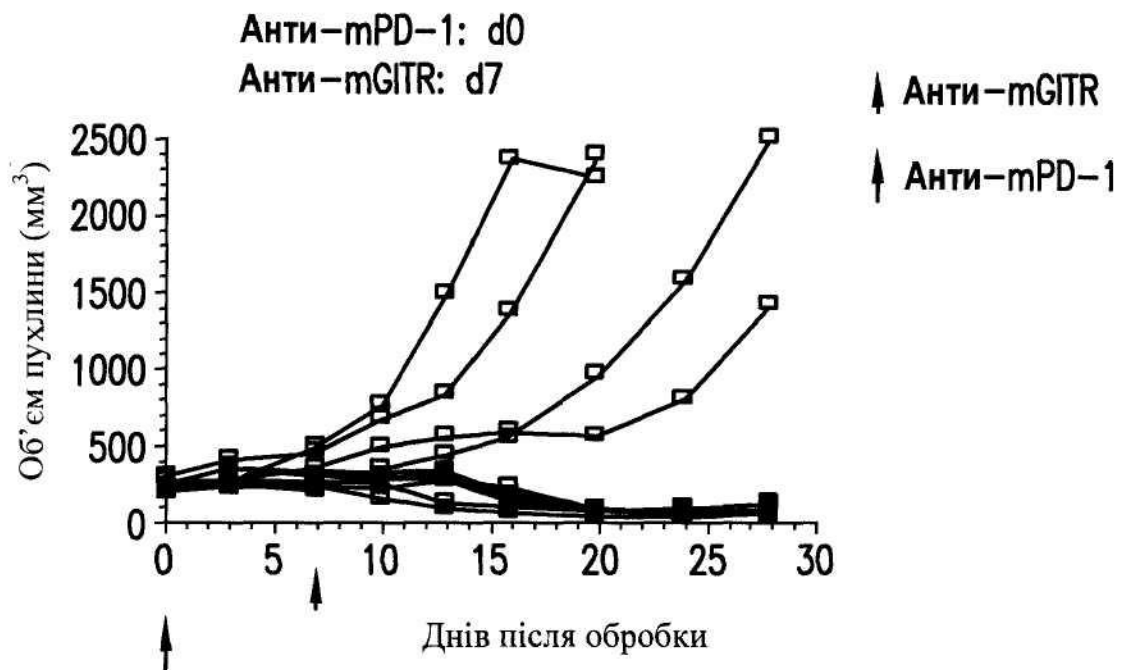
Фіг. 1К



Фіг. 2А



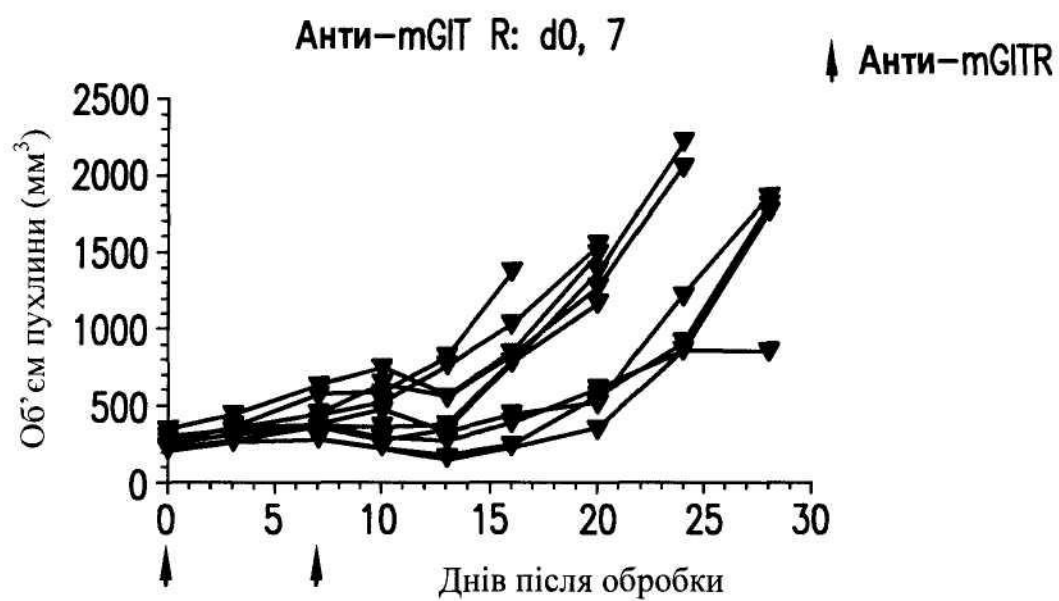
Фіг. 2В



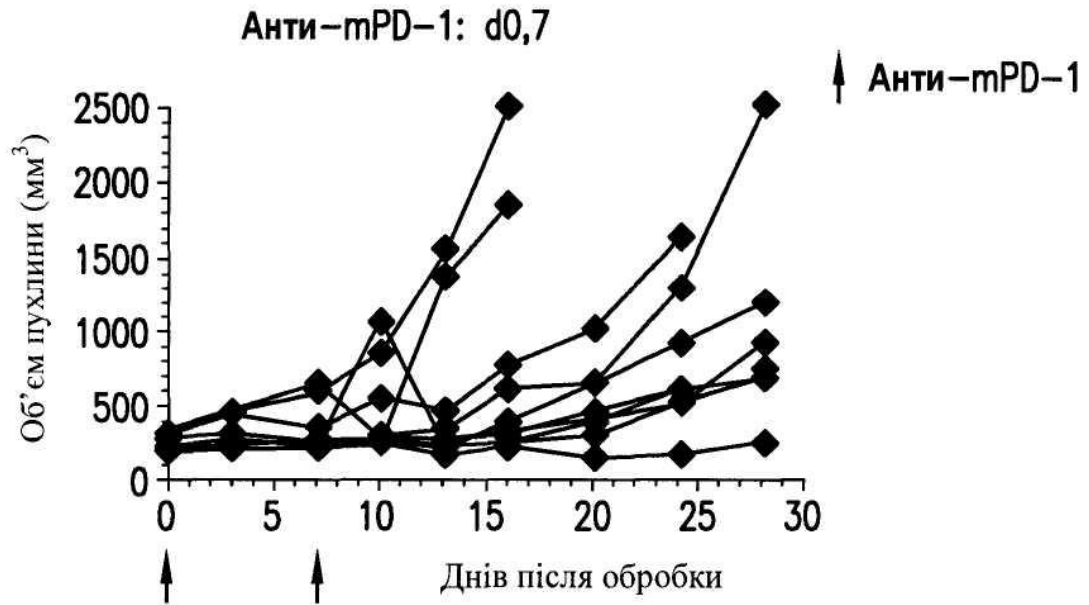
Фіг. 2С



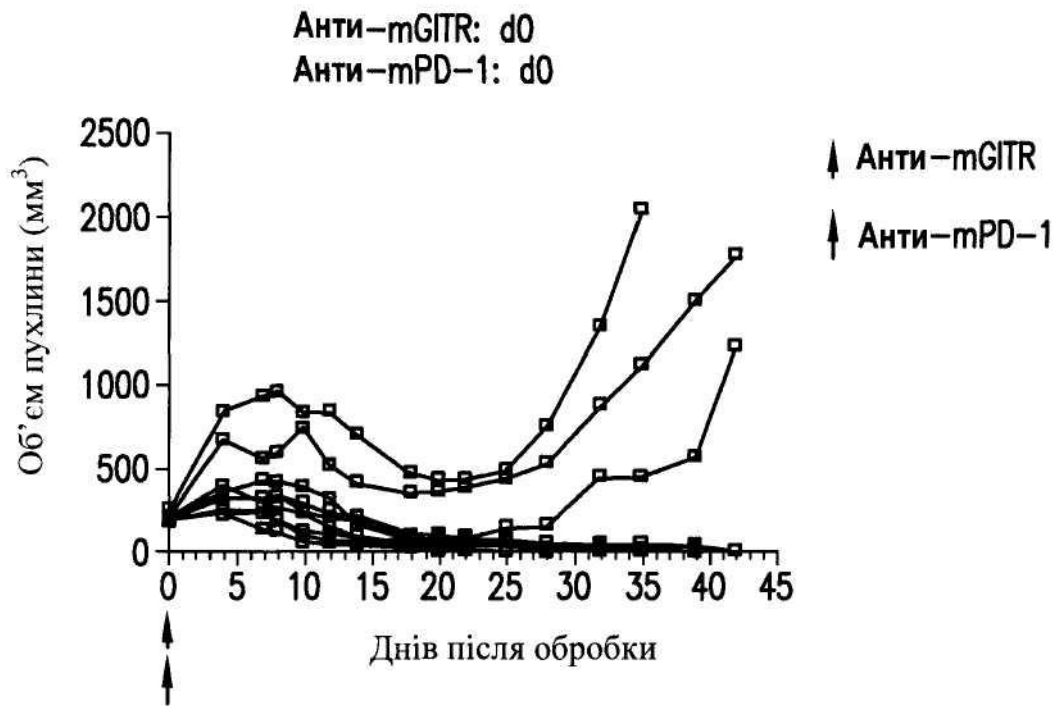
Фіг. 2D



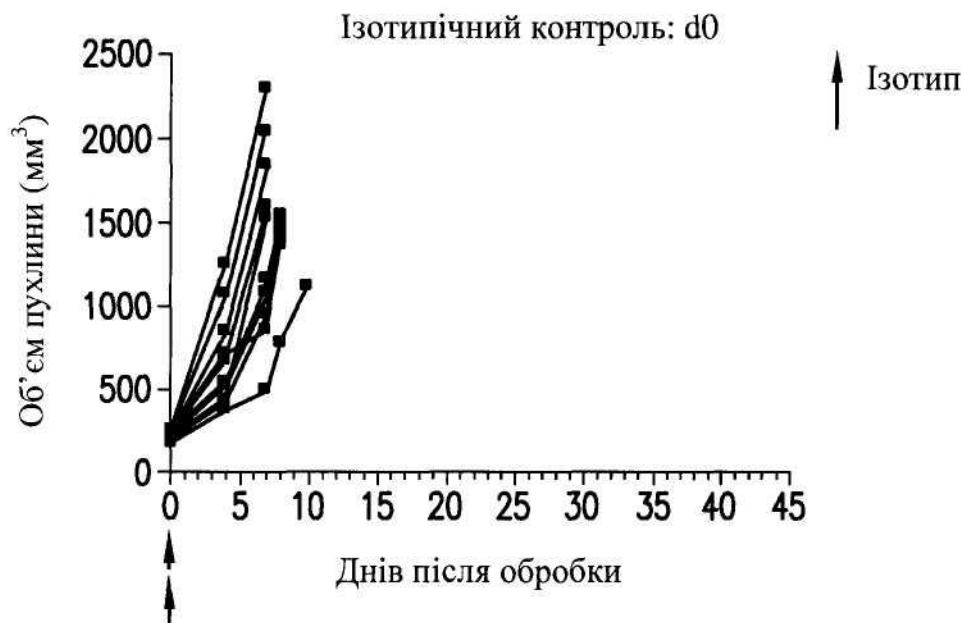
Фіг. 2E



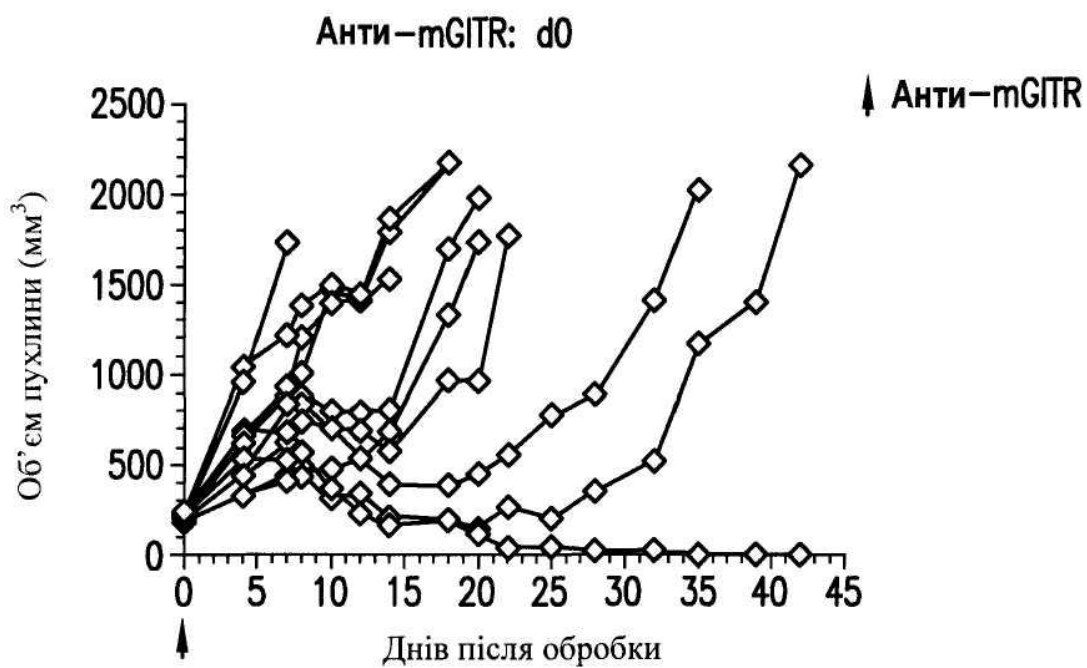
Фіг. 2F



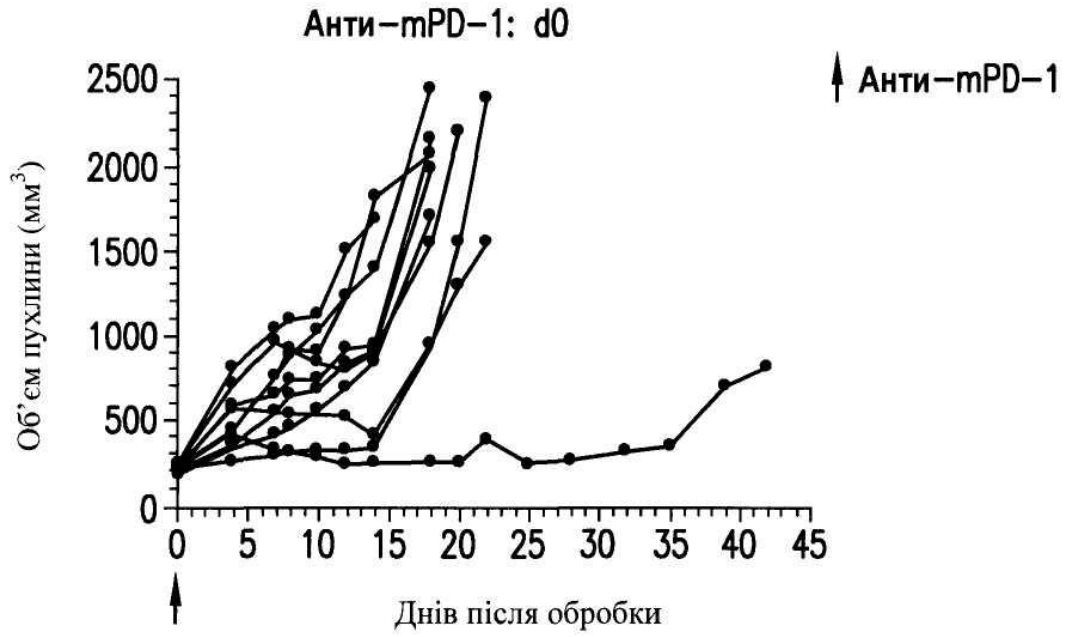
Фіг. 3A



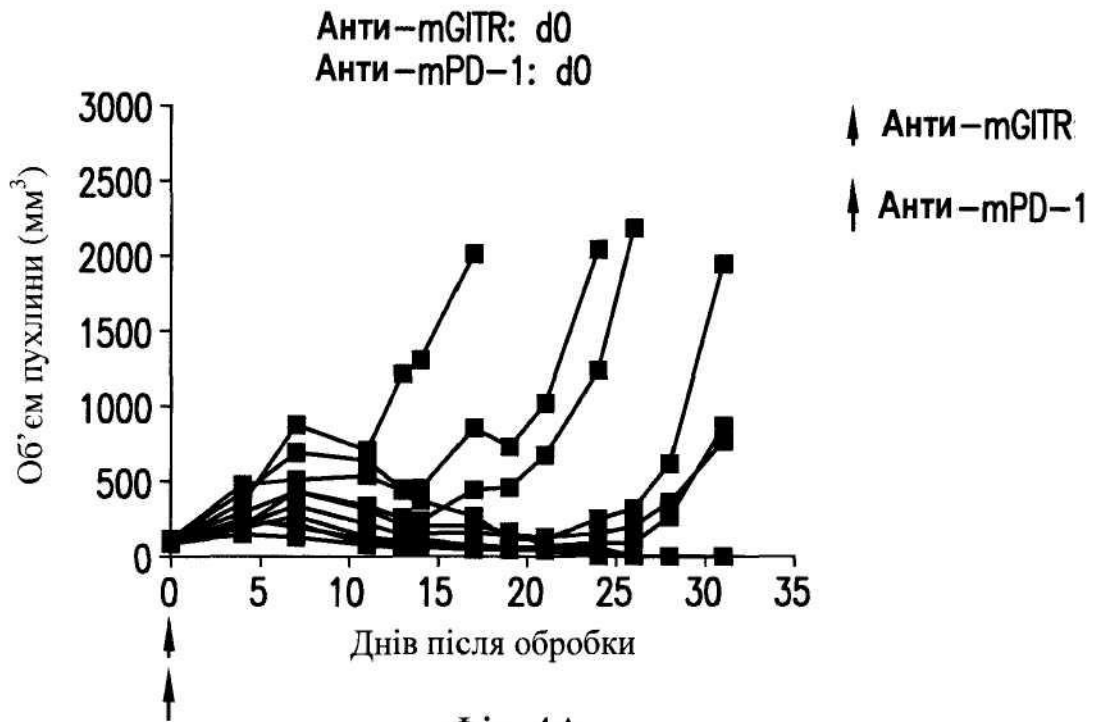
Фіг. 3В



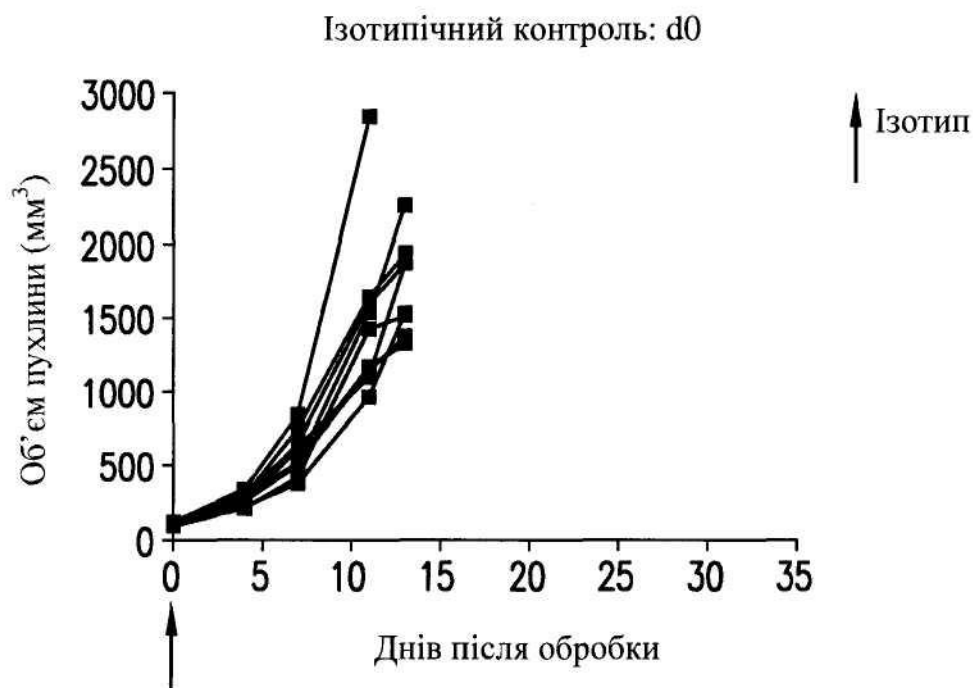
Фіг. 3С



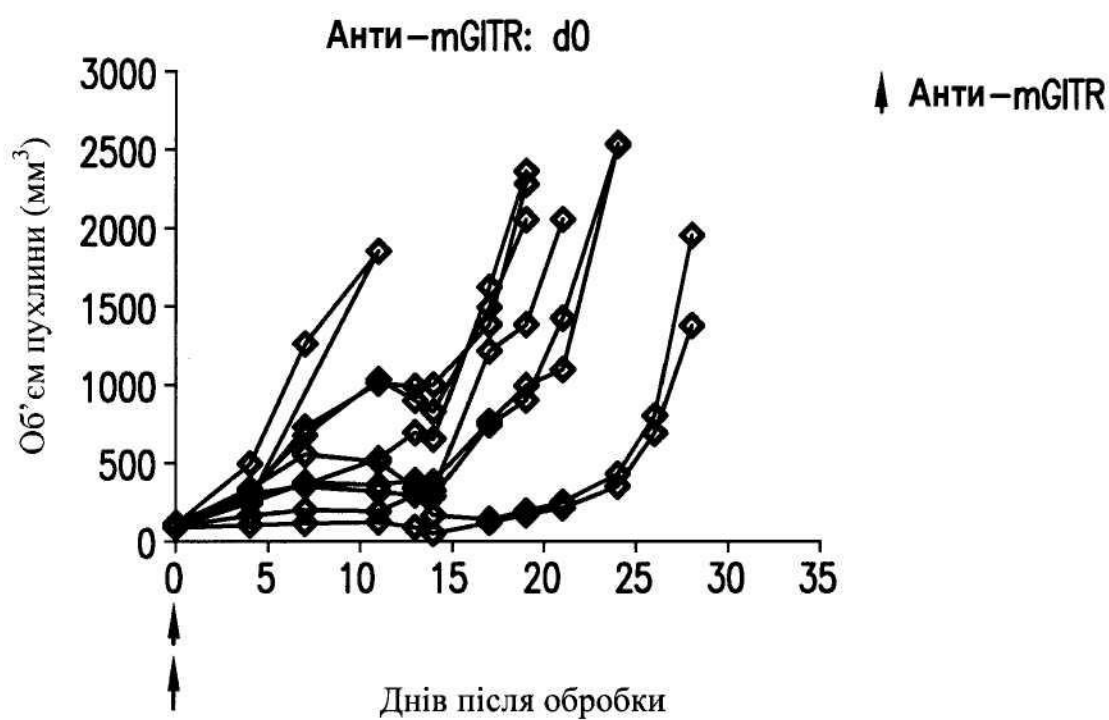
Фіг. 3D



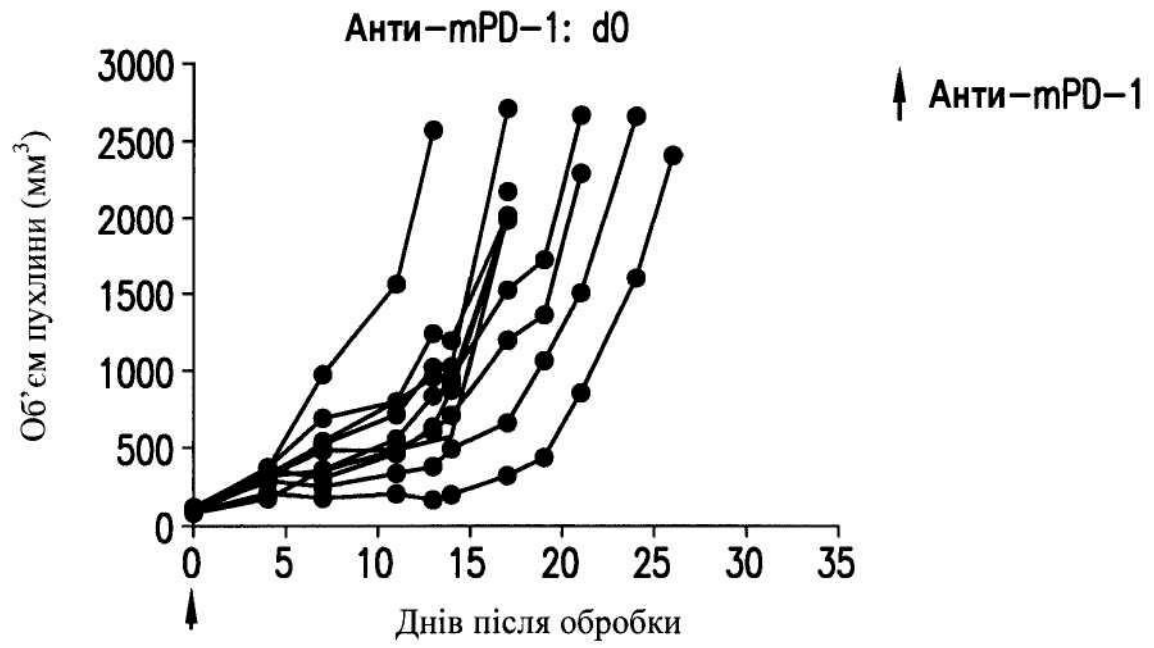
Фіг. 4A



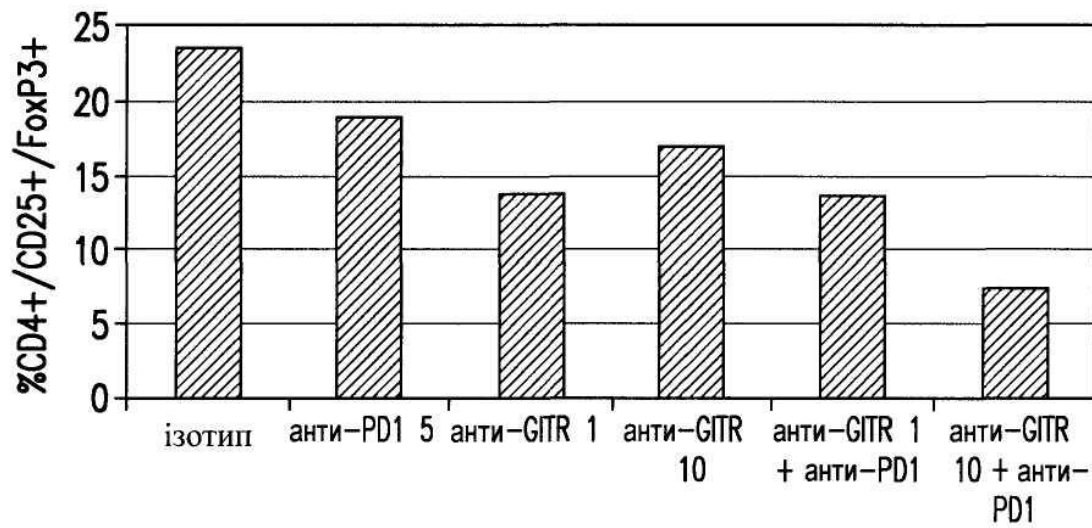
Фіг. 4В



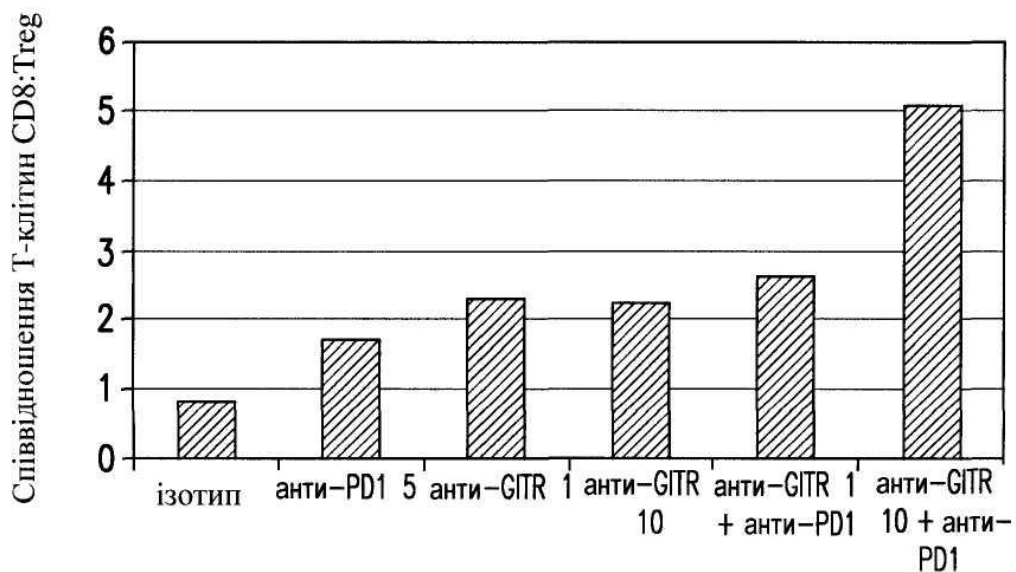
Фіг. 4С



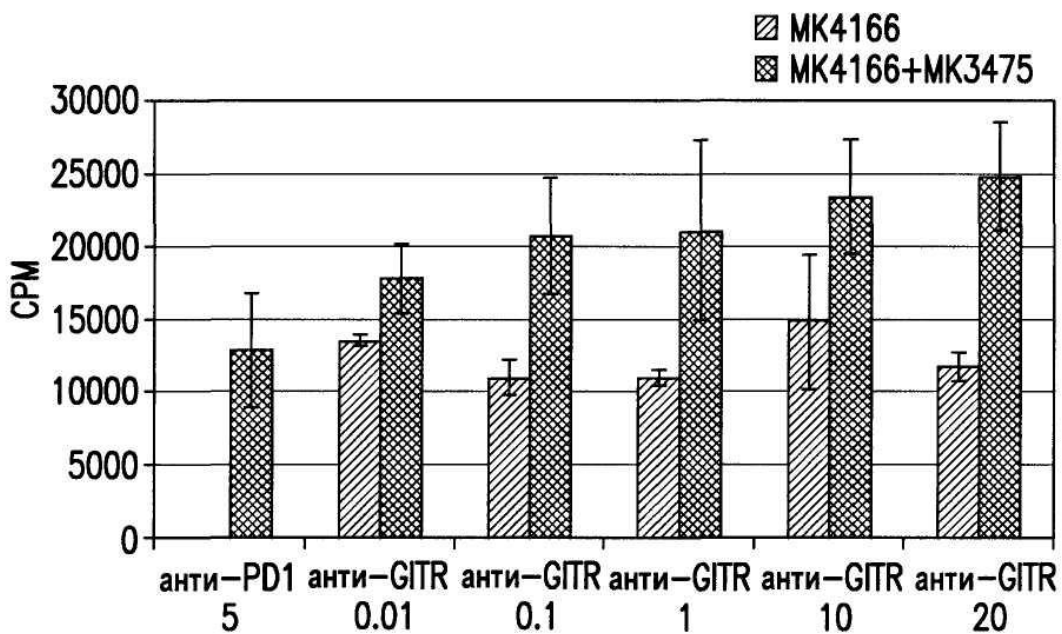
Фіг. 4D



Фіг. 5A



Фіг. 5В



Фіг. 6

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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