

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992402 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.02.19

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.04.05

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ ИЛТ4 И АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ФРАГМЕНТЫ

(31) 62/483,019

(32) 2017.04.07

(33) US

(86) PCT/US2018/026160

(87) WO 2018/187518 2018.10.11

(71) Заявитель:
МЕРК ШАРП И ДОУМ КОРП.,
ЭЙДЖЕНУС ИНК. (US)

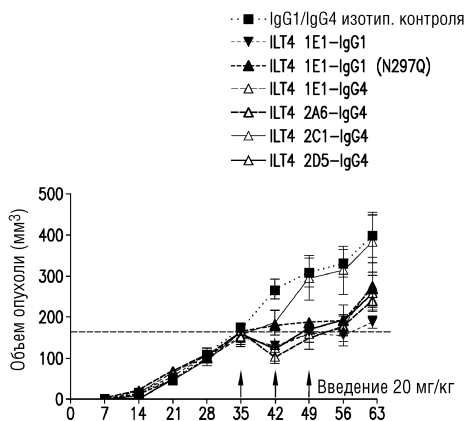
(72) Изобретатель:

Сунига Луис А., Джойс-Шапкх
Барбара, Блануша Милан, Шустер
Андреа Клаудиа, Шульце Корнелиа
(US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, связывающимся с ИЛТ4 (иммуноглобулин-подобным транскриптом 4), и их комбинациям, например, с антителом против PD1. Настоящее изобретение также относится к способам их применения, например, в лечении или профилактике злокачественного новообразования у индивидуума и способам получения таких антител и фрагментов.



201992402

A1

A1

201992402

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420–559113ЕА/045

АНТИТЕЛА ПРОТИВ ILT4 И АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ФРАГМЕНТЫ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет по временной заявке США № 62/483019, поданной 7 апреля 2017 года, описание которой включено в настоящее описание в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, связывающимся с иммуноглобулин-подобным транскриптом 4 (ILT4), а также способам получения и применения таких антител и антигенсвязывающих фрагментов, например, для лечения заболеваний, таких как злокачественные новообразования.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Распространенная стратегия, используемая опухолевыми клетками для избегания врожденного и адаптивного иммунного ответа, ассоциирована с аномальной экспрессией лейкоцитарного антигена человека (HLA)–G (Curigliano et al. Clin Cancer Res. 2013 и Gonzalez et al. Crit Rev Clin Lab Sci. 2012). HLA–G может напрямую ингибировать функционирование иммунных клеток посредством связывания рецепторов и/или трофоцитоза и нарушения хемотаксиса (Morandi et al. Cytokine Growth Factor Review. 2014 и Lin et al. Mol Med. 2015). Его высокая экспрессия в различных типах опухолей, включая например, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, эндометрия, легких, молочной железы, яичника и желудка, ассоциирована с поздней стадией заболевания, инвазивностью опухоли, метастатическим потенциалом и неблагоприятным прогнозом (Lin et al. Mol Med. 2015. и Loumange et al. Int J Cancer. 2014). Показано, что антитело–опосредованная блокада функционирования HLA–G в моделях на трансгенных мышах ингибирует развитие опухоли и блокирует экспансию супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC) (Loumange et al. Int J Cancer. 2014., Lin et al. Hum Immunol. 2013., и Aagaue et al. Blood. 2011). Связывание HLA–G с ILT4 может напрямую ингибировать функционирование моноцитов, дендритных клеток и нейтрофилов, таким образом, нарушая врожденный противоопухолевый иммунный ответ. Взаимодействие между HLA–G и моноцитами, обусловленное ILT4, ингибирует созревание антигенпрезентирующих клеток (АПК) моноцитарного происхождения человека, что приводит к сниженной экспрессии антигенов МНС класса II и костимуляторных молекул в результате активации Stat3 (Colonna et al. J Immunol. 1998; Allan et al. J Exp Med. 1999, и Liang et al. Proc Natl Sci USA. 2008). При использовании дендритных клеток (DC) моноцитарного происхождения человека и ILT4–трансгенных мышей показано, что HLA–G индуцирует развитие толерогенных АПК и арест созревания/активации миелоидных DC, и индукция толерогенных DC под действием HLA–G происходила посредством нарушения пути презентирования МНС класса II (Ristich et al. Eur J Immunol. 2005).

У пациентов, не отвечающих на Т-клеточную терапию, но которые могут получить пользу от уменьшения опосредованной тканевыми макрофагами/MDSC толерантности опухоли (например, "богатых" миелоидными клетками опухолей), есть неудовлетворенная потребность в лечении. С помощью блокады ILT4 можно удовлетворить эту потребность, и она будет отличаться от существующих направленных на Т-клетки антител (например, против PD1, против TIMP) уменьшением супрессии толерогенных миелоидных клеток в микроокружении опухоли.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, связывающимся с ILT4 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с одним или более аминокислотными остатками в эпитопе ILT4 человека, выбранном из группы, состоящей из LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59), TRIRPEL (SEQ ID NO: 60), NGQF (SEQ ID NO: 61) и HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент защищает эпитоп от дейтерообмена с источником дейтерия, таким как D₂O. В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с одним или более аминокислотными остатками в эпитопе LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59). В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с одним или более аминокислотными остатками в эпитопе TRIRPEL (SEQ ID NO: 60). В еще одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с одним или более аминокислотными остатками в эпитопе NGQF (SEQ ID NO: 61). В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с одним или более аминокислотными остатками в эпитопе HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62). В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с одним или более аминокислотными остатками в двух, трех или четырех эпитопах ILT4, выбранных из группы, состоящей из LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59), TRIRPEL (SEQ ID NO: 60), NGQF (SEQ ID NO: 61) и HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62). В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с одним или более аминокислотными остатками в эпитопе LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59) и защищает эпитоп от дейтерообмена с источником дейтерия, таким как D₂O. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с одним или более аминокислотными остатками в эпитопе TRIRPEL (SEQ ID NO: 60) и защищает эпитоп от дейтерообмена с источником дейтерия, таким как D₂O. В еще одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с одним или более аминокислотными остатками в эпитопе NGQF (SEQ ID NO: 61) и защищает эпитоп от дейтерообмена с источником дейтерия, таким как D₂O. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с одним или более аминокислотными остатками в эпитопе HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62) и защищает эпитоп от дейтерообмена с источником дейтерия, таким как D₂O. В другом

варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с одним или более аминокислотными остатками в двух, трех или четырех эпитопах ILT4, выбранных из группы, состоящей из LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59), TRIRPEL (SEQ ID NO: 60), NGQF (SEQ ID NO: 61) и HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62), и защищает эпитопы от дейтерообмена с источником дейтерия, таким как D₂O.

Настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с тем же эпитопом ILT4 человека, что и любое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом ILT4 человека, что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, приведенные в SEQ ID NO: 1 и 3; 2 и 4; 2 и 5; 2 и 6; 2 и 7; 2 и 3; 8 и 11; 9 и 11; 10 и 11; 12 и 13; 14 и 15; 79 и 3; 80 и 4; 80 и 5; 80 и 6; 80 и 7; 80 и 3; 82 и 11; 83 и 11; 84 и 11; 85 и 13; и 86 и 15; соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом ILT4 человека, что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотные последовательности вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи, приведенные в SEQ ID NO: 63 и 70; 57 и 71; 57 и 72; 57 и 73; 57 и 58; 57 и 70; 64 и 74; 65 и 74; 66 и 74; 67 и 75; 68 и 76; соответственно.

Настоящее изобретение дополнительно относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, конкурирующему за связывание с ILT4 человека с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленными в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с ILT4 человека с антителом или фрагментом, содержащим аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, приведенные в SEQ ID NO: 1 и 3; 2 и 4; 2 и 5; 2 и 6; 2 и 7; 2 и 3; 8 и 11; 9 и 11; 10 и 11; 12 и 13; 14 и 15; 79 и 3; 80 и 4; 80 и 5; 80 и 6; 80 и 7; 80 и 3; 82 и 11; 83 и 11; 84 и 11; 85 и 13; и 86 и 15; соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с ILT4 человека с антителом или фрагментом, содержащим аминокислотные последовательности вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи, приведенные в SEQ ID NO: 63 и 70; 57 и 71; 57 и 72; 57 и 73; 57 и 58; 57 и 70; 64 и 74; 65 и 74; 66 и 74; 67 и 75; 68 и 76; соответственно.

Кроме того, настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с ILT4 человека содержащему: (a) определяющую комплементарность область–L1 (CDR–L1), определяющую комплементарность область–L2 (CDR–L2) и определяющую комплементарность область–L3 (CDR–L3) вариабельного домена (V_L) легкой цепи иммуноглобулина, содержащие аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3–7, 11, 13, 15 или 45; и/или (b) определяющую комплементарность область–H1 (CDR–H1), определяющую

комплементарность область–H2 (CDR–H2) и определяющую комплементарность область–H3 (CDR–H3) вариабельного домена (V_H) тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащие аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, 2, 8–10, 12, 14, 44 или 79–86.

В варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (1) домен V_H , содержащий: CDR–H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR–H2: EINHSGSTNYPNPSLKS, где X является S или A (SEQ ID NO: 17), и CDR–H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR–L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR–L2: GX₁X₂NRPS; где X₁ является S или A, и X₂ является N, Q, E или D (SEQ ID NO: 20), и CDR–L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21); (2) домен V_H , содержащий: CDR–H1: SYAIS (SEQ ID NO: 22), CDR–H2: GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 23) и CDR–H3: YFX₁X₂SGWYKGGAFDI; где X₁ является D или S, и X₂ является S или A (SEQ ID NO: 24), и/или домен V_L , содержащий: CDR–L1: TLRSGINVDITYRIH (SEQ ID NO: 25), CDR–L2: YKSDSDKHQGS (SEQ ID NO: 26) и CDR–L3: AIWYSSTWV (SEQ ID NO: 27); (3) домен V_H , содержащий: CDR–H1: SYAMH (SEQ ID NO: 28), CDR–H2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 29) и CDR–H3: VGEWIQLWSPFDY (SEQ ID NO: 30), и/или домен V_L , содержащий: CDR–L1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO: 31), CDR–L2: AASSLQS (SEQ ID NO: 32) и CDR–L3: QQYNSYPPT (SEQ ID NO: 33); и/или (4) домен V_H , содержащий: CDR–H1: ELSMH (SEQ ID NO: 34), CDR–H2: GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 35) и CDR–H3: AGPLYTIFGVVIIPDNWFDP (SEQ ID NO: 36), и/или домен V_L , содержащий: CDR–L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 37), CDR–L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 38) и CDR–L3: QSYDSSLSGSGVV (SEQ ID NO: 39).

В одном из вариантов осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR–H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR–H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR–H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); и/или, домен V_L , содержащий: CDR–L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR–L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 49) и CDR–L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR–H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR–H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR–H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR–L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR–L2: GQSNRPS (SEQ ID NO: 50) и CDR–L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В еще одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR–H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR–H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR–H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR–L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR–L2: GESNRPS (SEQ ID NO: 51) и CDR–L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR–H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR–

H2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDSNRPS (SEQ ID NO: 52) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNANRPS (SEQ ID NO: 53) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQANRPS (SEQ ID NO: 54) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В еще одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GEANRPS (SEQ ID NO: 55) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDANRPS (SEQ ID NO: 56) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 49) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQSNRPS (SEQ ID NO: 50) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В еще одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GESNRPS (SEQ ID NO: 51) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-

H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDSNRPS (SEQ ID NO: 52) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H, содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNANRPS (SEQ ID NO: 53) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H, содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQANRPS (SEQ ID NO: 54) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В еще одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H, содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GEANRPS (SEQ ID NO: 55) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H, содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDANRPS (SEQ ID NO: 56) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь иммуноглобулина, тяжелую цепь иммуноглобулина, или и легкую, и тяжелую цепь иммуноглобулина, где легкая цепь иммуноглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности аминокислотных последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 11, 13, 15 или 45, и/или тяжелая цепь иммуноглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности аминокислотных последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, 2, 8, 9, 10, 12, 14, 44, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 или 86.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь иммуноглобулина, тяжелую цепь иммуноглобулина, или и легкую, и тяжелую цепь иммуноглобулина, где легкая цепь иммуноглобулина содержит переменный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичности аминокислотных последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 70, 71, 72, 73, 58, 74, 75, 76 или 77, и/или тяжелая цепь иммуноглобулина содержит переменный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичности аминокислотных последовательностей по

отношению к аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 63, 57, 64, 65, 66, 67, 68 или 69.

В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь иммуноглобулина, тяжелую цепь иммуноглобулина или и легкую, и тяжелую цепь иммуноглобулина, где легкая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 11, 13, 15 или 45; и/или тяжелая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, 2, 8, 9, 10, 12, 14, 44, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 или 86.

В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь иммуноглобулина, тяжелую цепь иммуноглобулин или и легкую, и тяжелую цепь иммуноглобулина, где переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70, 71, 72, 73, 58, 74, 75, 76 или 77, и/или переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 63, 57, 64, 65, 66, 67, 68 или 69.

Кроме того, настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему любой из следующих наборов тяжелых цепей иммуноглобулина и легких цепей иммуноглобулина: (1) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3; (2) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4; (3) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5; (4) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6; (5) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7; (6) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3; (7) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11; (8) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11; (9) тяжелую цепь

[illegible]

Кроме того, настоящее изобретение относится к антителу или его

антигенсвязывающему фрагменту, содержащему любой из следующих наборов переменных доменов тяжелой цепи и переменных доменов легкой цепи: (1) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 63, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70; (2) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71; (3) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 72; (4) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73; (5) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58; (6) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70; (7) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 64, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74; (8) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 65, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74; (9) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 66, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74; (10) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 67, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75; или (11) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 68, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен V_H , содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57; и домен V_L , содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58.

В другом предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2; и легкую цепь

иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7.

В другом предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80; и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7.

В одном из вариантов осуществления антитело состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где каждая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58, и каждая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57.

В другом варианте осуществления антитело состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где каждая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58, и каждая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, где легкая цепь дополнительно содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90.

В еще одном варианте осуществления антитело состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где каждая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58, и каждая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, где тяжелая цепь дополнительно содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89.

В другом варианте осуществления антитело состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где каждая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58, и каждая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, где легкая цепь дополнительно содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90, и тяжелая цепь дополнительно содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89.

В одном из вариантов осуществления антитело состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где каждая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и каждая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

В другом варианте осуществления антитело состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где каждая легкая цепь состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7, и каждая тяжелая цепь состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2.

В варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является гликозилированным, например, со N-связанными гликанами сконструированных дрожжей или N-связанными гликанами клеток яичника китайского

хомьяка (CHO). В варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является антителом.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит терапевтическое средство (например, пембролизумаб). В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. В других вариантах осуществления композиция дополнительно содержит терапевтическое средство (например, пембролизумаб) и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция содержит: (i) антитело, состоящее из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где каждая легкая цепь состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7, и каждая тяжелая цепь состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2, и (ii) пембролизумаб.

Настоящее изобретение дополнительно относится к полипептиду (например, выделенному полипептиду), включающему легкую цепь иммуноглобулина и/или тяжелую цепь иммуноглобулина или их переменный домен из любого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в настоящем описании. Например, в варианте осуществления изобретения полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1–39, 44, 45, 47–58, 63–77 и 79–86. Настоящее изобретение также относится к любому полинуклеотиду (например, ДНК или РНК), кодирующему любой полипептид, представленный в настоящем описании. В другом аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему полинуклеотид, представленный в настоящем описании. Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину (например, клетке CHO), содержащей полинуклеотид или вектор, представленный в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится к способу блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F, например, *in vitro* или *in vivo*, например, в организме нуждающегося в этом индивидуума (например, человека), включающий введение индивидууму эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F дополнительно включает осуществление терапевтического способа (например, противоопухолевой лучевой терапии или хирургической резекции) в отношении индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F дополнительно включает введение индивидууму терапевтического средства (например, пембролизумаба). В других вариантах осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F дополнительно включает осуществление терапевтического способа

(например, противоопухолевой лучевой терапии или хирургической туморэктомии) и введение индивидууму терапевтического средства (например, пембролизумаба).

Настоящее изобретение также относится к способу лечения злокачественного новообразования у индивидуума (например, человека), включающий введение индивидууму эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления способ лечения злокачественного новообразования дополнительно включает осуществление терапевтического способа (например, противоопухолевой лучевой терапии или хирургической туморэктомии) в отношении индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ лечения злокачественного новообразования дополнительно включает введение индивидууму терапевтического средства (например, пембролизумаба). В других вариантах осуществления способ лечения злокачественного новообразования дополнительно включает осуществление терапевтического способа (например, противоопухолевой лучевой терапии или хирургической туморэктомии) и введение индивидууму терапевтического средства (например, пембролизумаба).

Настоящее изобретение также относится к способу получения антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, или его иммуноглобулиновой цепи (например, его V_H и/или V_L), включающему культивирование клетки-хозяина (например, клетки CHO), содержащей полинуклеотид (например, где полинуклеотид находится в векторе и/или встроен в одну или более хромосом клетки-хозяина), кодирующий антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или его иммуноглобулиновую цепь, для экспрессии антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, или его иммуноглобулиновой цепи.

Настоящее изобретение также относится к способу получения антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, или его иммуноглобулиновой цепи (например, его V_H и/или V_L), включающему: экспрессию полинуклеотида, кодирующего антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или его иммуноглобулиновую цепь.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающиеся с ПЛТ4 человека, или его иммуноглобулиновая цепь, являющаяся продуктом указанного способа, также является частью настоящего изобретения.

Способ детекции наличия пептида ПЛТ4 или его фрагмента в образце также является частью настоящего изобретения. Способ включает приведение образца в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению и детекцию наличия комплекса антитела или антигенсвязывающего фрагмента и пептида ПЛТ4 или его фрагмента, где детекция комплекса свидетельствует о наличии пептида ПЛТ4 или его фрагмента. В варианте осуществления изобретения способ осуществляют *in vitro*, например, в биологическом образце, например, хирургическом биоптате или образце крови, индивидуума. В другом варианте осуществления способ осуществляют *in vivo*, например, в организме индивидуума. В еще одном варианте осуществления индивидуум

является человеком.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. Тепловая карта мечения дейтерием связывания p1E1(G1) с ILT4-His.

На **фигурах 2А и 2В** показана кристаллическая структура ILT4 человека. На **фигуре 2А** показаны уровни мечения дейтерием, картированные на структуре ILT4 человека. На **фигуре 2В** показана кристаллическая структура доменов 1 и 2 ILT4 человека в комплексе с HLA-G. Указаны ILT4, тяжелая цепь HLA-G и бета-2-микроглобулин. Указаны эпитопы ILT4 человека, содержащие остатки LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59), TRIRPEL (SEQ ID NO: 60), NGQF (SEQ ID NO: 61) и HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62).

На **фигурах 3А и 3В** показано связывание ILT4 с HLA-G и блокада 1E1 (G4). Т-клетки мыши 3А9, трансфицированные с использованием ILT4 человека, блокировали с помощью блокады Fc, а затем инкубировали с титруемыми концентрациями 1E1 (G4) (начиная с 27 мкг/мл, разведения 1:3) или с изотипическим контролем hIgG4 (27 мкг/мл).

Фигура 3А. 1E1 (G4) или hIgG4 определяли с использованием меченого флуорохромом антитела козы против F(ab')₂ человека и проточной цитометрии. **Фигура 3В.** После предварительной обработки 1E1 (G4) клетки инкубировали с 2 мкг/мл биотинилированного HLA-Fc или контрольного Fc (mVISTA-Fc). Связывание Fc определяли с использованием PE-конъюгированного стрептавидина и проточной цитометрии. Представленные графики соответствуют 3 независимым экспериментам. Представленные значения IC₅₀ и EC₅₀ являются средними значениями для этих экспериментов +/- стандартное отклонение.

Фигура 4. Блокада связывания не-HLA-G МНС класса I с ILT4 и p1E1 (G1). Т-клетки мыши 3А9, трансфицированные с использованием ILT4 человека, предварительно обрабатывали титруемыми концентрациями p1E1 (G1) (начиная с 10 мкг/мл, разведения 1:3) или изотипическим контролем hIgG1 (10 мкг/мл) перед инкубацией с мечеными флуорохромом тетрамерами HLA-F или CD1d или мечеными флуорохромом дексамерами HLA*A2:01 или HLA*B7:02. Связывание тетрамеров/дексамеров определяли посредством проточной цитометрии и для каждого строили график средней интенсивности флуоресценции. Разведения/концентрации, используемые для каждого дексамера/тетрамера являются следующими: HLA*A2:01-дексамер PE: 1:25; HLA*B7:02-дексамер FITC: 1:25; CD1d-тетрамер PE: 1:50; HLA-F-тетрамер PE: 1 мкг/мл.

Фигуры 5А–5С. Блокада связывания ANGPTL с ILT4 и p1E1(G1). **Фигура 5А.** Биотинилированные белки ANGPTL предварительно инкубировали в течение 20 мин. с p1E1 (G1) или IgG1 человека, конечная концентрация каждого составляла 20 мкг/мл. Затем растворы добавляли к Т-клеткам мыши 3А9, трансфицированным с использованием ILT4 человека, и инкубировали в течение еще 30 минут. Связывание ANGPTL определяли с использованием PE-конъюгированного стрептавидина и анализировали посредством проточной цитометрии. Также добавляли PE-меченый тетрамер HLA-G в качестве положительного контроля связывания/блокирования ILT4. Белки ANGPTL приобретали в R&D SYSTEMS и биотинилировали; **фигура 5В.** Т-клетки

мышь 3A9, трансфицированные с использованием ILT4 человека, блокировали с помощью блокирования Fc, затем инкубировали с 20 мкг/мл p1E1 (G1) или hIgG1 изотипического контроля. После инкубации определяли p1E1 (G1) или hIgG1 с помощью меченого флуорохромом антитела козы против F(ab')₂ человека и анализировали посредством проточной цитометрии; **фигура 5C**. Т-клетки 3A9 с контрольным вектором использовали в качестве отрицательного контроля связывания ANGPTL. Клетки обрабатывали, как описано в (A), за исключением того, что не осуществляли обработку антителом.

Фигуры 6A и 6B. Специфичность связывания 1E1(G4) семейства ILT. Т-клетки мыши 3A9, трансфицированные с использованием членов семейства ILT человека, полученных из консенсусных последовательностей, опубликованных в базе данных Uniprot, использовали для тестирования связывания антитела hIgG4 изотипического контроля или 1E1 (G4) в фиксированной дозе 10 мкг/мл. Т-клетки 3A9 с контрольным вектором использовали в качестве дополнительного отрицательного контроля. Также показано связывание коммерчески доступных антител против ILT по сравнению с соответствующим изотипическим контролем для демонстрации экспрессии члена семейства ILT. Представленные данные соответствуют двум экспериментам со схожими результатами. См. легенду к фигуре.

Фигура 7. Восстановление высвобождения ИЛ-2 из трансфектантов Т-клеток 3A9 с ILT4 с использованием 1E1 (G4). Т-клетки мыши 3A9, трансфицированные с использованием ILT4 человека, обрабатывали связанным с планшетом антителом против CD3 в присутствии растворимого 1E1 (G4) или изотипического контроля (huIgG4) в концентрации, начинающейся с 27 мкг/мл и серийно разведенной в 3 раза до 0,3 мкг/мл. Через 24 ч. инкубации супернатанты удаляли и измеряли ИЛ-2 мыши посредством ELISA. Представленный график соответствует 5 независимым экспериментам. Представленное значение EC₅₀ является средним для этих экспериментов +/- стандартное отклонение.

Фигура 8. Восстановленная посредством p1E1 (G4) и 1E1 (G4), индуцируемая ILT4:HLA-G супрессия дегрануляции тучных клеток. Тучные клетки мыши WTMC трансфицировали с использованием ILT4 человека и предварительно обрабатывали титруемыми концентрациями 1E1 (G4), p1E1 (G4) или hIgG4 изотипического контроля (начиная с 10 мкг/мл, разведения 1:3) перед стимуляцией связанным с планшетом антителом против CD200R1a (клон DX89; 1 мкг/мл) и связанным с планшетом тетрамером HLA-G (0,625 мкг/мл). После стимуляции в течение 1 часа дегрануляцию оценивали посредством сбора супернатантов тучных клеток для измерения высвобождения β -гексозаминидазы с использованием колориметрического ферментативного анализа. Представленные данные соответствуют 2 независимым экспериментам с 3 повторениями на точку данных.

Фигуры 9A и 9B. Усиленная 1E1 (G4) LPS-индуцированная экспрессия провоспалительных миелоидных цитокинов. Целые PBMC здоровых пациентов выделяли из камер лейкоредукции и обрабатывали 0,25 мкг/мл LPS в присутствии hIgG4

(30 мкг/мл; незакрашенные круги) или 1E1 (G4) (обозначенного на фигуре как "1E1") (от 30 мкг/мл до 3 пг/мл; закрашенные круги) в течение 3 дней. После стимуляции супернатанты анализировали на экспрессию цитокинов ((**фигура 9А**) ГМ–КСФ и (**фигура 9В**) ФНО α) с использованием набора для анализа множества цитокинов Meso Scale Discovery. Каждый цвет соответствует данным для отдельного пациента. Также показаны условия без какой–либо стимуляции (закрашенные треугольники).

Фигуры 10А и 10В. Усиленная 1E1 (G4), индуцированная антителом против CD3 экспрессия провоспалительных миелоидных цитокинов. (А–В) Цельные PBMC здоровых пациентов выделяли из камер лейкоредукции и обрабатывали 0,01 мкг/мл антитела против CD3 (Н1Т3а) в присутствии hIgG4 (30 мкг/мл; незакрашенные круги) или 1E1 (G4) (обозначенного на фигуре как "1E1") (от 30 мкг/мл до 3 пг/мл; закрашенные круги) в течение 3 дней. После стимуляции супернатанты анализировали на экспрессию цитокинов ((**фигура 10А**) ГМ–КСФ и (**фигура 10В**) ФНО α) с использованием набора для анализа множества цитокинов Meso Scale Discovery. Каждый цвет соответствует данным для отдельного пациента. Также показаны условия без какой–либо стимуляции (закрашенные треугольники).

Фигуры 11А–11Е. Обработка p1E1 (G4) приводит к ингибированию роста опухоли в модели опухоли SKMEL5 на гуманизированных мышах. Гуманизированным мышам NSG с перелитой CD34+ пуповинной кровью от 2 разных доноров пуповинной крови подкожно инокулировали 1×10^6 опухолевых клеток SKMEL5 в левый бок. После инокуляции опухолям позволяли расти и тех мышей, опухоли которых достигали среднего размера 150 мм³, случайным образом распределяли в группы по 6 (3 от каждого донора стволовых клеток, n=6 на группу всего). Затем мышей стимулировали hIgG4 изотипического контроля или p1E1 (G4) (по 20 мг/кг каждый) каждые 5 дней до конца исследования, при этом опухоли и массу тела измеряли еженедельно. Отслеживали рост опухоли у мышей, которым вводили изотипический контроль и p1E1 (G4), с течением времени. На **фигуре 11А** показан свежий объем опухоли (мм³) $\pm$ SD с течением времени для обеих групп, и на **фигурах 11В и 11С** показаны объемы опухолей (мм³) у отдельных мышей с течением времени для мышей, которым вводили изотипический контроль и p1E1 (G4), соответственно. На **фигуре 11D** показана масса опухоли у отдельных мышей, которым вводили изотипический контроль или p1E1 (G4), с течением времени; на **фигуре 11Е** показана потеря веса в каждой группе лечения, которую также измеряли с течением времени. После завершения исследования мышей умерщвляли, а опухоли собирали и взвешивали.

На **фигурах 12А–12D** показано, что введение 1E1(G4) приводило к ингибированию роста опухоли в модели опухоли SK–MEL–5 на гуманизированных мышах. На **фигуре 12А** показан средний объем опухоли (мм³) $\pm$ SD с течением времени у мышей, которым вводили 1E1(G4), и мышей, которым вводили IgG4 изотипического контроля. На **фигуре 12В** показано изменение массы тела с течением времени в обеих группах. На **фигуре 12С** показана конечная масса опухоли у отдельных мышей, которым вводили изотипический

контроль или 1E1(G4). На **фигуре 12D** показана конечная масса селезенки у отдельных мышей, которым вводили изотипический контроль или 1E1(G4).

Фигура 13. Связывание гаплотипов ILT4. Т-клетки мыши 3A9, трансфицированные с использованием аллельных вариантов ILT4 человека, использовали для тестирования связывания антитела hIgG4 изотипического контроля или 1E1 (G4) в фиксированной дозе 10 мкг/мл. Т-клетки 3A9 с контрольным вектором использовали в качестве дополнительного отрицательного контроля. Гаплотипы представлены в таблице 2. Представленные данные соответствуют двум экспериментам со схожими результатами.

Фигуры 14A и 14B. Экспрессия РНК ILT4 в различных типах опухолей или типах клеток в соответствии с общедоступными базами данных. На **фигуре 14A** показана экспрессия РНК ILT4 в различных типах опухолей в соответствии с базой данных TCGA. На **фигуре 14B** показана экспрессия РНК ILT4 в различных типах клеток в соответствии с базой данных Blueprint.

На **фигурах 15A и 15B** показано связывание 1E1(G4) с миелоидными клетками из образцов гистокультуры почечноклеточной карциномы (RCC) (**фигура 15A**) и колоректального рака (CRC) (**фигура 15B**).

Фигура 16. Преобладающие N-связанные гликаны для моноклональных антител, продуцируемых клетками яичника китайского хомяка (N-связанные гликаны CHO) и в сконструированных дрожжевых клетках (N-связанные гликаны сконструированных дрожжей): квадраты: N-ацетилглюкозамин (GlcNac); круги: манноза (Man); ромбы: галактоза (Gal); треугольники: фукоза (Fuc).

На **фигуре 17** показана противоопухолевая эффективность различных антител против ILT4 в модели опухоли SK-MEL-5 на гуманизированных мышах.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для лучшего понимания изобретения ниже специально определены некоторые технические и научные термины. Если в описании конкретно не указано иное, все другие технические и научные термины, используемые в нем, имеют значение, общепринято понятное специалисту в области, к которой принадлежит изобретение.

В рамках изобретения, включая формулу изобретения, термины в единственном числе включают ссылку на соответствующее множественное число, если контекст четко не указывает на иное.

Термин "аффинность" относится к силе суммы всех нековалентных взаимодействий между отдельным участком связывания молекулы (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иначе, в рамках изобретения термин "аффинность связывания" относится к характерной аффинности связывания, отражающей взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антитела и антигена). Аффинность молекулы X к своему партнеру Y, как правило, можно представлять в виде константы диссоциации (K_D). Аффинность можно измерять распространенными, известными в этой области способами, включая KinExA и Biacore.

В рамках изобретения термин "антитело" включает, в качестве неограничивающих

примеров, моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), полностью человеческие антитела и химерные антитела.

В рамках изобретения, если не указано иначе, термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к антигенсвязывающим фрагментам антител, т.е. фрагментам антител, сохраняющим способность связываться с антигеном, связываемым полноразмерным антителом, например фрагментам, сохраняющим одну или более областей CDR. Неограничивающие примеры связывающих фрагментов антитела включают Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, Fv-фрагменты, отдельные тяжелые цепи или легкие цепи антител и отдельные переменные области тяжелой цепи или легкой цепи.

"Fab-фрагмент" состоит из одной легкой цепи, CH1 и переменных областей одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи. "Fab-фрагмент" может являться продуктом расщепления антитела папаином.

"Fc"-область содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащие домены CH1 и CH2 антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или более дисульфидными связями и гидрофобными взаимодействиями доменов CH3.

"Fab'-фрагмент" содержит одну легкую цепь и часть или фрагмент одной тяжелой цепи, содержащий домен V_H и домен CH1, а также область между доменами CH1 и CH2, таким образом, что между двумя тяжелыми цепями двух Fab'-фрагментов может образовываться межцепочечная дисульфидная связь с образованием молекулы F(ab')₂.

"F(ab')₂-фрагмент" содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области между доменами CH1 и CH2, таким образом, что между двумя тяжелыми цепями образуется межцепочечная дисульфидная связь. Таким образом, F(ab')₂-фрагмент состоит из двух фрагментов Fab', удерживаемых вместе дисульфидной связью между двумя тяжелыми цепями. "F(ab')₂-фрагмент" может являться продуктом расщепления антитела пепсином.

"Fv-область" содержит переменные области и тяжелых, и легких цепей, но в нем отсутствуют константные области.

Термин "выделенное антитело" относится к состоянию очистки и в таком контексте термин означает, что молекула, по существу, не содержит другие биологические молекулы, такие как нуклеиновые кислоты, белки, липиды, углеводы или другой материал, такой как клеточный детрит и среды для выращивания. Как правило, термин "выделенный" не предназначен для обозначения полного отсутствия такого материала или отсутствия воды, буферов или солей, если они не присутствуют в количествах, по существу, мешающих экспериментальному или терапевтическому использованию связывающего соединения, как представлено в настоящем описании.

В рамках изобретения термин "моноклональное антитело" относится к популяции, по существу, гомогенных антител, т.е. молекулы антител, составляющие популяцию, являются идентичными по аминокислотной последовательности, за исключением

возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. В отличие от этого, препараты общепринятых (поликлональных) антител, как правило, включают множество различных антител, имеющих разные аминокислотные последовательности их вариабельных доменов, зачастую являющихся специфическими для разных эпитопов. Определение "моноклональное" указывает на тип антитела, полученного из, по существу, гомогенной популяции антител, и не следует истолковывать его как требование получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела для использования в настоящем изобретении можно получать гибридным способом, впервые описанным в Kohler et al. (1975) *Nature* 256: 495, или способами рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567). "Моноклональные антитела" также можно выделять из фаговых библиотек антител способами, описанными, например, в Clackson et al. (1991) *Nature* 352: 624–628 и Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581–597. См. также Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731.

Термин "полностью человеческое антитело" относится к антителу, содержащему только белковые последовательности иммуноглобулина человека. Полностью человеческое антитело может содержать углеводные цепи мыши, если его получают с помощью мыши, клеток мыши или гибридомы, полученной из клеток мыши. Аналогично, термин "антитело мыши" относится к антителу, содержащему только последовательности иммуноглобулина мыши. Альтернативно, полностью человеческое антитело может содержать углеводные цепи крысы, если его получают с помощью крысы, клеток крысы или гибридомы, полученной из клеток крысы. Аналогично, термин "антитело крысы" относится к антителу, содержащему только последовательности иммуноглобулина крысы.

В основном, базовая структурная единица "антитела" содержит тетрамер. В моноспецифическом антителе каждый тетрамер включает две идентичные пары полипептидных цепей, а каждая пара содержит одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50–70 кДа). Амино-концевая часть каждой цепи включает "вариабельную область" или "вариабельный домен" из приблизительно от 100 до 110 или более аминокислот, главным образом, отвечающих за распознавание антигена. Карбокси-концевая часть тяжелой цепи может определять константную область, главным образом, отвечающую за эффекторную функцию.

Как правило, константные области легких цепей человека классифицируют как каппа- и лямбда-легкие цепи. Кроме того, константные области тяжелых цепей человека, как правило, классифицируют как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон, и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. Подтипы этих IgG включают, например, IgG1 и IgG4. Настоящее изобретение относится к антителам против ИТ4 и антигенсвязывающим фрагментам, содержащим любые из этих константных областей легких и/или тяжелых цепей.

В рамках изобретения термины "вариабельная область", "вариабельный домен", "V-область" или "V-цепь" означают сегмент цепей IgG, вариабельный по своей

последовательности среди разных антител. Термин "вариабельная область" антитела относится к вариабельной области легкой цепи антитела или вариабельной области тяжелой цепи антитела, как в отдельности, так и в комбинации. Вариабельную область тяжелой цепи можно обозначать как "V_H". Вариабельную область легкой цепи можно обозначать как "V_L". Как правило, вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат три гипервариабельные области, также обозначаемые как определяющие комплементарность области (CDR), находящиеся в относительно консервативных каркасных областях (FR). CDR, как правило, выравнивают по каркасным областям, и они делают возможным связывание со специфическим эпитопом. В основном, от N-конца к C-концу вариабельные домены легких и тяжелых цепей содержат FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Приписывание аминокислот к каждому домену, как правило, осуществляют в соответствии с определениями, приведенными в Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, et al.; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5th ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Kabat (1978) Adv. Prot. Chem. 32:1-75; Kabat, et al., (1977) J. Biol. Chem. 252:6609-6616; Chothia, et al., (1987) J Mol. Biol. 196:901-917 или Chothia, et al., (1989) Nature 342:878-883.

Термин "CDR" относится к одной из трех гипервариабельных областей (H1, H2, или H3) в некаркасной области β -листового каркаса V_H антитела или одной из трех гипервариабельных областей (L1, L2, или L3) в некаркасной области β -листового каркаса V_L антитела. Таким образом, CDR представляют собой последовательности вариабельной области, перемежающиеся с последовательностями каркасной области. Области CDR хорошо известны специалистам в этой области, и их определяют, например, по Kabat как области наибольшей гипервариабельности в вариабельных доменах антитела. Последовательности области CDR также определяют структурно по Chothia как остатки, не являющиеся частью консервативного β -листового каркаса, и, таким образом, они могут адаптироваться к другой конформации. Обе терминологии являются общепризнанными в этой области. Последовательности областей CDR также определяют с использованием AbM, Contact и IMGT. Положения CDR в канонической вариабельной области антитела определяют посредством сравнения многочисленных структур (Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol. 273:927-48; Morea et al., 2000, Methods 20:267-79). Т.к. количество остатков в гипервариабельной области варьируется в разных антителах, дополнительные остатки относительно канонических положений общепринято нумеруют с помощью a, b, c и т.д. рядом с номером остатка в схеме нумерации канонической вариабельной области (Al-Lazikani et al., выше). Такая номенклатура также хорошо известна специалистам в этой области. Соответствие между системами нумерации, включая, например, нумерацию по Kabat и уникальную систему нумерации IMGT, хорошо известно специалисту в этой области и представлено ниже в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления CDR определяют посредством системы нумерации Kabat. В других вариантах осуществления CDR определяют посредством системы нумерации IMGT. В других вариантах осуществления CDR определяют посредством системы нумерации AbM. В других

вариантах осуществления CDR определяют посредством системы нумерации Chothia. В других вариантах осуществления CDR определяют посредством системы нумерации Contact.

Таблица 1. Соответствие между системами нумерации CDR

	Kabat+ Chothia	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
CDR1 V _H	26–35	27–38	31–35	26–35	26–32	30–35
CDR2 V _H	50–65	56–65	50–65	50–58	52–56	47–58
CDR3 V _H	95–102	105–117	95–102	95–102	95–102	93–101
CDR1 V _L	24–34	27–38	24–34	24–34	24–34	30–36
CDR2 V _L	50–56	56–65	50–56	50–56	50–56	46–55
CDR3 V _L	89–97	105–117	89–97	89–97	89–97	89–96

Термин "идентичность последовательности" относится к степени, до которой аминокислоты из двух полипептидов являются одинаковыми в эквивалентных положениях при оптимальном выравнивании двух последовательностей.

Сходство последовательности включает идентичные остатки и неидентичные, биохимически родственные аминокислоты. Биохимически родственные аминокислоты, обладающие схожими свойствами, которые могут быть взаимозаменяемыми, описаны выше.

Термины "консервативно модифицированные варианты" или "консервативная замена" относятся к заменам аминокислот в белке другими аминокислотами, имеющими схожие характеристики (например, заряд, размер боковой цепи, гидрофобность/гидрофильность, конформация и жесткость остова и т.д.), таким образом, что можно многократно осуществлять изменения без изменения биологической активности белка. Специалистам в этой области известно, что, в основном, единичные замены аминокислот в неимеющих существенного значения областях полипептида, по существу, не изменяют биологическую активность (см., например, Watson et al. (1987) *Molecular biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)). Кроме того, менее вероятно, что замены структурно или функционально схожих аминокислот нарушат биологическую активность. Примеры консервативных замен приведены в таблице 2.

ТАБЛИЦА 2. Примеры консервативных аминокислотных замен

Исходный остаток	Консервативная замена
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
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

В рамках изобретения термин "эпитоп" относится к области на антигене, с которой связывается антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в настоящем описании, с эпитопом означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с одним или более аминокислотными остатками в эпитопе.

Термин "выделенная" молекула нуклеиновой кислоты или полинуклеотид означает ДНК или РНК, например, геномного или синтетического происхождения или ДНК или РНК, полученную из мРНК или кДНК или некоторых их комбинаций, не связанную с частью или всем полинуклеотидом, в котором выделенный полинуклеотид обнаруживают в природе, или связанную с полинуклеотидом, с которым она не связана в природе. В целях по настоящему изобретению, следует понимать, что "полинуклеотид, содержащий" (или т.п.) конкретную нуклеотидную последовательность, не включает интактные хромосомы. Выделенные полинуклеотиды, "содержащие" конкретные последовательности нуклеиновой кислоты, могут включать, в дополнение к конкретным последовательностям, кодирующие последовательности для до десяти или даже до двадцати или более других белков или их частей или фрагментов, или они могут включать функционально связанные регуляторные последовательности, контролирующие экспрессию кодирующей области указанных последовательностей нуклеиновой кислоты, и/или могут включать последовательности вектора.

Фраза "контрольные последовательности" относится к полинуклеотидным последовательностям, необходимым или полезным для экспрессии функционально

связанной кодирующей последовательности в конкретном организме–хозяине. Контрольные последовательности, подходящие для прокариот, например, включают промотор, необязательно, последовательность оператора и участок связывания рибосомы. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры. В варианте осуществления изобретения полинуклеотид функционально связан с промотором, таким как вирусный промотор, промотор CMV, промотор SV40, или невирусный промотор, или промотор фактора элонгации (EF)–1, и/или интроном.

Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", если она расположена в функциональной взаимосвязи с другим полинуклеотидом. Например, ДНК для пре–последовательности или секреторной лидерной последовательности функционально связана с ДНК для полипептида, если она экспрессируется как белок–предшественник, участвующий в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или участок связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, что облегчает трансляцию. Как правило, но не обязательно, термин "функционально связанный" означает, что связанные полинуклеотидные последовательности являются смежными и, в случае секреторной лидерной последовательности, смежными и в рамке считывания. Однако энхансеры могут не быть смежными. Связывание осуществляют посредством лигирования в удобных участках рестрикции. Если таких участков нет, используют синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры в соответствии с общепринятой практикой.

В рамках изобретения выражения "клетка", "линия клеток" и "культура клеток" используют взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают их потомство. Таким образом, термины "трансформанты" и "трансформированные клетки" включают первичные клетки и полученные из них культуры без учета количества переносов. Также следует понимать, что не все потомство будет иметь точно такое же содержимое ДНК в результате преднамеренных или непреднамеренных мутаций. Термин включает мутантное потомство, имеющее ту же функцию или биологическую активность по результатам скрининга, что и исходная трансформированная клетка. Случаи, когда необходимо разное обозначение, будут очевидны из контекста.

Клетки–хозяева включают эукариотические и прокариотические клетки–хозяева, включая клетки млекопитающих. Клетки–хозяева можно использовать в качестве хозяев для экспрессии антител против ILT4 и их антигенсвязывающих фрагментов. Клетки–хозяева включают, помимо прочего, клетки яичника китайского хомяка (CHO), NSO, клетки SP2, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (ВНК), клетки почки обезьяны (COS), клетки печеночноклеточной карциномы человека (например, Нер G2), клетки A549, клетки 3T3 и клетки HEK–293. Клетки–хозяева млекопитающих включают клетки человека, мыши, крысы, собаки, обезьяны, свиньи, козы, быка, лошади и хомяка. Другие линии клеток, которые можно использовать, являются линиями клеток насекомых

(например, *Spodoptera frugiperda* или *Trichoplusia ni*), клетками амфибии, бактериальными клетками, растительными клетками и клетками грибов. Клетки грибов включают дрожжевые клетки и клетки нитевидных грибов, включая, например, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*), *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia метаноліса*, *Pichia* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces* sp., *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces* sp., *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium* sp., *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Physcomitrella patens* и *Neurospora crassa*. *Pichia* sp., любые *Saccharomyces* sp., *Hansenula polymorpha*, любые *Kluyveromyces* sp., *Candida albicans*, любые *Aspergillus* sp., *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, любые *Fusarium* sp., *Yarrowia lipolytica* и *Neurospora crassa*. Настоящее изобретение относится к любой клетке-хозяину (например, клетке CHO или клетке *Pichia*, например, *Pichia pastoris*), содержащей антитело против ИЛТ4 или его антигенсвязывающий фрагмент, или содержащей полинуклеотид, кодирующий такое антитело или фрагмент, или содержащей вектор, содержащий полинуклеотид.

Термины "лечить" или "лечение" означают введение антител против ИЛТ4 или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению индивидууму, имеющему один или более симптомов заболевания, при котором антитела против ИЛТ4 и антигенсвязывающие фрагменты являются эффективными, например, в лечении индивидуума, имеющего злокачественное новообразование или инфекционное заболевание или, как предполагают, имеющего злокачественное новообразование или инфекционное заболевание, при котором средство имеет терапевтическую активность. Как правило, антитело или фрагмент вводят в "эффективном количестве" или "эффективной дозе", которая будет облегчать один или более симптомов (например, злокачественного новообразования или инфекционного заболевания) у индивидуума или популяции, подвергаемых лечению, индуцируя регрессирование или устранение таких симптомов или ингибируя прогрессирование таких симптомов, например, симптомов злокачественного новообразования, таких как рост опухоли или метастазирование, в любой клинически значимой степени. Эффективное количество антитела или фрагмента может варьироваться в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания, возраст и масса тела пациента и способность лекарственного средства вызывать желаемый ответ у индивидуума.

В рамках изобретения термин "антитело против ИЛТ4 или его антигенсвязывающий фрагмент" относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с ИЛТ4 человека.

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, приведенным в настоящем описании, специфически связывающийся с ИЛТ4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент "специфически" связывается с

полипептидом, содержащим указанную последовательность (например, ILT4 человека), если они связываются с полипептидами, содержащими последовательность, с K_D приблизительно 20 нМ или более высокой аффинностью (например, приблизительно 17 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 1 нМ, 100 пМ или 1 пМ), но не связывается с белками, в которых последовательность отсутствует. Например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с полипептидом, содержащим ILT4 человека, могут связываться с FLAG[®]-меченой формой ILT4 человека, но не связываются с другими FLAG[®]-мечеными белками, в которых отсутствуют последовательности ILT4.

ILT4

В варианте осуществления изобретения аминокислотная последовательность ILT4 человека содержит аминокислотную последовательность:

MTPIVTVLIC LGLSLGPRTH VQTGTIPKPT LWAEPDSVIT QGSPVTLSCQ
GSLEAQEYRL 60

YREKKSASWI TRIRPELVKN GQFHIPSITW EHTGRYGCQY YSRARWSELS
DPLVLVMTGA 120

YPKPTLSAQF SPVVTSGGRV TLQCESQVAF GGFILCKEKE EEHPQCLNSQ
PHARGSSRAI 180

FSVGPVSPNR RWSHRCYGYD LNSPYVWSSP SDLLELLVPG VSKKPSLSVQ
PGPVVAPGES 240

LTLQCVSDVG YDRFVLYKEG ERDLRQLPGR QPQAGLSQAN FTLGPVSRSY
GGQYRCYGAH 300

NLSSECSAPS DPLDILITGQ IRGTPFISVQ PGPTVASGEN VTLLCQSWRQ
FHTFLLTKAG 360

AADAPLRLRS IHEYPKYQAE FPMSPVTSAN AGTYRCYGSF NSDPYLLSHP
SEPLELVVSG 420

PSMGSSPPPT GPISTPAGPE DQPLTPTGSD PQSGLGRHLG VVIGILVAVV
LLLLLLLLLLF 480

LILRHRRQGK HWTSTQRKAD FQHPAGAVGP EPTDRGLQWR SSPAADAQEE
NLYAAVKDTQ 540

PEDGVEMDTR AAASEAPQDV TYAQLHSLTL RRKATEPPPS QEREPPAEPS
IYATLAIH 598

(SEQ ID NO: 40; сигнальная последовательность подчеркнута). См. Uniprot, регистрационный № Q8N423.

В другом варианте осуществления изобретения аминокислотная последовательность ILT4 человека содержит следующую аминокислотную последовательность без сигнальной последовательности:

QTGTIPKPT LWAEPDSVIT QGSPVTLSCQ GSLEAQEYRL 39
YREKKSASWI TRIRPELVKN GQFHIPSITW EHTGRYGCQY YSRARWSELS
DPLVLVMTGA 99

YPKPTLSAQF SPVVTSGGRV TLQCESQVAF GGFILCKEKE EEHPQCLNSQ

PHARGSSRAI 159

FSVGPVSPNR RWSHRCYGYD LNSPYVWSSP SDLLELLVPG VSKKPSLSVQ
PGPVVAPGES 219

LTLQCVSDVG YDRFVLYKEG ERDLRQLPGR QPQAGLSQAN FTLGPVSRSY
GGQYRCYGAH 279

NLSSECSAPS DPLDILITGQ IRGTPFISVQ PGPTVASGEN VTLLCQSWRQ
FHTFLLTKAG 339

AADAPLRLRS IHEYPKYQAE FPMSPV TSAH AGTYRCYGS L NSDPYLLSHP
SEPLELVVSG 399

PSMGSSPPPT GPISTPAGPE DQPLTPTGSD PQSGLGRHLG VVIGILVAVV
LLLLLLLLLF 459

LILRHRRQ GK HWTSTQRKAD FQHPAGAVGP EPTDRGLQWR SSPAADAQEE
NLYAAVKDTQ 519

PEDGVEMDTR AAASEAPQDV TYAQLHSLTL RRKATEPPPS QEREPPAEPS
IYATLAIH 577

(SEQ ID NO: 78).

В варианте осуществления изобретения аминокислотная последовательность ILT4
яванского макака содержит аминокислотную последовательность:

MTPILMVLIC LGLSLGPRTH VQAGILPKPT LWAEPGSVIS EGSPVTLRCQ
GSLQVQEYHL 60

YREKNPASWV RQIRQELVKK GYFAIGFITW EHTGQYRCQY YSHSWWSEPS
DPLELVVTGA 120

YSKPTLSALP SPVVASGGNV TLQCDSQVAF DSFTLCKEKE DEHPQRLNCQ
SHARGWSWAV 180

FSVGPVSPSR RWSYRCYGYI SSAPNVWSLP SDLLELLVPG VSKKPSLSVQ
PGPVVAPGDK 240

LTLQCGSDAG YDRFALYKEG EGDFLQRPVR QPQAGLSQAN FLLGPVSRSH
GGQYRCSGAH 300

NLSSEWSAPS DPLDILIAGQ IRGRPFLSVQ PGPKVVSGEN VTLLCQSSWQ
FHAFLLTQAG 360

AADAHLHLRS MYKYPKYQAE FPMSPV TSAH AGTYRCYGS R SSNPYLLSVP
SDPLELVVSG 420

PSGGPSSPTT GPTSTCGPED QPLTPTGSAP QSGLGRHLGV VTGVLVAFVL
LLFLLLLLFL 480

VLRYRRQGKR W TSAQRKADF QHPAGAVEPE PRDRGLQRRS SPAADTQEEN
LYAAVKDTQP 540

EDGVELDSRA AASEDPQDVT YAQLQSLTLR REATEPPPSQ ERAPPVESSI
YATLTIH 597

(SEQ ID NO: 43; сигнальная последовательность подчеркнута). См. NCBI refseq
XP_005590753.

В варианте осуществления изобретения сигнальная последовательность для экспрессии ILT4 или любого другого полипептида, приведенного в настоящем описании, представляет собой MTPILMVLICLGLSLGPRTHV (аминокислоты 1–21 SEQ ID NO: 40), или MTPIVTVLICLGLSLGPRTHV (аминокислоты 1–21 SEQ ID NO: 43), или MPLLLLLPLWAGALA (SEQ ID NO: 46).

В варианте осуществления изобретения антитело против ILT4 или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связывается с внеклеточным доменом ILT4:

QTGTIPKPTLWAEPSVITQGSPVTLSCQGSLEAQEYRLYREKKSASWITRIRPEL
VKNGQFHIPSITWEHTGRYGCQYYSRARWSELSDPLVLVMTGAYPKPTLSAQPSPVVTS
GGRVTLQCESQVAFGGFILCKEGEEHPQCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPNRRWSHRC
YGYDLNSPYVWSSPSDLLELLVPGVSKKPSLSVQPGPVVAPGESLTLQCVSDVGYDRFV
LYKEGERDLRQLPGRQPQAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGAHNLSSECSAPSDPLD
ILITGQIRGTPFISVQPGPTVASGENVTLLCQSWRQFHTFLLTKAGAADAPLRLRSIHEY
KYQAEFPMSPVTSAHAGTYRCYGSLSNDPYLLSHPSEPLELVVSGPSMGSSPPPTGPISTP
AGPEDQPLTPTGSDPQSGLGRHLGV

(аминокислоты 22–461 SEQ ID NO: 40), или его слитым с иммуноглобулином белком (например, IgG1 или IgG4), или трансмембранной формой (TM), экспрессирующей на поверхности клетки:

QTGTIPKPTLWAEPSVITQGSPVTLSCQGSLEAQEYRLYREKKSASWITRIRPEL
VKNGQFHIPSITWEHTGRYGCQYYSRARWSELSDPLVLVMTGAYPKPTLSAQPSPVVTS
GGRVTLQCESQVAFGGFILCKEGEEHPQCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPNRRWSHRC
YGYDLNSPYVWSSPSDLLELLVPGVSKKPSLSVQPGPVVAPGESLTLQCVSDVGYDRFV
LYKEGERDLRQLPGRQPQAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGAHNLSSECSAPSDPLD
ILITGQIRGTPFISVQPGPTVASGENVTLLCQSWRQFHTFLLTKAGAADAPLRLRSIHEY
KYQAEFPMSPVTSAHAGTYRCYGSLSNDPYLLSHPSEPLELVVSGPSMGSSPPPTGPISTP
AGPEDQPLTPTGSDPQSGLGRHLGVVIGILVAVVLLLLLLLLLFLILRHRRQGN

(аминокислоты 22–491 SEQ ID NO: 40).

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам (например, полностью человеческим антителам), связывающимся с ILT4 (в настоящем описании обозначаемым как "антитела против ILT4"), и способам применения антител или их антигенсвязывающих фрагментов в лечении или профилактике заболевания. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к антагонистическим антителам против ILT4 и способам применения антител или их антигенсвязывающих фрагментов в лечении или профилактике заболевания.

В одном из аспектов настоящее изобретение включает антитела против ILT4 и их антигенсвязывающие фрагменты, как указано в настоящем описании, имеющие одно или более из свойств, приведенных ниже:

- связывается с ILT4 человека в одном или более аминокислотных остатках в

LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59), TRIRPEL (SEQ ID NO: 60), NGQF (SEQ ID NO: 61) и/или HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62) и/или защищает LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59), TRIRPEL (SEQ ID NO: 60), NGQF (SEQ ID NO: 61) и/или HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62) от дейтерообмена (например, D_2O), например, определяемого посредством масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена, и/или связывается с ILT4 с тепловой картой, по существу, такой, как представленная на фигуре 1;

- связывается с ILT4 человека в домене 1 (см. Wilcox et al. BMC Structural Biology 2:6 (2002));

- связывается с внеклеточным доменом ILT4 человека или TM-формой ILT4, экспрессирующей на поверхности клетки, например, пре-B-клетки, клетки яичника китайского хомяка, клетки U937 или клетки Jurkat JE6.

- вычисленный pI ~7,29 (например, 7,29 или 7,30);

- экспериментально определенный pI ~ 7,2;

- отличается термограммой, имеющей начальную $T_m > 60^\circ C$, $T_{m1} \sim 65,2^\circ C$ и $T_{m2} \sim 78,8^\circ C$;

- связывается с ILT4 человека с K_D приблизительно $1,7 \times 10^{-8}$ М (например, как определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, связывания антитела против ILT4 с меченым полигистидином ILT4 человека);

- $K_a = 5,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (например, как определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса, связывания антитела против ILT4 с меченым полигистидином ILT4 человека);

- $K_d = 9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (например, как определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, связывания антитела против ILT4 с меченым полигистидином ILT4 человека);

- блокирует связывание HLA-G (например, Fc-слитого HLA-G) с ILT4 человека (например, ILT4 на Т-клетках мыши 3A9, трансфицированных с использованием ILT4 и экспрессирующих его), например, с IC_{50} приблизительно 0,25 мкг/мл ($\pm 0,06$ мкг/мл), например, как определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

- блокирует связывание HLA-A, HLA-B (например, меченых флуорохромом дексамеров HLA-A, таких как HLA*A2:01, или HLA-B, таких как HLA*B7:02), и/или HLA-F (например, меченых флуорохромом тетрамеров HLA-F) с ILT4 (например, ILT4 на Т-клетках мыши 3A9, трансфицированных с использованием ILT4 и экспрессирующих его), например, как определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

- блокирует связывание ILT4 (например, ILT4 на Т-клетках мыши 3A9, трансфицированных с использованием ILT4 и экспрессирующих его) с ANGPTL1, ANGPTL4 и/или ANGPTL7 (например, биотинилированными белками ANGPTL), например, как определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

- не связывается с ILT2, ILT3, ILT5, LILRB5, LILRA1, LILRA2, ILT7, ILT8 и/или ILT11;

- реверсирует ILT4-опосредованную супрессию ИЛ-2 в трансфицированных с

использованием ILT4 клетках 3A9, например, с EC₅₀ 0,43 мкг/мл ($\pm 0,14$ мкг/мл);

- восстанавливает ILT4:HLA–G–индуцируемую супрессию дегрануляции тучных клеток (например, в присутствии связанного с планшетом тетрамера HLA–G), например, где тучные клетки экспрессируют ILT4 и CD200RLa, и их стимулируют, например, с использованием антитело–опосредованной перекрестной сшивки CD200RLa;

- повышает липополисахарид (LPS)–индуцируемую экспрессию провоспалительных миелоидных цитокинов, например, ГМ–КСФ и/или ФНО α , из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC);

- повышает индуцируемую антителом против CD3 экспрессию провоспалительных миелоидных цитокинов, например, ГМ–КСФ и/или ФНО α , из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC);

- ингибирует рост опухоли у людей или, например, других млекопитающих, таких как мыши (например, мыши NSG с иммунодефицитом), реконструированных с использованием гемопоэтических стволовых клеток человека, например, включающих периферические CD45+иммунные клетки человека, например, где опухоль является меланомой кожи человека, например, из линии клеток SKMEL5;

- облегчает опосредованную супрессорными клетками макрофагального/миелоидного происхождения (MDSC) толерантность опухоли в организме индивидуума (например, человека) с опухолью;

- не связывается с ILT4 яванского макака и/или pigB мыши; и/или

- с помощью него окрашивают CD14+ моноциты человека и/или CD11B+ гранулоциты человека;

- связывается с одним или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или всеми 10) из гаплотипов ILT4 человека, приведенных в таблице 7.

Тяжелая цепь антитела 1E1 (Q1E) (IgG4)

Тяжелая цепь

EVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHS
GSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLPTRWVTTRYFDLWGR
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP
 EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
 LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL
 TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

(SEQ ID NO: 1; переменный домен подчеркнут; CDR обозначены двойным подчеркиванием)

Переменный домен тяжелой цепи

EVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHS
 GSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLPTRWVTTRYFDLWGR
 GTLVTVSS

(SEQ ID NO: 63)

Тяжелая цепь антитела 1E1 (Q1E, S54A) (IgG4)

Тяжелая цепь

EVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHA
GSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLPTRWVTTRYFDLWGR
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP
 EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
 LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL
 TVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 2; переменный домен подчеркнут; CDR обозначены двойным подчеркиванием)

Переменный домен тяжелой цепи

EVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHA
GSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLPTRWVTTRYFDLWGR
 GTLVTVSS

(SEQ ID NO: 57)

Тяжелая цепь антитела 1E1 (IgG1)

Тяжелая цепь

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHS
GSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLPTRWVTTRYFDLWGR
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 44; переменный домен подчеркнут; CDR обозначены двойным подчеркиванием)

Переменный домен тяжелой цепи

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHS
GSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLPTRWVTTRYFDLWGR
 GTLVTVSS

(SEQ ID NO: 69)

CDR тяжелой цепи 1E1

CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16)

CDR-H2: EINH_XGSTNYNPSLKS, где X является S или A (например, EINHSGSTNYNPSLKS или EINHAGSTNYNPSLKS) (SEQ ID NO: 17)

CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18)

Легкая цепь антитела 1E1 (Q1E) (лямбда)

Легкая цепь

ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSN
RPSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVLGQP
 KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS
 NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 3; вариабельный домен подчеркнут; CDR обозначены двойным подчеркиванием)

Вариабельный домен легкой цепи

ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSN
 RPSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVL

(SEQ ID NO: 70)

Легкая цепь антитела 1E1 (Q1E, S54A) (лямбда)

Легкая цепь

ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNNAN
RPSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVLGQP
 KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS
 NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 4; вариабельный домен подчеркнут; CDR обозначены двойным подчеркиванием)

Вариабельный домен легкой цепи

ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNNAN
 RPSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVL

(SEQ ID NO: 71)

Легкая цепь антитела 1E1 (Q1E, N53Q) (лямбда)

Легкая цепь

ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGQSN
RPSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVLGQP
 KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS
 NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 5; вариабельный домен подчеркнут; CDR обозначены двойным подчеркиванием)

Вариабельный домен легкой цепи

ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGQSN
 RPSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVL

(SEQ ID NO: 72)

Легкая цепь антитела 1E1 (Q1E, N53E) (лямбда)

Легкая цепь

ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGESN
RPSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVLGQP

KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 6; варибельный домен подчеркнут; CDR обозначены двойным подчеркиванием)

Варибельный домен легкой цепи

ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGESN
RPSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSF DNSLSAYVF GGGTQLTVL

(SEQ ID NO: 73)

Легкая цепь антитела 1E1 (Q1E, N53D) (лямбда)

Легкая цепь

ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGDSN
RPSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSF DNSLSAYVF GGGTQLTVLGQP
KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 7; варибельный домен подчеркнут; CDR обозначены двойным подчеркиванием)

Варибельный домен легкой цепи

ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGDSN
RPSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSF DNSLSAYVF GGGTQLTVL

(SEQ ID NO: 58)

Легкая цепь антитела 1E1 (лямбда)

Легкая цепь

QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSN
RPSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSF DNSLSAYVF GGGTQLTVLGQP
KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 45; варибельный домен подчеркнут; CDR обозначены двойным подчеркиванием)

Варибельный домен легкой цепи

QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSN
RPSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSF DNSLSAYVF GGGTQLTVL

(SEQ ID NO: 77)

CDR легкой цепи 1E1

CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19)

CDR-L2: GX₁X₂NRPS; где X₁ является N, Q, E или D, и X₂ является S или A (например, GNSNRPS, GNANRPS, GQSNRPS, GESNRPS или GDSNRPS) (SEQ ID NO: 20)

CDR-L3: QSF DNSLSAYV (SEQ ID NO: 21)

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, включающие CDR тяжелой и легкой цепи 1E1, или V_H и V_L 1E1, или тяжелую цепь и легкую цепь 1E1 (или их вариант, например, как указано в настоящем описании), можно обозначать как "1E1".

Тяжелая цепь антитела 2A6 (Q1E) (IgG4)

Тяжелая цепь

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIF
GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYFDSSGWYKGGAFDI
WGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKITYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP
 CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(SEQ ID NO: 8; переменный домен подчеркнут; CDR обозначены двойным подчеркиванием)

Переменный домен тяжелой цепи

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIF
 GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYFDSSGWYKGGAFDI
 WGQGTMTVTVSS

(SEQ ID NO: 64)

Тяжелая цепь антитела 2A6 (Q1E, S102A, M119L) (IgG4)

Тяжелая цепь

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIF
GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYFDASGWYKGGAFDI
WGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKITYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP
 CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(SEQ ID NO: 9; переменный домен подчеркнут; CDR обозначены двойным подчеркиванием)

Переменный домен тяжелой цепи

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIF
 GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYFDASGWYKGGAFDI
 WGQGTMTVTVSS

(SEQ ID NO: 65)

Тяжелая цепь антитела 2A6 (Q1E, D101S, M119L) (IgG4)

Тяжелая цепь

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIF
GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYFSSSGWYKGGAFDI
WGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKITYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP

CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(SEQ ID NO: 10; вариабельный домен подчеркнут; CDR обозначены двойным подчеркиванием)

Вариабельный домен тяжелой цепи

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYFSSSGWYKGGAFDI
WGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 66)

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, где остаток 1 SEQ ID NO: 8, 9, 10, 64, 65 или 66 является Q вместо E.

CDR тяжелой цепи 2A6

CDR-H1: SYAIS (SEQ ID NO: 22)

CDR-H2: GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 23)

CDR-H3: YFX₁X₂SGWYKGGAFDI; где X₁ является D или S, и X₂ является S или A (например, YFDSSGWYKGGAFDI, YFDASGWYKGGAFDI или YFSSSGWYKGGAFDI) (SEQ ID NO: 24)

Легкая цепь антитела 2A6 (лямбда)

Легкая цепь

QSVLTQPSLSASPGASASLTCTLRSGINVDITYRIHWYQQKPGSPPOYLLRYKSDS
DKHQGSGVPSRFSGSKDPSANAGILLISGLQSEDEADYYCAIWYSSTWVFGGGTQLTVL
GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPS
KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 11; вариабельный домен подчеркнут; CDR обозначены двойным подчеркиванием)

Вариабельный домен легкой цепи

QSVLTQPSLSASPGASASLTCTLRSGINVDITYRIHWYQQKPGSPPOYLLRYKSDS
DKHQGSGVPSRFSGSKDPSANAGILLISGLQSEDEADYYCAIWYSSTWVFGGGTQLTVL

(SEQ ID NO: 74)

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, где остаток 1 SEQ ID NO: 11 или 74 является E вместо Q.

CDR легкой цепи 2A6

CDR-L1: TLRSGINVDITYRIH (SEQ ID NO: 25)

CDR-L2: YKSDSDKHQGS (SEQ ID NO: 26)

CDR-L3: AIWYSSTWV (SEQ ID NO: 27)

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, включающие CDR тяжелой и легкой цепи 2A6, или V_H и V_L 2A6, или тяжелую цепь и легкую цепь 2A6 (или их вариант, например, как указано в настоящем описании), можно обозначать как "2A6".

Тяжелая цепь антитела 3G7 (Q1E) (IgG4)

Тяжелая цепь

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISY
DGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGEWIKLWSPFDY
WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP
 CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

(SEQ ID NO: 12; варибельный домен подчеркнут; CDR обозначены двойным подчеркиванием).

Варибельный домен тяжелой цепи

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISY
 DGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGEWIKLWSPFDY
 WGQGTLLTVSS

(SEQ ID NO: 67)

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, где остаток 1 SEQ ID NO: 12 или 67 является Q вместо E.

CDR тяжелой цепи 3G7

CDR-H1: SYAMH (SEQ ID NO: 28)

CDR-H2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 29)

CDR-H3: VGEWIKLWSPFDY (SEQ ID NO: 30)

Легкая цепь антитела 3G7 (каппа)

Легкая цепь

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISWLA WYQQKPGKAPKFLIYAASSLQ
SGVPSKFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYN SYPPTFGGGTKVEIK
 rVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 STLTLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 13; варибельный домен подчеркнут; CDR обозначены двойным подчеркиванием)

Варибельный домен легкой цепи

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISWLA WYQQKPGKAPKFLIYAASSLQ
 SGVPSKFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYN SYPPTFGGGTKVEIK

(SEQ ID NO: 75)

CDR легкой цепи 3G7

CDR-L1: RASQGISWLA (SEQ ID NO: 31)

CDR-L2: AASSLQS (SEQ ID NO: 32)

CDR-L3: QQYN SYPPT (SEQ ID NO: 33)

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, включающие CDR тяжелой и

легкой цепи 3G7, или V_H и V_L 3G7, или тяжелую цепь и легкую цепь 3G7 (или их вариант, например, как указано в настоящем описании), можно обозначать как "3G7".

Тяжелая цепь антитела 2C1 (Q1E) (IgG4)

Тяжелая цепь

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFD
PEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAGPLYTIFGVVIIP
DNWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESK
 YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
 GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(SEQ ID NO: 14; переменный домен подчеркнут; CDR обозначены двойным подчеркиванием)

Переменный домен тяжелой цепи

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFD
 PEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAGPLYTIFGVVIIP
 DNWFDPWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 68)

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, где остаток 1 SEQ ID NO: 14 или 68 является Q вместо E.

CDR тяжелой цепи 2C1

CDR-H1: ELSMH (SEQ ID NO: 34)

CDR-H2: GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 35)

CDR-H3: AGPLYTIFGVVIIPDNWFDP (SEQ ID NO: 36)

Легкая цепь антитела 2C1 (Q1E) (лямбда)

Легкая цепь

ESVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSN
RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGSGVVFGGGTQLIILGQP
 KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS
 NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 15; переменный домен подчеркнут; CDR обозначены двойным подчеркиванием)

Переменный домен легкой цепи

ESVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSN
 RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGSGVVFGGGTQLIIL

(SEQ ID NO: 76)

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, где остаток 1 SEQ ID NO: 15 или 76 является Q вместо E.

CDR легкой цепи 2C1

CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 37)

CDR-L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 38)

CDR-L3: QSYDSSLSGSGVV (SEQ ID NO: 39)

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, включающие CDR тяжелой и легкой цепи 2C1, или V_H и V_L 2C1, или тяжелую цепь и легкую цепь 2C1 (или их вариант, например, как указано в настоящем описании), можно обозначать как "2C1".

В различных вариантах осуществления антитела или его антигенсвязывающего фрагмента отсутствует С-концевой лизин тяжелой цепи иммуноглобулина.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь иммуноглобулина, тяжелую цепь иммуноглобулина, или и легкую, и тяжелую цепь иммуноглобулина, где легкая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 11, 13, 15 или 45; и/или тяжелая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, 2, 8, 9, 10, 12, 14, 44, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 или 86.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 или 79; и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 или 80; и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4.

В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 или 80; и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5.

В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 или 80; и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6.

В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 или 80; и легкую цепь

иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 или 80; и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8 или 82; и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11.

В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9 или 83; и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11.

В других вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10 или 84; и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11.

В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12 или 85; и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13.

В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14 или 86; и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15.

В некоторых других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь иммуноглобулина, тяжелую цепь иммуноглобулина, или и легкую, и тяжелую цепь иммуноглобулина, где переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70, 71, 72, 73, 58, 74, 75, 76 или 77, и/или переменный домен тяжелой цепи

фрагмент содержит: переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 67, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75.

В других вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 68, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76.

В дополнительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с ILT4, содержит переменный домен (V_L) легкой цепи иммуноглобулина, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 1E1 (например, SEQ ID NO: 19–21), и переменный домен (V_H) тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 1E1 (например, SEQ ID NO: 16–18).

В дополнительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с ILT4, содержит переменный домен (V_L) легкой цепи иммуноглобулина, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 2A6 (например, SEQ ID NO: 25–27), и переменный домен (V_H) тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 2A6 (например, SEQ ID NO: 22–24).

В дополнительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с ILT4, содержит переменный домен (V_L) легкой цепи иммуноглобулина, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 3G7 (например, SEQ ID NO: 31–33), и переменный домен (V_H) тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 3G7 (например, SEQ ID NO: 28–30).

В дополнительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с ILT4, содержит переменный домен (V_L) легкой цепи иммуноглобулина, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 2C1 (например, SEQ ID NO: 37–39), и переменный домен (V_H) тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 2C1 (например, SEQ ID NO: 34–36).

В одном из вариантов осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 49) и CDR-L3: QSFNLSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQSNRPS (SEQ ID NO: 50) и CDR-L3: QSFNLSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В еще одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQSNRPS (SEQ ID NO: 50) и CDR-L3: QSFNLSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GESNRPS (SEQ ID NO: 51) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDSNRPS (SEQ ID NO: 52) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNANRPS (SEQ ID NO: 53) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQANRPS (SEQ ID NO: 54) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В еще одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GEANRPS (SEQ ID NO: 55) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDANRPS (SEQ ID NO: 56) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 49) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQSNRPS (SEQ ID NO: 50) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В еще одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDSNRPS (SEQ ID NO: 52) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GESNRPS (SEQ ID NO: 51) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDSNRPS (SEQ ID NO: 52) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В одном из вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNANRPS (SEQ ID NO: 53) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQANRPS (SEQ ID NO: 54) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В еще одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GEANRPS (SEQ ID NO: 55) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: домен V_H , содержащий: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDANRPS (SEQ ID NO: 56) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

Настоящее изобретение дополнительно относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с ILT4 и содержащему домен V_L антитела 1E1 (например, SEQ ID NO: 70, 71, 72, 73, 58 или 77) и/или домен V_H антитела 1E1 (например, SEQ ID NO: 63, 57 или 69).

Настоящее изобретение дополнительно относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с ILT4 и содержащему домен V_L антитела 2A6 (например, SEQ ID NO: 74) и/или домен V_H антитела 2A6 (например, SEQ ID NO: 64, 65 или 66).

Настоящее изобретение дополнительно относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с ILT4 и содержащему домен V_L антитела 3G7 (например, SEQ ID NO: 75) и/или домен V_H антитела 3G7 (например, SEQ ID NO: 67).

Настоящее изобретение дополнительно относится к антителу или его

антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с ILT4 и содержащему домен V_L антитела 2C1 (например, SEQ ID NO: 76) и/или домен V_H антитела 2C1 (например, SEQ ID NO: 68).

Настоящее изобретение дополнительно относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с ILT4 и содержащему легкую цепь иммуноглобулина антитела 1E1 (например, SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 или 45) и/или тяжелую цепь иммуноглобулина антитела 1E1 (например, SEQ ID NO: 1, 2, 44, 79, 80 или 81).

Настоящее изобретение дополнительно относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с ILT4 и содержащему легкую цепь иммуноглобулина антитела 2A6 (например, SEQ ID NO: 11) и/или тяжелую цепь иммуноглобулина антитела 2A6 (например, SEQ ID NO: 8, 9, 10, 82, 83 или 84).

Настоящее изобретение дополнительно относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с ILT4 и содержащему легкую цепь иммуноглобулина антитела 3G7 (например, SEQ ID NO: 13) и/или тяжелую цепь иммуноглобулина антитела 3G7 (например, SEQ ID NO: 12 или 85).

Настоящее изобретение дополнительно относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с ILT4 и содержащему легкую цепь иммуноглобулина антитела 2C1 (например, SEQ ID NO: 15) и/или тяжелую цепь иммуноглобулина антитела 2C1 (например, SEQ ID NO: 14 или 86).

Настоящее изобретение дополнительно относится к антителу, состоящему из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где каждая легкая цепь содержит V_L или легкую цепь иммуноглобулина антитела 1E1, 2A6, 3G7 или 2C1, и каждая тяжелая цепь содержит V_H или тяжелую цепь иммуноглобулина антитела 1E1, 2A6, 3G7 или 2C1.

В одном из вариантов осуществления антитело состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где каждая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58, и каждая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57.

В другом варианте осуществления антитело состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где каждая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58, и каждая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, где легкая цепь дополнительно содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90.

В еще одном варианте осуществления антитело состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где каждая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58, и каждая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, где тяжелая цепь дополнительно содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89.

В другом варианте осуществления антитело состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где каждая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность,

приведенную в SEQ ID NO: 58, и каждая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, где легкая цепь дополнительно содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90, и тяжелая цепь дополнительно содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89.

В одном из вариантов осуществления антитело состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где каждая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и каждая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

В другом варианте осуществления антитело состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где каждая легкая цепь состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7, и каждая тяжелая цепь состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2.

В варианте осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержит V_L (с сигнальной последовательностью или без нее), например, V_L в любой из SEQ ID NO: 58 или 70–77, содержащий до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более консервативных или неконсервативных аминокислотных замен; и/или V_H (с сигнальной последовательностью или без нее), например, V_H в любой из SEQ ID NO: 57 или 63–69, содержащий до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более консервативных или неконсервативных аминокислотных замен, но все равно связывающийся с ILT4.

Настоящее изобретение также относится к полипептидам, содержащим аминокислотные последовательности, представленные в настоящем описании, например SEQ ID NO: 1–39, 44, 45, 47–58, 63–77 или 79–86, а также полипептиды, содержащие такие аминокислотные последовательности с до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 или более консервативных или неконсервативных аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь иммуноглобулина, тяжелую цепь иммуноглобулина, или и легкую, и тяжелую цепь иммуноглобулина, где легкая цепь иммуноглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности аминокислотных последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 11, 13, 15 или 45, и/или тяжелая цепь иммуноглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности аминокислотных последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, 2, 8, 9, 10, 12, 14, 44, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 или 86.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь иммуноглобулина, тяжелую цепь иммуноглобулина, или и легкую, и тяжелую цепь иммуноглобулина, где легкая цепь иммуноглобулина содержит переменный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичности аминокислотных последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 70, 71, 72, 73, 58, 74, 75, 76 или 77, и/или

тяжелая цепь иммуноглобулина содержит вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичности аминокислотных последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 63, 57, 64, 65, 66, 67, 68 или 69.

В варианте осуществления изобретения тяжелая цепь иммуноглобулина антитела против ILT4 или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению функционально связана с сигнальной последовательностью, например, содержащей аминокислотную последовательность MEWSWVFLFFLSVTTGVHS (SEQ ID NO: 41), и/или легкая цепь иммуноглобулина антитела против ILT4 или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению функционально связана с сигнальной последовательностью, например, содержащей аминокислотную последовательность MSVPTQVLGLLLLWLTDARC (SEQ ID NO: 42).

В варианте осуществления изобретения N-концевой глутамин (Q) цепи иммуноглобулина, приведенной в настоящем описании (например, тяжелой и/или легкой), заменяют пироглутаминовой кислотой. В одном из вариантов осуществления N-концевой Q тяжелой цепи иммуноглобулина заменяют пироглутаминовой кислотой. В другом варианте осуществления N-концевой Q легкой цепи иммуноглобулина заменяют пироглутаминовой кислотой. В еще одном варианте осуществления N-концевой Q тяжелой цепи иммуноглобулина и N-концевой Q тяжелой цепи иммуноглобулина заменяют пироглутаминовой кислотой.

Настоящее изобретение также относится к антителам или антигенсвязывающим фрагментам, связывающимся с тем же эпитопом ILT4 (например, ILT4 человека), что и любое антитело против ILT4 или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в настоящем описании (например, 1E1, 2A6, 3G7 или 2C1). В одном из вариантов осуществления эпитоп представляет собой LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59). В другом варианте осуществления эпитоп представляет собой TRIRPEL (SEQ ID NO: 60). В еще одном варианте осуществления эпитоп представляет собой NGQF (SEQ ID NO: 61). В другом варианте осуществления эпитоп представляет собой HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом ILT4 человека, что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, приведенные в SEQ ID NO: 1 и 3; 2 и 4; 2 и 5; 2 и 6; 2 и 7; 2 и 3; 8 и 11; 9 и 11; 10 и 11; 12 и 13; 14 и 15; 79 и 3; 80 и 4; 80 и 5; 80 и 6; 80 и 7; 80 и 3; 82 и 11; 83 и 11; 84 и 11; 85 и 13; и 86 и 15; соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом ILT4 человека, что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотные последовательности вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи, приведенные в SEQ ID NO: 63 и 70; 57 и 71; 57 и 72; 57 и 73; 57 и 58; 57 и 70; 64 и 74; 65 и 74; 66 и 74; 67 и 75; 68 и 76; соответственно.

Настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты,

перекрестно блокирующие связывание любого антитела против ILT4 или его антигенсвязывающего фрагмента, представленных в настоящем описании (например, 1E1, 2A6, 3G7 или 2C1), с ILT4 (например, ILT4 человека), или конкурирующие с любым антителом против ILT4 или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в настоящем описании (например, 1E1, 2A6, 3G7 или 2C1), с ILT4 (например, ILT4 человека). Перекрестно блокирующие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем описании, можно идентифицировать с учетом их способности блокировать связывание любых из антител или фрагментов, конкретно приведенных в настоящем описании, с ILT4 в анализах связывания (например, посредством интерферометрии биослоя (BLI; например, анализе связывания FORTEBIO OCTET; Pall ForteBio Corp; Menlo Park, CA), поверхностного плазмонного резонанса (SPR), BIACore, ELISA, проточной цитометрии). Например, в варианте осуществления изобретения при использовании BLI кончик оптоволоконного зонда покрывают лигандом (например, ILT4) и используют в качестве биосенсора, где связывание антитела против ILT4 или антигенсвязывающего фрагмента с ILT4 изменяет картину интерференции белого света, отражающегося от слоя зонда, связанного с ILT4, и внутреннего референсного слоя. Сдвиг свидетельствует о связывании ILT4/антитела против ILT4. В варианте осуществления изобретения покрытый ILT4 кончик погружают в раствор аналита, содержащего антитело или антигенсвязывающий фрагмент, например, в лунке 96- или 384-луночного планшета. В варианте осуществления изобретения планшет встряхивают во время считывания для создания орбитального потока. Для считывания при анализе белый свет направляют по длине волокна. Как указано выше, интерференция света, отражающегося от референсного слоя и иммобилизованных поверхностей, содержащих ILT4 с кончика, создает характерную картину света, возвращающегося вверх по волокну. Когда молекулы связываются с иммобилизованной сенсорной поверхностью, эта картина меняется пропорционально степени связывания. Например, можно использовать анализы, в которых белок ILT4 (например, ILT4 человека) иммобилизуют на зонде BLI или планшете, референсное антитело против ILT4 или фрагмент связывается с ILT4 (например, в насыщающей концентрации), и добавляют тестируемое антитело против ILT4 или фрагмент. Затем определяют способность тестируемого антитела конкурировать с референсным антителом за связывание с ILT4. В формате BLI интерференцию комплекса ILT4 подвергают мониторингу для определения того, конкурирует ли антитело эффективно с референсным антителом, например, мониторингу подвергают сдвиг длины волны света в нанометрах с течением времени, где сдвиг свидетельствует о дополнительном связывании тестируемого антитела и отсутствии перекрестного блокирования. В варианте осуществления изобретения в формате BLI перекрестное блокирование в качественном отношении считают происходящим между антителами, если не наблюдают дополнительного связывания тестируемого антитела. В варианте осуществления изобретения в качестве контроля подтверждают перекрестное блокирование референсного антитела самим собой; где считают, что анализ проведен

правильно, если референсное антитело может перекрестно блокировать свое собственное связывание с ILT4. Способность тестируемого антитела ингибировать связывание антитела против ILT4 или фрагмента 1E1, 2A6, 3G7 или 2C1 с ILT4 (например, ILT4 человека) свидетельствует о том, что тестируемое антитело может перекрестно блокировать связывание антитела или фрагмента с ILT4 (например, ILT4 человека) и, таким образом, в некоторых случаях может связываться с тем же эпитопом ILT4 (например, ILT4 человека), что и 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1. Как указано выше, антитела и фрагменты, связывающиеся с тем же эпитопом, что и любые из антител против ILT4 или фрагментов по настоящему изобретению, также являются частью настоящего изобретения. В варианте осуществления изобретения BLI осуществляют в сэндвич-формате, где референсное антитело против ILT4 или антигенсвязывающий фрагмент иммобилизуют на зонде, а затем оно связывается с ILT4. Затем тестируемое антитело против ILT4 или антигенсвязывающий фрагмент тестируют на способность связываться с референсным антителом или фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с ILT4 человека с антителом или фрагментом, содержащим аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, приведенные в SEQ ID NO: 1 и 3; 2 и 4; 2 и 5; 2 и 6; 2 и 7; 2 и 3; 8 и 11; 9 и 11; 10 и 11; 12 и 13; 14 и 15; 79 и 3; 80 и 4; 80 и 5; 80 и 6; 80 и 7; 80 и 3; 82 и 11; 83 и 11; 84 и 11; 85 и 13; и 86 и 15; соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с ILT4 человека с антителом или фрагментом, содержащим аминокислотные последовательности переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи, приведенные в SEQ ID NO: 63 и 70; 57 и 71; 57 и 72; 57 и 73; 57 и 58; 57 и 70; 64 и 74; 65 и 74; 66 и 74; 67 и 75; 68 и 76; соответственно.

Настоящее изобретение относится к антителам против ILT4 и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим N-связанные гликаны, как правило, добавляемые к иммуноглобулинам, продуцируемым в клетках яичника китайского хомяка (N-связанные гликаны CHO) или сконструированных дрожжевых клетках (N-связанные гликаны сконструированных дрожжей), таких как, например, *Pichia pastoris*. Например, в варианте осуществления изобретения антитела против ILT4 и их антигенсвязывающие фрагменты содержат один или более из "N-связанных гликанов сконструированных дрожжей" или "N-связанных гликанов CHO", приведенных на фигурах 16 (например, G0, и/или G0-F, и/или G1, и/или G1-F, и/или G2-F, и/или Man5). В варианте осуществления изобретения антитела против ILT4 и их антигенсвязывающие фрагменты содержат N-связанные гликаны сконструированных дрожжей, т.е. G0, и/или G1, и/или G2, необязательно, дополнительно включающие Man5. В варианте осуществления изобретения антитела против ILT4 и их антигенсвязывающие фрагменты содержат N-связанные гликаны CHO, т.е. G0-F, G1-F и G2-F, необязательно, дополнительно включающие G0, и/или G1, и/или G2, и/или Man5. В варианте осуществления изобретения

приблизительно от 80% до приблизительно 95% (например, приблизительно 80–90%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%) всех N-связанных гликанов на антителах против ILT4 и их антигенсвязывающих фрагментах являются N-связанными гликанами сконструированных дрожжей или N-связанными гликанами СНО. См. Nett et al. *Yeast*. 28(3): 237–252 (2011); Hamilton et al. *Science*. 313(5792): 1441–1443 (2006); Hamilton et al. *Curr Opin Biotechnol*. 18(5): 387–392 (2007). Например, в варианте осуществления изобретения сконструированная дрожжевая клетка представляет собой GFI5.0, или YGLY8316, или штаммы, приведенные в патенте США № 7795002 или Zha et al. *Methods Mol Biol*. 988:31–43 (2013). См. также публикацию международной патентной заявки № WO2013/066765.

Полинуклеотиды

Настоящее изобретение включает полинуклеотиды (например, ДНК или РНК), кодирующие цепи иммуноглобулинов из антител против ILT4 и их антигенсвязывающих фрагментов, представленных в настоящем описании. Например, настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим тяжелые и/или легкие цепи иммуноглобулина из антител 1E1, 2A6, 3G7 и 2C1 (например, SEQ ID NO: 1–15, 44 и 45 или их варибельный домен), как представлено в настоящем описании, а также нуклеиновые кислоты, гибридизующиеся с ними.

Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим варибельный домен (V_L) легкой цепи антитела, содержащий CDR–L1, CDR–L2 и CDR–L3 1E1 (например, содержащий аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 19–21), и/или варибельный домен (V_H) тяжелой цепи антитела, содержащий CDR–H1, CDR–H2 и CDR–H3 1E1 (например, содержащий аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 16–18).

Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим варибельный домен (V_L) легкой цепи антитела, содержащий CDR–L1, CDR–L2 и CDR–L3 2A6 (например, содержащий аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 25–27), и/или варибельный домен (V_H) тяжелой цепи антитела, содержащий CDR–H1, CDR–H2 и CDR–H3 2A6 (например, содержащий аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 22–24).

Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим варибельный домен (V_L) легкой цепи антитела, содержащий CDR–L1, CDR–L2 и CDR–L3 3G7 (например, содержащий аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 31–33), и/или варибельный домен (V_H) тяжелой цепи антитела, содержащий CDR–H1, CDR–H2 и CDR–H3 3G7 (например, содержащий аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 28–30).

Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим варибельный домен (V_L) легкой цепи антитела, содержащий CDR–L1, CDR–L2 и CDR–L3 2C1 (например, содержащий аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 37–39), и/или варибельный домен (V_H) тяжелой цепи антитела, содержащий CDR–H1, CDR–H2 и CDR–H3 2C1 (например, содержащий аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 34–36).

Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим домен V_L антитела 1E1 (например, SEQ ID NO: 70, 71, 72, 73, 58 или 77) и/или домен V_H антитела

1E1 (например, SEQ ID NO: 63, 57 или 69).

Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим домен V_L антитела 2A6 (например, SEQ ID NO: 74) и/или домен V_H антитела 2A6 (например, SEQ ID NO: 64, 65 или 66).

Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим домен V_L антитела 3G7 (например, SEQ ID NO: 75) и/или домен V_H антитела 3G7 (например, SEQ ID NO: 67).

Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим домен V_L антитела 2C1 (например, SEQ ID NO: 76) и/или домен V_H антитела 2C1 (например, SEQ ID NO: 68).

Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим легкую цепь иммуноглобулин из антитела 1E1 (например, SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 или 45) и/или тяжелую цепь иммуноглобулина антитела 1E1 (например, SEQ ID NO: 1, 2 или 44).

Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим легкую цепь иммуноглобулина антитела 2A6 (например, SEQ ID NO: 11) и/или тяжелую цепь иммуноглобулина антитела 2A6 (например, SEQ ID NO: 8, 9 или 10).

Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим легкую цепь иммуноглобулина антитела 3G7 (например, SEQ ID NO: 13) и/или тяжелую цепь иммуноглобулина антитела 3G7 (например, SEQ ID NO: 12).

Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим легкую цепь иммуноглобулина антитела 2C1 (например, SEQ ID NO: 15) и/или тяжелую цепь иммуноглобулина антитела 2C1 (например, SEQ ID NO: 14).

В конкретном варианте осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 87. В другом конкретном варианте осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 88. В еще одном варианте осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 87, и нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 88.

Настоящее изобретение также относится к экспрессирующим векторам, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты по изобретению, где нуклеиновая кислота функционально связана с одной или более контрольными последовательностями, например, распознаваемыми клеткой-хозяином, если клетка-хозяин трансфицирована с использованием вектора. Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, содержащим экспрессирующий вектор по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева являются клетками CHO.

Способы получения антител и их антигенсвязывающих фрагментов

Антитела против ILT4 и антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем описании (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1), можно получать рекомбинантно. В этом варианте осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие одну или более из иммуноглобулиновых цепей антител и антигенсвязывающих фрагментов по

изобретению (например, любых из SEQ ID NO: 1–15, 44, 45 или 79–86 или содержащих V_H или V_L 1E1, 2A6, 3G7 или 2C1, приведенные в любой из SEQ ID NO: 57, 58, 63–77), можно встраивать в вектор и/или хромосому клетки-хозяина и экспрессировать в рекомбинантной клетке-хозяине. Существует несколько известных в этой области способов, с помощью которых получают рекомбинантные антитела.

Антитела (например, 1E1, 2A6, 3G7 или 2C1) можно выделять из среды для культивирования с использованием стандартных способов очистки белка. Кроме того, экспрессию иммуноглобулиновых цепей по изобретению из производственных линий клеток можно повышать с использованием ряда известных способов. Например, система экспрессии гена глутаминсинтетазы (система GS) представляет собой распространенный подход повышения экспрессии в некоторых условиях. Настоящее изобретение относится к векторам, содержащим один или более полинуклеотидов, кодирующих одну или более из указанных иммуноглобулиновых цепей и ген глутаминсинтетазы (GS). В варианте осуществления изобретения вектор находится в клетке-хозяине, в котором отсутствует функциональная глутаминсинтетаза. В варианте осуществления изобретения клетка-хозяин находится в среде для культивирования, в которой, по существу, отсутствует глутамин. Способы получения одной или более из таких иммуноглобулиновых цепей, или антитела против ILT4, или его антигенсвязывающего фрагмента, включающие культивирование такой клетки-хозяина в среде для культивирования, в которой, по существу, отсутствует глутамин, входят в объем настоящего изобретения, как и такие антитела и фрагменты, получаемые таким способом.

В основном, гликопротеины, продуцируемые в конкретной линии клеток или трансгенном животном, будут иметь профиль гликозилирования, характерный для гликопротеинов, продуцируемых в линии клеток или трансгенном животном. Таким образом, конкретный профиль гликозилирования иммуноглобулиновой цепи, или антитела, или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего иммуноглобулиновую цепь, будет зависеть от конкретной линии клеток или трансгенного животного, используемого для получения антитела. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты с профилем гликозилирования, включающим только нефукозилированные N-гликаны, могут быть предпочтительными, т.к. показано, что эти антитела и антигенсвязывающие фрагменты, как правило, демонстрируют более высокую эффективность, чем соответствующие фукозилированные аналоги *in vitro* и *in vivo* (см. например, Shinkawa et al., J. Biol. Chem. 278: 3466–3473 (2003); патенты США №№ 6946292 и 7214775). Эти антитела против ILT4 и антигенсвязывающие фрагменты (например, 1E1, 2A6, 3G7 или 2C1) с нефукозилированными N-гликанами являются частью настоящего изобретения.

Настоящее изобретение дополнительно включает фрагменты антител из антител против ILT4, представленных в настоящем описании (например, 1E1, 2A6, 3G7 или 2C1). Фрагменты антител включают $F(ab)_2$ -фрагменты, которые можно получать посредством ферментативного расщепления IgG, например, пепсином. Fab-фрагменты можно получать посредством, например, восстановления $F(ab)_2$ дитиотреитолом или меркаптоэтиламином.

Fab-фрагмент представляет собой цепь V_L -CL, соединенную с цепью V_H -CH1 с помощью дисульфидного мостика. F(ab)₂-фрагмент представляет собой два Fab-фрагмента, которые, в свою очередь, соединены двумя дисульфидными мостиками. Fab-части молекул F(ab)₂ включают части Fc-областей, между которыми находятся дисульфидные мостики. Fv-фрагмент представляет собой область V_L или V_H .

Настоящее изобретение относится к антителам против ILT4 и их антигенсвязывающим фрагментам (например, 1E1, 2A6, 3G7 или 2C1), классифицируемым как IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. В одном из вариантов осуществления антитело против ILT4 или антигенсвязывающий фрагмент содержит V_H , как указано в настоящем описании, и константную область тяжелой цепи, например, константную область человека, такую как константную область $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ или $\gamma 4$ тяжелой цепи человека или ее вариант. В варианте осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит V_H , как указано в настоящем описании, и константную область легкой цепи, например, константную область легкой цепи человека, такую как область лямбда или каппа легкой цепи человека или ее вариант. В качестве неограничивающего примера, константная область тяжелой цепи человека может представлять собой $\gamma 1$ или $\gamma 4$, и константная область легкой цепи человек может представлять собой каппа-область. В качестве неограничивающего примера, константная область тяжелой цепи человека может представлять собой $\gamma 1$ или $\gamma 4$, и константная область легкой цепи человек может представлять собой лямбда-область. В варианте осуществления изобретения Fc-область антитела представляет собой $\gamma 4$ с мутацией Ser228Pro (Schuurman, J et al., Mol. Immunol. 38: 1–8, 2001).

В некоторых вариантах осуществления изобретения различные константные домены можно соединять с областями V_L и V_H , полученными из CDR, представленных в настоящем описании. Например, если конкретное предполагаемое применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению относится к измененным эффекторным функциям, можно использовать константный домен тяжелой цепи, иной, чем в IgG1 человека, или гибридный IgG1/IgG4. Такие антитела против ILT4 и их антигенсвязывающие фрагменты (например, 1E1, 2A6, 3G7 или 2C1) и гибриды, содержащие константные домены IgG1 и IgG4, являются частью настоящего изобретения.

В одном из вариантов осуществления константный домен IgG4 отличается от нативного константного домена IgG4 человека (Swiss-Prot, регистрационный номер P01861.1) в положении, соответствующем положению 228 в системе EU и положению 241 в системе Kabat, где нативный Ser108 заменяют Pro для предотвращения потенциального образования межцепочечной дисульфидной связи между Cys106 и Cys109 (соответствующих положениям Cys 226 и Cys 229 в системе EU и положениям Cys 239 и Cys 242 в системе Kabat), которое может помешать правильному образованию внутрицепочечных дисульфидных связей. См. Angal et al. (1993) Mol. Immunol. 30:105. В других случаях можно использовать модифицированный константный домен IgG1, подвергнутый модификации для повышения времени полужизни или снижения

эффекторной функции. Такие антитела против ILT4 и их антигенсвязывающие фрагменты (например, 1E1, 2A6, 3G7 или 2C1), содержащие модифицированный константный домен IgG4, являются частью настоящего изобретения.

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным способам получения антитела против ILT4, или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению (например, 1E1, 2A6, 3G7 или 2C1), или его иммуноглобулиновой цепи, включающим (i) встраивание полинуклеотида, кодирующего одну или более иммуноглобулиновых цепей антитела или фрагмента (например, содержащих аминокислотную последовательность, включающую любую одну или более из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 1–15, 44 и/или 45), например, где полинуклеотид находится в векторе и/или функционально связан с промотором (например, вирусным промотором, промотором CMV или промотором SV40); (ii) культивирование клетки-хозяина (например, клетки-хозяина млекопитающего, грибковой клетки-хозяина, бактериальной клетки-хозяина, клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки NSO, клетки SP2, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки печеночноклеточной карциномы человека (например, Hep G2), клетки A549, клетки 3T3, клетки HEK–293, клетки *Pichia* или клетки *Pichia pastoris*) в условиях, благоприятных для экспрессии полинуклеотидов и, (iii) необязательно, выделение антитела, или фрагмента, или цепи из клетки-хозяина и/или среды, в которой выращивают клетку-хозяина. При получении антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего несколько иммуноглобулиновых цепей, например, антитела, содержащего две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина, коэкспрессия цепей в одной клетки-хозяина приводит к связыванию цепей, например, в клетке, или на поверхности клетки, или вне клетки, если такие цепи секретируются таким образом, что образуется молекула антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Способы по настоящему изобретению включают способы, где экспрессируется только тяжелая цепь иммуноглобулина или только легкая цепь иммуноглобулина (например, любые из цепей, представленных в настоящем описании, включая зрелые фрагменты и/или их вариабельные домены). Такие цепи можно использовать, например, в качестве промежуточных продуктов при экспрессии антитела или антигенсвязывающего фрагмента, включающего такую цепь.

Конструирование Fc–области антитела

Антитела против ILT4 и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1) также можно конструировать так, чтобы они включали модификации в Fc–области, как правило, для изменения одного или более функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, связывание комплемента, связывание Fc–рецептора и/или эффекторная функция (например, антиген–зависимая клеточная цитотоксичность). Кроме того, антитела и фрагменты, представленные в настоящем описании, можно модифицировать химически (например, к антителу можно присоединять одно или более химических соединений) или

модифицировать для изменения его гликозилирования, опять же, для изменения одного или более функциональных свойств антитела. Каждый из этих вариантов осуществления более подробно описан ниже. Нумерация остатков в Fc-области соответствует индексу EU Kabat.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем описании (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1), также включают антитела с модифицированными (или блокированными) Fc-областями для достижения измененных эффекторных функций. См., например, патент США № 5624821; WO2003/086310; WO2005/120571; WO2006/0057702. Такую модификацию можно использовать для повышения или супрессии различных реакций иммунной системы с возможной пользой для диагностики и терапии. Изменения Fc-области включают изменения аминокислот (замены, делеции и/или инсерции), гликозилирование или дегликозилирование, а также добавление множества Fc-доменов. Изменения Fc также могут приводить к изменению времени полужизни терапевтических антител, что делает возможным менее частое введение доз и, таким образом, повышает удобство и снижает использование материала. См. Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731, pp. 734–35.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против ILT4 или антигенсвязывающий фрагмент (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1) является антителом или фрагментом изотипа IgG4, содержащим мутацию серина в пролин в положении, соответствующем положению 228 (S228P; индекс EU) в шарнирной области тяжелой цепи константной области. Показано, что эта мутация устраняет гетерогенность дисульфидных мостиков между тяжелыми цепями в шарнирной области (Angal et al. выше; положение 241 соответствует системе нумерации Kabat).

В одном из вариантов осуществления изобретения шарнирную область CH1 антитела против ILT4 или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1) модифицируют таким образом, что количество остатков цистеина в шарнирной области повышают или снижают (например, на ± 1 , 2 или 3). Этот подход описан в патенте США № 5677425. Количество остатков цистеина в шарнирной области CH1 изменяют, например, для облегчения сборки легких и тяжелых цепей или для повышения или снижения стабильности антитела.

В другом варианте осуществления шарнирную область Fc антитела против ILT4 или антигенсвязывающего фрагмента (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1) подвергают мутагенезу для снижения биологического времени полужизни антитела. Более конкретно, в область поверхности домена CH2–CH3 фрагмента Fc-шарнирной области включают одну или более мутаций аминокислот таким образом, что у антитела уменьшено связывание со стафилококковым протеином А (SpA) относительно связывания с SpA нативного Fc-шарнирного домена. Этот подход подробно описан в патенте США № 6165745.

В другом варианте осуществления антитело против ILT4 или антигенсвязывающий фрагмент (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1) модифицируют для повышения его

биологического времени полужизни. Возможны различные подходы. Например, можно встраивать одну или более из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США № 6277375. Альтернативно, для повышения биологического времени полужизни можно изменять область CH1 или CL антитела так, чтобы она содержала эпитоп связывания рецептора спасения, полученный из двух петель домена CH2 Fc-области IgG, как описано в патентах США №№ 5869046 и 6121022.

В других вариантах осуществления Fc-область изменяют посредством замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком для изменения эффекторных функций антитела против ILT4 или антигенсвязывающего фрагмента (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1). Например, одну или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, можно заменить другим аминокислотным остатком таким образом, что антитело имеет измененную аффинность к эффекторному лиганду, но сохраняет способность к связыванию антигена родительского антитела. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменяют, может являться, например, Fc-рецептором или компонентом комплемента C1. Этот подход подробно описывают в патентах США №№ 5624821 и 5648260.

В другом примере одну или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322, можно заменять другим аминокислотным остатком таким образом, что антитело против ILT4 или антигенсвязывающий фрагмент (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1) имеет измененное связывание C1q и/или сниженную или устраненную обусловленную компонентом цитотоксичность (CDC). Этот подход подробно описывают в патенте США № 6194551.

В другом примере один или более аминокислотных остатков в положениях аминокислот 231 и 239 изменяют для изменения способности антитела связываться с компонентом. Этот подход описывают в публикации PCT № WO 94/29351.

В другом примере Fc-область модифицируют для повышения или снижения способности антитела против ILT4 или антигенсвязывающего фрагмента (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1) опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или повышать или снижать аффинность антитела или фрагмента к рецептору Fcγ посредством модификации одной или более аминокислот в следующих положениях: 238, 239, 243, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439. Этот подход описывают в публикации PCT № WO 00/42072. Кроме того, картированы участки связывания IgG1 человека с FcγR1, FcγRII, FcγRIII и FcRn и описаны варианты с улучшенным связыванием (см. Shields et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591–6604). Показано, что конкретные мутации в положениях 256, 290, 298, 333, 334 и 339 улучшают связывание с FcγRIII. Кроме того, показано, что следующие комбинированные мутанты улучшают связывание FcγRIII:

T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A и S298A/E333A/K334A.

В одном из вариантов осуществления Fc-область модифицируют для снижения способности антитела против ILT4 или антигенсвязывающего фрагмента (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1) опосредовать эффекторную функцию и/или повышать противовоспалительные свойства посредством модификации остатков 243 и 264. В одном из вариантов осуществления Fc-область антитела модифицируют посредством замены остатков в положениях 243 и 264 аланином. В одном из вариантов осуществления Fc-область модифицируют для снижения способности антитела опосредовать эффекторную функцию и/или повышать противовоспалительные свойства посредством модификации остатков 243, 264, 267 и 328.

Посттрансляционные модификации

В другом варианте осуществления антитело имеет конкретный профиль гликозилирования. Например, агликозилированное антитело против ILT4 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1), в котором отсутствует гликозилирование, является частью настоящего изобретения. Профиль гликозилирования антитела или фрагмента можно изменять, например, для повышения аффинности или авидности антитела к антигену. Такие модификации можно осуществлять, например, посредством изменения одного или более участков гликозилирования в последовательности антитела или фрагмента. Например, можно осуществлять одну или более замен аминокислот, приводящих к удалению одного или более из участков гликозилирования каркаса варибельной области, чтобы, таким образом, устранить гликозилирование в этом участке. Такое агликозилирование может повышать аффинность или авидность антитела или фрагмента к антигену. См., например, патенты США №№ 5714350 и 6350861.

Также можно получать антитело против ILT4 или антигенсвязывающий фрагмент (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1) по изобретению, в котором профиль гликозилирования включает гипофукозилированные или афукозилированные гликаны, такие как гипофукозилированные антитела и антигенсвязывающие фрагменты или афукозилированные антитела и фрагменты, имеющие сниженное количество фукозильных остатков на гликане. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент также могут включать гликаны, имеющие повышенное количество структур GlcNac в точках ветвления. Показано, что такие измененные профили гликозилирования повышают способность антител к ADCC. Такие модификации можно осуществлять, например, посредством экспрессии антитела или фрагмента в клетке-хозяине, в которой путь гликозилирования генетически сконструирован для получения гликопротеинов с конкретными профилями гликозилирования. Эти клетки известны в этой области, и их можно использовать в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируют рекомбинантные антитела по изобретению, для получения антитела с измененным гликозилированием. Например, в линиях клеток Ms704, Ms705, и Ms709 отсутствует ген фукозилтрансферазы, FUT8 ($\alpha(1,6)$ -фукозилтрансферазы), таким образом, что в антителах, экспрессирующихся

в линиях клеток Ms704, Ms705 и Ms709, на углеводах отсутствует фукоза. Настоящее изобретение относится к антителам против ILT4 и антигенсвязывающим фрагментам, в которых отсутствует фукоза или которые получены с помощью клетки-хозяина, в которой отсутствует FUT8. FUT8^{-/-} линии клеток Ms704, Ms705 и Ms709 получены посредством направленного повреждения гена FUT8 в клетках CHO/DG44 с использованием двух векторов замещения (см. патентную публикацию США № 20040110704 и Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614–22). В качестве другого примера, в EP 1176195 описывают линию клеток с функционально поврежденным геном FUT8, кодирующим фукозилтрансферазу, таким образом, что антитела, экспрессирующиеся в такой линии клеток, демонстрируют гипофукозилирование благодаря снижению или устранению фермента, действующего в отношении α -1,6-связи. В EP 1176195 описывают линии клеток человека, имеющие низкую активность фермента в отношении добавления фукозу к N-ацетилглюкозамину, связывающемуся с Fc-областью антитела, или неимеющие ферментативную активность, например, линию клеток миеломы крысы YB2/0 (ATCC CRL 1662). В публикации PCT № WO 03/035835 описывают вариант линии клеток CHO, клетки Lec13, со сниженной способностью присоединять фукозу к Asn(297)-связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессирующихся в этой клетке-хозяине (см. также Shields et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733–26740). Антитела с модифицированным профилем гликозилирования также можно получать в куриных яйцах, как описано в публикации PCT № WO 06/089231. Альтернативно, антитела с модифицированным профилем гликозилирования можно получать в растительных клетках, таких как *Lemna* (патент США № 7632983). Способы получения антител в растительной системе описаны в патентах США №№ 6998267 и 7388081. В публикации PCT № WO 99/54342 описывают линии клеток человека, сконструированные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, β (1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), таким образом, что антитела, экспрессирующиеся в сконструированных линиях клеток, имеют повышенное количество структур GlcNac в точках ветвления, что приводит к повышенной активности ADCC антител (также см. Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17:176–180). Антитела против ILT4 и их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, продуцируемые такими клетками-хозяевами, являются частью настоящего изобретения.

Альтернативно, остатки фукозы в антителе против ILT4 или антигенсвязывающем фрагменте (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1) можно отщеплять с использованием фермента фукозидазы; например, α -L-фукозидаза удаляет фукозильные остатки из антител (Tarentino et al. (1975) *Biochem.* 14:5516–23). Настоящее изобретение относится к антителам и фрагментам, обработанным ферментом фукозидазой.

Антитело против ILT4 или антигенсвязывающие фрагменты (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1), представленные в настоящем описании, дополнительно включают антитела и фрагменты, продуцирующиеся в клетках-хозяевах низших эукариот, в частности, грибковых клетках-хозяевах, таких как дрожжи и нитевидные грибы,

генетически сконструированные для продуцирования гликопротеинов, имеющих профили гликозилирования, подобные таковым у млекопитающих или человека (см. например, Choi et al, (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 5022–5027; Hamilton et al., (2003) Science 301: 1244–1246; Hamilton et al., (2006) Science 313: 1441–1443). Конкретным преимуществом этих генетически модифицированных клеток–хозяев по сравнению с используемыми в настоящее время линиями клеток млекопитающих является возможность контроля профиля гликозилирования гликопротеинов, продуцирующихся в клетках таким образом, что можно получать композиции гликопротеинов, где преобладает конкретная структура N–гликанов (см., например, патент США № 7029872 и патент США № 7449308). Эти генетически модифицированные клетки–хозяева используют для получения антител, преимущественно имеющих конкретные структуры N–гликанов (см., например, Li et al., (2006) Nat. Biotechnol. 24: 210–215).

Конъюгаты антител

Антитела против ILT4 и антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем описании (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1), также можно конъюгировать с пептидом или химическим соединением. Химическое соединение может являться, помимо прочего, полимером, радионуклидом или терапевтическим или цитотоксическим средством. В конкретных вариантах осуществления изобретения химическое соединение является полимером, повышающим время полужизни молекулы антитела в организме индивидуума. Полимеры включают, в качестве неограничивающих примеров, гидрофильные полимеры, включающие, в качестве неограничивающих примеров, полиэтиленгликоль (PEG) (например, PEG с молекулярной массой 2 кДа, 5 кДа, 10 кДа, 12 кДа, 20 кДа, 30 кДа или 40 кДа), декстран и монометоксиполиэтиленгликоль (mPEG). В Lee, et al., (1999) (Bioconj. Chem. 10:973–981) описывают PEG–конъюгированные одноцепочечные антитела. В Wen, et al., (2001) (Bioconj. Chem. 12:545–553) описывают конъюгацию антител с PEG, соединенным с хелатором радиоактивного металла (диэтилентриаминпентауксусной кислотой (DTPA)).

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем описании (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1), также можно конъюгировать с метками, такими как радиоактивные метки. Метки включают, в качестве неограничивающих примеров, ^{99}Tc , ^{90}Y , ^{111}In , ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , ^{131}I , ^{11}C , ^{15}O , ^{13}N , ^{18}F , ^{35}S , ^{51}Cr , ^{57}To , ^{226}Ra , ^{60}Co , ^{59}Fe , ^{57}Se , ^{152}Eu , ^{67}Cu , ^{217}Ci , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd , ^{234}Th , и ^{40}K , ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{52}Tr и ^{56}Fe .

Антитела против ILT4 и фрагменты антител, представленные в настоящем описании (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1), также можно пегилировать (например, с использованием 1 PEG или молекула полимера PEG 3 кДа, 12 кДа или 40 кДа), например, для повышения биологического времени полужизни (например, в сыворотке). Для пегилирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как правило, проводят реакцию антитела или фрагмента с реакционноспособной формой полиэтиленгликоля (PEG), такой как реакционноспособное сложноэфирное или альдегидное производное PEG, в условиях, в которых одну или более группы PEG присоединяют к антителу или

антигенсвязывающему фрагменту. В конкретных вариантах осуществления пегилирование осуществляют посредством реакции ацилирования или алкилирования с реакционноспособной молекулой PEG (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). В рамках изобретения термин "полиэтиленгликоль" предназначен для включения любой из форм PEG, используемых для дериватизации других белков, таких как моно-(C1–C10)–алкокси– или –арилокси–полиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль–малеимид. В некоторых вариантах осуществления антитело, подлежащее пегилированию, является агликозилированным антителом. Способы пегилирования белков известны в этой области, и их можно использовать в отношении антител по изобретению. См., например, EP 0 154 316 и EP 0 401 384.

Антитела против ILT4 и антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем описании (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1), также можно конъюгировать с метками, такими как флуоресцентные или хемилюминесцентные метки, включая флуорофоры, такие как хелаты редкоземельных металлов, флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, изотиоцианат, фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин, о–фталевый альдегид, флуорескамин, ¹⁵²Eu, дансил, умбеллиферон, люциферин, люминоловая метка, изолуминоловая метка, метка сложного эфира ароматического акридиния, имидазоловая метка, метка соли акридиния, метка оксалатного сложного эфира, эквориновая метка, 2,3–дигидрофталазиндионы, биотин/авидин, спиновые метки и стабильные свободные радикалы.

Антитела против ILT4 и антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем описании (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1), также можно конъюгировать с цитотоксическим фактором, таким как дифтерийный токсин, цепь экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa*, цепь A рицина, цепь A абрина, цепь A модецина, альфа–сарцин, белки и соединения *Aleurites fordii* (например, жирные кислоты), диантиновые белки, белки PAPI, PAPII и PAP–S *Phytolacca americana*, ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaria officinalis*, митогеллин, рестриктоцин, феномицин и эномицин.

Можно использовать любой известный в этой области способ конъюгации антител и антигенсвязывающих фрагментов с различными соединениями, включая способы, описанные в Hunter, et al., (1962) *Nature* 144:945; David, et al., (1974) *Biochemistry* 13:1014; Pain, et al., (1981) *J. Immunol. Meth.* 40:219; и Nygren, J., (1982) *Histochem. and Cytochem.* 30:407. Способы конъюгации антитела являются общепринятыми и хорошо известными в этой области.

Фармацевтические композиции и введение

Фармацевтические композиции, содержащие антитела против ILT4 (например, полностью человеческие антитела, такие как антагонистические полностью человеческие антитела (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1) и их антигенсвязывающие фрагменты, можно подготавливать для хранения посредством смешивания антител или их антигенсвязывающих фрагментов, имеющие желаемую степень чистоты, с

необязательными физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (см., например, Remington, *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18th ed. 1980)) в форме водных растворов или лиофилизированных или других высушенных формах.

В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция содержит антитело, состоящее из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где каждая легкая цепь состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7, и каждая тяжелая цепь состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2.

В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит: (i) антитело, состоящее из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где каждая легкая цепь состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7, и каждая тяжелая цепь состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2, и (ii) пембролизумаб.

Составы терапевтических и диагностических средств можно получать посредством смешивания с приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами в форме, например, лиофилизированных порошков, суспензий или водных растворов (см., например, Hardman, et al. (2001) *Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) *Remington: The Science and 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).

Токсичность и терапевтическую эффективность композиций антитела против ILT4 или антигенсвязывающего фрагмента (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1), вводимых в отдельности или в комбинации с другим терапевтическим средством, можно определять стандартными фармацевтическими способами с использованием культур клеток или экспериментальных животных, например, для определения LD₅₀ (дозы, летальной для 50% популяции) и ED₅₀ (дозы, эффективной для 50% популяции). Соотношение доз между токсическими и терапевтическими эффектами представляет собой терапевтический индекс (LD₅₀/ ED₅₀). В конкретных аспектах желательными являются антитела, демонстрирующие высокие терапевтические индексы. Данные, полученные с помощью этих анализов культур клеток и исследований на животных, можно использовать при определении диапазона доз для использования на людях. Доза таких соединений, предпочтительно, попадает в диапазон концентраций в кровотоке, включающих ED₅₀ с невысокой токсичностью или без нее. Дозы могут варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и пути введения.

В дополнительном варианте осуществления индивидууму вводят дополнительное терапевтическое средство, вводимое индивидууму вместе с антителом против ILT4

(например, полностью человеческим антителом, таким как антагонистические полностью человеческие антитела) или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в настоящем описании (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1), в соответствии с Physicians' Desk Reference 2003 (Thomson Healthcare; 57-ое издание (1 ноября 2002 года)).

Способ введения может варьироваться. Пути введения включают пероральный, ректальный, чрезслизистый, кишечный, парентеральный; внутримышечный, подкожный, внутрикожный, интрамедуллярный, интратекальный, прямой внутрижелудочковый, внутривенный, интраперитонеальный, интраназальный, внутриглазной, ингаляционный, инфузионный, местный, кожный, трансдермальный или внутриартериальный.

Настоящее изобретение относится к способам введения антитела против ILT4 или его антигенсвязывающего фрагмента (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1), включающим введение антитела или фрагмента в организм индивидуума. Например, способ включает прокалывание тела индивидуума иглой шприца и инъекцию антитела или фрагмента в организм индивидуума, например, в вену, артерию, опухоль, мышечную ткань или подкожный жир индивидуума.

Настоящее изобретение относится к сосуду (например, пластиковому или стеклянному флакону, например, с крышкой, или хроматографической колонке, полый игле или цилиндру шприца), содержащему любые из антител против ILT4 или антигенсвязывающих фрагментов (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1), приведенных в настоящем описании, или их фармацевтическую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к инъекционному устройству, содержащему любые из антител против ILT4 или антигенсвязывающих фрагментов (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1), приведенных в настоящем описании, или их фармацевтическую композицию. Инъекционное устройство является устройством, с помощью которого вещество вводят в организм индивидуума парентеральным, например, внутримышечным, подкожным или внутривенным. Например, инъекционное устройство может представлять собой шприц (например, предварительно наполненный фармацевтической композицией, такой как автоинжектор), например, включающий цилиндр для удержания жидкости, подлежащей инъекции (например, содержащей антитело, или фрагмент, или их фармацевтическую композицию), иглу для прокалывания кожи и/или кровеносных сосудов для инъекции жидкости; и поршень для проталкивания жидкости из цилиндра и через полость иглы. В варианте осуществления изобретения инъекционное устройство, содержащее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению или их фармацевтическую композицию, является устройством для внутривенной (IV) инъекции. Такое устройство включает антитело, или фрагмент, или их фармацевтическую композицию в канюле или троакаре/игле, которые соединяют с трубкой, которую можно соединять с мешком или резервуаром для удержания жидкости (например, физиологического раствора или раствора лактата Рингера, содержащего NaCl, лактат натрия, KCl, CaCl₂ и, необязательно,

включающего глюкозу), вводимой в организм индивидуума через канюлю или троакар/иглу.

Фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, также можно вводить с использованием безыгольного подкожного инъекционного устройства, такого как устройства, описанные в патентах США №№ 6620135, 6096002, 5399163, 5383851, 5312335, 5064413, 4941880, 4790824 или 4596556. Такие безыгольные устройства, содержащие фармацевтическую композицию, также являются частью настоящего изобретения. Фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, также можно вводить посредством инфузии. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей для введения фармацевтических композиций включают устройства, описываемые в: патенте США № 4487603, в котором описывают имплантируемую микроинфузионную помпу для распределения лекарственного средства с контролируемой скоростью; патенте США № 4447233, в котором описывают инфузионную помпу для введения лекарственного средства с точной скоростью инфузии; патенте США № 4447224, в котором описывают имплантируемое устройство для инфузии с переменным потоком для непрерывного введения лекарственного средства; патенте США № 4439196, в котором описывают систему для осмотической доставки лекарственного средства, имеющую многокамерные компартменты. Специалистам в этой области хорошо известны многие другие такие имплантаты, системы введения и модули, и имплантаты, системы введения и модули, содержащие фармацевтические композиции по настоящему изобретению, входят в объем настоящего изобретения.

Антитела (например, полностью человеческие антитела, такие как антагонистические полностью человеческие антитела) или их антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем описании (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1), можно вводить посредством непрерывной инфузии или с помощью доз, вводимых, например, ежедневно, 1–7 раз в неделю, раз в неделю, раз в две недели, ежемесячно, раз в два месяца, раз в квартал, раз в полгода, ежегодно и т.д. Дозы можно вводить, например, внутривенно, подкожно, местно, перорально, назально, ректально, внутримышечно, внутричерепно, интраспинально или посредством ингаляции. Эффективная доза антитела против ILT4 или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению составляет от приблизительно 0,05 мг/кг (массы тела) до приблизительно 30 мг/кг (массы тела), например, для лечения или профилактики злокачественного новообразования или инфекционных заболеваний.

Определение подходящей дозы осуществляет клиницист, например, с использованием параметров или факторов, которые, как известно или как предполагают в этой области, влияют на лечение. Как правило, при определении дозы начинают с количества, немного меньшего, чем оптимальная доза, и его повышают с небольшими приращениями до достижения желаемого или оптимального эффекта относительно каких-либо отрицательных побочных эффектов. Важные диагностические параметры включают параметры симптомов, например, воспаления или уровень продуцируемых

воспалительных цитокинов. В основном, желательно получать биологическое средство, предназначенное для использования, из того же вида, к которому принадлежит животное, подлежащее лечению, чтобы, таким образом, минимизировать какой-либо иммунный ответ на реагент. В случае людей желательными могут являться, например, химерные и полностью человеческие антитела. Доступны руководства по выбору подходящих доз антител против ILT4 или фрагментов (см., например, 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).

То, уменьшен ли симптом заболевания, можно оценивать посредством любого клинического измерения, как правило, используемого лечащими врачами или другими медицинскими работниками, для оценки тяжести или статуса прогрессирования этого симптома. Хотя вариант осуществления настоящего изобретения (например, способ лечения или промышленное изделие) может не быть эффективным в уменьшении симптомов целевого заболевания у каждого индивидуума, он должен уменьшать симптомы целевого заболевания у статистически значимого количества индивидуумов, что определяют с помощью любого статистического критерия, известного в этой области, такого как *t*-критерий Стьюдента, критерий хи-квадрат, *U*-критерий Манна и Уитни, критерий Краскела–Уоллиса (*H*-критерий), критерий Джонкхиера–Терпстра и критерия Вилкоксона.

Терапевтическое применение антитела против ILT4

Настоящее изобретение также относится к способам лечения или профилактики злокачественного новообразования у индивидуумов, таких как люди, нуждающихся в таком лечении, посредством введения эффективного количества антител против ILT4 или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению, представленных в настоящем описании (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1), которые могут быть эффективными для такого лечения или профилактики.

В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование является солидной опухолью. В других вариантах осуществления злокачественное новообразование является гемобластомом. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование является метастазирующим. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование является рецидивирующим. В других вариантах осуществления злокачественное новообразование является рефрактерным. В других вариантах осуществления злокачественное новообразование является рецидивирующим и рефрактерным.

В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование является

анapластической астроцитомой, астроцитомой, раком мочевого пузыря, раком костной ткани, злокачественным новообразованием головного мозга, раком молочной железы (например, отличающимся мутацией BRCA1 и/или BRCA2), карциноидной опухолью, раком шейки матки, хондросаркомой, папилломой хориоидного сплетения, колоректальным раком, раком эндометрия, эпендимомой, раком пищевода, саркомой Юинга, раком желчного пузыря, раком желудка, глиобластомой, раком головы и шеи, гепатобластомой, печеночноклеточной карциномой, идиопатическим миелофиброзом, раком почки, лейкозом, раком печени, раком легких (например, немелкоклеточным раком легких), лимфомой, медуллобластомой, меланомой, менингиомой, карциномой Меркеля, мезотелиомой, множественной миеломой, нейробластомой, олигодендроглиомой, остеосаркомой, раком яичников, раком поджелудочной железы, истинной полицитемией, примитивной нейроэктодермальной опухолью, раком предстательной железы, почечноклеточным раком, переходноклеточным раком почки, ретинобластомой, рабдоидной опухолью почки, рабдомиосаркомой, раком слюнных желез, саркомой, раком тонкого кишечника, саркомой мягких тканей, плоскоклеточной карциномой (например, плоскоклеточной карциномой кожи), синовиальной саркомой, тромбоцитемией, раком щитовидной железы, раком матки, вестибулярной шванномой или опухолью Вильмса. В варианте осуществления изобретения злокачественное новообразование является метастазирующим злокачественным новообразованием, например, описанных выше типов.

В варианте осуществления изобретения злокачественное новообразование является богатой миелоидными клетками опухолью (например, мезотелиомой, раком почки, лимфомой, саркомой, меланомой, раком головы и шеи, раком молочной железы, раком мочевого пузыря, раком желудка, раком яичников или раком щитовидной железы; см. например, Burt et al. *Cancer*. 117 (22):5234–44 (2011); Dannenmann et al. *Oncoimmunology* 2(3):e23562 (2013); Steidl et al. *N. Engl. J. Med.* 362:875–885 (2010); Fujiwara et al., *Am. J. Pathol.* 179(3):1157–70 (2011); Bronkhorst et al. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52(2):643–50 (2011); Balermipas et al. *Br. J. Cancer* 111(8):1509–18 (2014); и Zhang et al. *PLoS One* 7(12):e50946 (2012)). Т.к. ILT4 экспрессируется, главным образом, миелоидными клетками и гранулоцитами, и инфильтрация опухолей миелоидными клетками, как правило, ассоциирована с неблагоприятным прогнозом в результате иммуносупрессорных эффектов этих клеток, которые могут антагонистически действовать на противоопухолевые ответы Т-клеток, лечение антителом против ILT4 или антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению будет приносить пользу индивидуумам с высокой инфильтрацией миелоидными или иммуносупрессорными миелоидными клетками.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека, включающим введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего (а) CDR–L1, CDR–L2 и CDR–L3 переменного домена (V_L)

легкой цепи иммуноглобулиновой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3–7, 11, 13, 15 или 45; и/или (b) CDR–H1, CDR–H2 и CDR–H3 варибельного домена (V_H) тяжелой цепи иммуноглобулиновой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, 2, 8–10, 12, 14, 44 или 79–86.

В варианте осуществления изобретения способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: (1) домен V_H , содержащий: определяющую комплементарность область–H1 (CDR–H1): GYYWS (SEQ ID NO: 16), определяющую комплементарность область–H2 (CDR–H2): EINHXGSTNYPNPSLKS, где X является S или A (SEQ ID NO: 17), и определяющую комплементарность область–H3 (CDR–H3): LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: определяющую комплементарность область–L1 (CDR–L1): TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), определяющую комплементарность область–L2 (CDR–L2): GX₁X₂NRPS; где X₁ является S или A, и X₂ является N, Q, E или D (SEQ ID NO: 20), и определяющую комплементарность область–L3 (CDR–L3): QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21); (2) домен V_H , содержащий: CDR–H1: SYAIS (SEQ ID NO: 22), CDR–H2: GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 23) и CDR–H3: YFX₁X₂SGWYKGGAFDI; где X₁ является D или S, и X₂ является S или A (SEQ ID NO: 24), и/или домен V_L , содержащий: CDR–L1: TLRSGINVDTYRIH (SEQ ID NO: 25), CDR–L2: YKSDSDKHQGS (SEQ ID NO: 26) и CDR–L3: AIWYSSTWV (SEQ ID NO: 27); (3) домен V_H , содержащий: CDR–H1: SYAMH (SEQ ID NO: 28), CDR–H2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 29) и CDR–H3: VGEWIQLWSPFDY (SEQ ID NO: 30), и/или домен V_L , содержащий: CDR–L1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO: 31), CDR–L2: AASSLQS (SEQ ID NO: 32) и CDR–L3: QQYNSYPPT (SEQ ID NO: 33); и/или (4) домен V_H , содержащий: CDR–H1: ELSMH (SEQ ID NO: 34), CDR–H2: GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 35) и CDR–H3: AGPLYTIFGVVIIPDNWFDP (SEQ ID NO: 36), и/или домен V_L , содержащий: CDR–L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 37), CDR–L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 38) и CDR–L3: QSYDSSLGSGVV (SEQ ID NO: 39).

В одном из вариантов осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR–H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR–H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR–H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR–L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR–L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 49) и CDR–L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR–H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR–H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ

ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQSNRPS (SEQ ID NO: 50) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В еще одном варианте осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GESNRPS (SEQ ID NO: 51) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDSNRPS (SEQ ID NO: 52) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В одном из вариантов осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNANRPS (SEQ ID NO: 53) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQANRPS (SEQ ID NO: 54) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В еще одном варианте осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GEANRPS (SEQ ID NO: 55) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку

эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDANRPS (SEQ ID NO: 56) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В одном из вариантов осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 49) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQSNRPS (SEQ ID NO: 50) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В еще одном варианте осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GESNRPS (SEQ ID NO: 51) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDSNRPS (SEQ ID NO: 52) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В одном из вариантов осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNANRPS (SEQ ID NO: 53) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQANRPS (SEQ ID NO: 54) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В еще одном варианте осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GEANRPS (SEQ ID NO: 55) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDANRPS (SEQ ID NO: 56) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В других вариантах осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: легкую цепь иммуноглобулина, тяжелую цепь иммуноглобулина, или и легкую, и тяжелую цепь иммуноглобулина, где легкая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 11, 13, 15 или 45; и/или тяжелая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, 2, 8, 9, 10, 12, 14, 44, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 или 86.

В других вариантах осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: легкую цепь иммуноглобулина, тяжелую цепь иммуноглобулина, или и легкую, и тяжелую цепь иммуноглобулина, где переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70, 71, 72, 73, 58, 74, 75, 76 или 77, и/или переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 63, 57, 64, 65, 66, 67, 68 или 69.

В других вариантах осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку

[illegible]

легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5; (15) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6; (16) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7; (17) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3; (18) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 82; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11; (19) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11; (20) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 84; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11; (21) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13; или (22) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15.

В других вариантах осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: любые из следующих наборов переменных доменов тяжелой цепи и переменных доменов легкой цепи: (1) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 63, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70; (2) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71; (3) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 72; (4) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73; (5) переменный домен тяжелой

цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58; (6) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70; (7) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 64, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74; (8) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 65, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74; (9) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 66, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74; (10) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 67, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75; или (11) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 68, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: домен V_H , содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, и домен V_L , содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58.

В другом предпочтительном варианте осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7.

В другом предпочтительном варианте осуществления способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80, и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7.

Настоящее изобретение также относится к способам блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F у нуждающегося в этом человека,

включающим введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего (а) CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 переменного домена (V_L) легкой цепи иммуноглобулина, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3–7, 11, 13, 15 или 45; и/или (б) CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 переменного домена (V_H) тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, 2, 8–10, 12, 14, 44 или 79–86.

В варианте осуществления изобретения способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: (1) домен V_H , содержащий: определяющую комплементарность область-H1 (CDR-H1): GYYWS (SEQ ID NO: 16), определяющую комплементарность область-H2 (CDR-H2): EINHSGSTNYPNPSLKS, где X является S или A (SEQ ID NO: 17), и определяющую комплементарность область-H3 (CDR-H3): LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: определяющую комплементарность область-L1 (CDR-L1): TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), определяющую комплементарность область-L2 (CDR-L2): GX₁X₂NRPS, где X₁ является S или A, и X₂ является N, Q, E или D (SEQ ID NO: 20), и определяющую комплементарность область-L3 (CDR-L3): QSFNLSLSAYV (SEQ ID NO: 21); (2) домен V_H , содержащий: CDR-H1: SYAIS (SEQ ID NO: 22), CDR-H2: GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 23) и CDR-H3: YFX₁X₂SGWYKGGAFDI, где X₁ является D или S, и X₂ является S или A (SEQ ID NO: 24), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TLRSGINVDYRIH (SEQ ID NO: 25), CDR-L2: YKSDSDKHQGS (SEQ ID NO: 26) и CDR-L3: AIWYSSTWV (SEQ ID NO: 27); (3) домен V_H , содержащий: CDR-H1: SYAMH (SEQ ID NO: 28), CDR-H2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 29) и CDR-H3: VGEWIQLWSPFDY (SEQ ID NO: 30), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO: 31), CDR-L2: AASSLQS (SEQ ID NO: 32) и CDR-L3: QQYNSYPPT (SEQ ID NO: 33); и/или (4) домен V_H , содержащий: CDR-H1: ELSMH (SEQ ID NO: 34), CDR-H2: GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 35) и CDR-H3: AGPLYTIFGVVIIPDNWFDP (SEQ ID NO: 36), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 37), CDR-L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 38) и CDR-L3: QSYDSSLGSGVV (SEQ ID NO: 39).

В одном из вариантов осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L , содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 49) и CDR-L3: QSFNLSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F у нуждающегося в этом человека включает введение

человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQSNRPS (SEQ ID NO: 50) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В еще одном варианте осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GESNRPS (SEQ ID NO: 51) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDSNRPS (SEQ ID NO: 52) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В одном из вариантов осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNANRPS (SEQ ID NO: 53) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQANRPS (SEQ ID NO: 54) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В еще одном варианте осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GEANRPS (SEQ ID NO: 55) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDANRPS (SEQ ID NO: 56) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В одном из вариантов осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 49) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQSNRPS (SEQ ID NO: 50) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В еще одном варианте осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GESNRPS (SEQ ID NO: 51) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDSNRPS (SEQ ID NO: 52) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В одном из вариантов осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDSNRPS (SEQ ID NO: 52) и CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

18), и/или домен V_L, содержащий: CDR–L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR–L2: GNANRPS (SEQ ID NO: 53) и CDR–L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA–G, HLA–A, HLA–B и/или HLA–F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR–H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR–H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR–H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR–L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR–L2: GQANRPS (SEQ ID NO: 54) и CDR–L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В еще одном варианте осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA–G, HLA–A, HLA–B и/или HLA–F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR–H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR–H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR–H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR–L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR–L2: GEANRPS (SEQ ID NO: 55) и CDR–L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA–G, HLA–A, HLA–B и/или HLA–F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: CDR–H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR–H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и CDR–H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18), и/или домен V_L, содержащий: CDR–L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR–L2: GDANRPS (SEQ ID NO: 56) и CDR–L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

В других вариантах осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA–G, HLA–A, HLA–B и/или HLA–F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: легкую цепь иммуноглобулина, тяжелую цепь иммуноглобулина, или и легкую, и тяжелую цепь иммуноглобулина, где легкая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 11, 13, 15 или 45; и/или тяжелая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, 2, 8, 9, 10, 12, 14, 44, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 или 86.

В других вариантах осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA–G, HLA–A, HLA–B и/или HLA–F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: легкую цепь иммуноглобулина, тяжелую цепь иммуноглобулина, или и легкую, и тяжелую цепь иммуноглобулина, где переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70, 71, 72, 73, 58, 74, 75, 76 или 77, и/или переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 63, 57, 64, 65, 66, 67, 68 или 69.

В других вариантах осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA–G, HLA–A, HLA–B и/или HLA–F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: любые из следующих наборов тяжелых цепей иммуноглобулинов и легких цепей иммуноглобулинов: (1) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3; (2) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4; (3) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5; (4) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6; (5) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7; (6) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3; (7) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11; (8) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11; (9) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11; (10) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13; (11) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15; (12) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 79; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3; (13) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4; (14) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5; (15) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6; (16) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7; (17) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3; (18) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 82; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11; (19) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11; (20) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 84; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11; (21) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13; или (22) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15.

В других вариантах осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: любые из следующих наборов переменных доменов тяжелой цепи и переменных доменов легкой цепи: (1) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 63, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70; (2) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71; (3) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 72; (4) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в

SEQ ID NO: 57, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73; (5) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58; (6) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70; (7) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 64, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74; (8) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 65, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74; (9) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 66, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74; (10) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 67, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75; или (11) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 68, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: домен V_H , содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, и домен V_L , содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58.

В другом предпочтительном варианте осуществления способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7.

В другом предпочтительном варианте осуществления, способ блокирования связывания ILT4 с HLA-G, HLA-A, HLA-B и/или HLA-F у нуждающегося в этом человека включает введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего: тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80, и

легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения или профилактики инфекционного заболевания у индивидуума посредством введения индивидууму эффективного количества антител против ИЛТ4 или их антигенсвязывающих фрагментов, представленных в настоящем описании (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1), которые могут быть эффективными для такого лечения или профилактики. В варианте осуществления изобретения инфекционное заболевание является вирусной инфекцией. В варианте осуществления изобретения инфекционное заболевание является бактериальной инфекцией. В варианте осуществления изобретения инфекционное заболевание является паразитарной инфекцией. В варианте осуществления изобретения инфекционное заболевание является грибковой инфекцией.

Настоящее изобретение относится к способам лечения любого из злокачественных новообразований или инфекционных заболеваний, представленных в настоящем описании, посредством введения терапевтически эффективного количества антитела против ИЛТ4 или его антигенсвязывающего фрагмента (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1), необязательно, вместе с любыми из дополнительных химиотерапевтических средств или способов терапии, представленных в настоящем описании, а также композициям, включающим такое антитело или фрагмент вместе с таким дополнительным химиотерапевтическим средством (например, совместно составленными антителом или фрагментом и дополнительным химиотерапевтическим средством).

"Индивидуум" является млекопитающим, таким как, например, человек, собака, кошка, лошадь, корова, мышь, крыса, обезьяна (например, яванский макак, например, *Macaca fascicularis* или *Macaca mulatta*) или кролик.

В варианте осуществления изобретения антитело против ИЛТ4 (например, полностью человеческое антитело, такое как антагонистические полностью человеческие антитела) или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1) находится в ассоциации с дополнительным химиотерапевтическим средством, таким как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В варианте осуществления изобретения дополнительное химиотерапевтическое средство является антиэметиком, эритропоезином, ГМ-КСФ, вакциной, антителом против PD-L1 или его антигенсвязывающим фрагментом, антителом против PD-L2 или его антигенсвязывающим фрагментом, антителом против PD1 или его антигенсвязывающим фрагментом (например, пембролизумабом или ниволумабом), 5-фторурацилом (5-FU), соединением платины, бевацизумабом, даунорубицином, доксорубицином, темозоломидом топотеканом, иринотеканом, паклитакселом, доцетакселом, иматинибом или ритуксимабом.

Термин "в ассоциации с" означает, что компоненты, антитело против ИЛТ4 (например, полностью человеческое антитело, такое как антагонистические полностью человеческие антитела) или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему

изобретению (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1) вместе с другим средством, таким как пембролизумаб или ниволумаб, можно составлять в единой композиции, например, для одновременного введения, или составлять отдельно в двух или более композициях (например, наборе). Каждый компонент можно вводить индивидууму в иное время, чем другой вводимый компонент; например, каждое введение можно осуществлять неодновременно (например, отдельно или последовательно) с интервалами в течение указанного периода времени. Кроме того, индивидууму можно вводить отдельные компоненты одним или разными путями (например, где антитело против ИЛТ4 (например, полностью человеческое антитело, такое как антагонистические полностью человеческие антитела) или его антигенсвязывающий фрагмент (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1) вводят парентерально, а паклитаксел вводят перорально).

Анализ и экспериментальное и диагностическое применение

Настоящее изобретение относится к любому способу получения комплекса между антителом против ИЛТ4 или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению и ИЛТ4 или его фрагментом, включающим приведение полипептида ИЛТ4 или фрагмента в контакт с антителом против ИЛТ4 или антигенсвязывающим фрагментом в условиях, подходящих для связывания и образования комплекса.

Антитела против ИЛТ4 (например, полностью человеческие антитела, такие как антагонистические полностью человеческие антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем описании (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1), можно использовать в качестве средств для аффинной очистки. В этом способе антитела против ИЛТ4 и их антигенсвязывающие фрагменты иммобилизуют на твердой фазе, такой как сефадекс, стекло или агарозная смола, или фильтровальной бумаге способами, хорошо известными в этой области. Иммобилизованное антитело или фрагмент приводят в контакт с образцом, содержащим белок ИЛТ4 (или его фрагмент), подлежащий очистке, а затем подложку промывают подходящим растворителем, с помощью которого из образца удаляют материал, за исключением белка ИЛТ4, связанного с иммобилизованным антителом или фрагментом. И наконец, подложку промывают растворителем, с помощью которого элюируют связанный ИЛТ4 (например, протеин А). Такие иммобилизованные антитела и фрагменты являются частью настоящего изобретения.

Настоящее изобретение относится к клеточным способам ELISA с использованием антител против ИЛТ4 и их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1). В варианте осуществления изобретения способ предназначен для определения того, содержат ли клетки ИЛТ4, и способ включает стадии: (i) приведения указанных клеток, иммобилизованных на твердой подложке (например, микропланшете) и тестируемых на наличие ИЛТ4, в контакт с антителом против ИЛТ4 или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению, (ii) необязательно, промывки смеси для удаления несвязанного антитела против ИЛТ4 или фрагмента, (iii) приведения антитела против ИЛТ4 или фрагмента в контакт с меченым вторичным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, связывающимся с антителом

против ILT4 или фрагментом, (iv) необязательно, промывки комплекса для удаления несвязанных антител или фрагментов и (v) детекции наличия метки на вторичном антителе или фрагменте; где детекция метки свидетельствует о том, что клетки, содержащие ILT4, иммобилизованы на твердой поверхности.

Настоящее изобретение относится к анализам ELISA (твёрдофазным иммуноферментным анализам), включающим использование антитела против ILT4 (например, полностью человеческих антител, таких как антагонистические полностью человеческие антитела) или его антигенсвязывающего фрагмента, представленных в настоящем описании (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1). Например, такой способ определения того, содержит ли образец ILT4 или его фрагмент, включает следующие стадии:

(a) покрытия субстрата (например, поверхности лунки планшета для микротитрования, например, пластикового планшета) антителом против ILT4 (например, полностью человеческими антителами, такими как антагонистические полностью человеческие антитела) или его антигенсвязывающим фрагментом (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1);

(b) нанесения образца, подлежащего тестированию на наличие ILT4, на субстрат;

(c) промывания субстрата для удаления несвязанного материала в образце;

(d) нанесения детектируемо меченых антител (например, связанных с ферментом антител), также специфических для антигена ILT4;

(e) промывания субстрата для удаления несвязанных меченых антител;

(f) детекции метки на антителах; если меченые антитела связаны с ферментом, нанесение химического вещества, преобразуемого ферментом в детектируемый, например, флуоресцентный, сигнал; и

детекция метки, например, ассоциированной с субстратом, свидетельствует о наличии белка ILT4.

В варианте осуществления изобретения меченое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент метят пероксидазой, реагирующей с ABTS (например, 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислотой)) или 3,3',5,5'-тетраметилбензидином, для достижения изменения цвета, подвергнутого детекции. Альтернативно, меченое антитело или фрагмент метят детектируемым радиоактивным изотопом (например, ^3H), который можно определять с помощью сцинтилляционный счетчика в присутствии сцинтиллятора.

Антитело против ILT4 (например, полностью человеческие антитела, такие как антагонистические полностью человеческие антитела) или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1) можно использовать в вестерн-блоттинге или иммуноблоттинге. Такой способ является частью настоящего изобретения и включает, например:

(1) получение мембраны или другого твердого субстрата, содержащего образец, подвергаемый тестированию на наличие ILT4 или его фрагмента, например,

необязательно, включающее стадию переноса белков из образца, подвергаемого тестированию на наличие ILT4 (например, после электрофоретического разделения белков в образце с помощью ПААГ или ПААГ в присутствии SDS), на мембрану или другой твердый субстрат (например, известными в этой области способами (например, полусухого блоттинга или танк-блоттинга)); и приведение мембраны или другого твердого субстрата, подвергаемого тестированию на наличие связанного ILT4 или его фрагмента, в контакт с антителом против ILT4 или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1);

(2) промывание мембраны один или более раз для удаления несвязанного антитела против ILT4 или фрагмента и других несвязанных веществ; и

(3) детекцию связанного антитела против ILT4 или фрагмента.

Такая мембрана может иметь форму, например, нитроцеллюлозной или виниловой (например, поливинилиденфторидной (PVDF)) мембраны, на которую переносят белки, подвергаемые тестированию на наличие ILT4, в неденатурирующем ПААГ (электрофорез в полиакриламидном геле) или ПААГ в присутствии SDS (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) (например, после электрофоретического разделения в геле). Перед приведением мембраны в контакт с антителом против ILT4 или фрагментом мембрану, необязательно, блокируют, например, обезжиренным сухим молоком или т.п. для связывания неспецифических участков связывания белка на мембране.

Детекция связанного антитела против ILT4 или фрагмента свидетельствует о том, что белок ILT4 присутствует на мембране или субстрате и в образце. Детекцию связанного антитела или фрагмента можно осуществлять посредством связывания антитела или фрагмента с детектируемо меченым вторичным антителом (антителом против иммуноглобулина), а затем детекции наличия метки вторичного антитела.

Антитела против ILT4 (например, полностью человеческие антитела, такие как антагонистические полностью человеческие антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем описании (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1), также можно использовать для иммуногистохимии. Такой способ является частью настоящего изобретения и включает, например,

(1) приведение клеток (например, клеток миелоидного ростка, таких как моноциты, макрофаги или дендритные клетки), подвергаемых тестированию на наличие белка ILT4, в контакт с антителом против ILT4 или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению (например, 1E1, 2A6, 3G7 и/или 2C1); и

(2) детекцию антитела или фрагмента на клетках или в них.

Если само антитело или фрагмент являются детектируемо мечеными, их можно определять напрямую. Альтернативно, антитело или фрагмент можно связывать с детектируемо меченым вторичным антителом, а затем определять метку.

Примеры

Эти примеры предназначены для иллюстрирования настоящего изобретения, а не

для его ограничения. Композиции и способы, приведенные в примерах, являются частью настоящего изобретения.

В рамках изобретения термин "p1E1 (G1)" относится к полностью человеческому mAb против ILT4 1E1, полученному из генов V зародышевой линии, IGHV4-34*0 и IGLV1-40*01, соответственно; содержащему IgG1 человека и константные домены лямбда человека.

>тяжелая цепь

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHS
GSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLPTRWVTTTRYFDLWGR
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 44)

>легкая цепь

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSN
RPSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVLGQP
KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 45)

В рамках изобретения термин "p1E1 (G4)" относится к полностью человеческому mAb против ILT4 1E1 (содержащему мутации Q1E в тяжелой цепи и Q1E в легкой цепи), полученному из генов V зародышевой линии, IGHV4-34*0 и IGLV1-40*01, соответственно; содержащему IgG4 человек (S228P) и константные домены лямбда человека.

>тяжелая цепь

EVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHS
GSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLPTRWVTTTRYFDLWGR
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP
EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 1)

>константный домен IgG4 человека (S228P)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(SEQ ID NO: 89)

>легкая цепь

ESVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSN
RPSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVLGQP
KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 3)

>константный домен ламбда человека

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET
TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 90)

В рамках изобретения термин "1E1 (G4)" относится к полностью человеческому mAb против ILT4 1E1 (содержащему мутации Q1E и N53D в легкой цепи и Q1E и S54A в тяжелой цепи), полученному из генов V зародышевой линии, IGHV4–34*0 и IGLV1–40*01, соответственно; содержащему IgG4 человека (S228P) и константные домены ламбда человека.

>тяжелая цепь

EVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHA
GSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLPTRWVTTTRYFDLWGR
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP
EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(SEQ ID NO: 2)

>легкая цепь

ESVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGDSN
RPSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVLGQP
KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 7)

Пример 1: Идентификация и характеристика антител против ILT4

Получение и идентификация антител

Родительское mAb человека против ILT4 1E1 идентифицировали с использованием платформы RETROCYTE DISPLAY (Breous–Nystroma et al., Methods 65(1): 57–67 (2014)).

В платформе RETROCYTE DISPLAY используют ретровирусный перенос генов антител человека в пре-В-клетки млекопитающих для получения стабильных библиотек дисплея антител с высоким разнообразием. В качестве исходного материала для тяжелых и легких цепей антител использовали пуповинную кровь человека, содержащую наивные В-клетки. Клеточные библиотеки антител, как правило, экспрессировали $>10^8$ различных полноразмерных моноклональных антител человека (изотипов hIgG1–4) на поверхности пре-В-клеток.

Предварительные панели антител компилировали из совпадений антител, идентифицированных в 3 отдельных группах скринингов RETROCYTE DISPLAY. Кандидатов обогащали с учетом детекции связывания рекомбинантного антигена ILT4 человека с клонами В-клеток посредством FACS. Сортировали предполагаемые клоны В-клеток и определяли последовательности их антител. Затем эти последовательности использовали для получения антител-кандидатов и подтверждали связывание ILT4 с использованием анализа связывания трансфектантов клеток CHO с ILT4 с использованием родительских клеток CHO в качестве отрицательного контроля. Кандидатов также подвергали скринингу на специфичность к ILT4 относительно близкородственных членов семейства ILT (FACS трансфектантов CHO с ILT2, LILRA1 и LILRA2 человека) и членов семейства ILT посредством проточно-цитометрического анализа (LILRA1, LILRA2, LILRA4, LILRA5, LILRA6, ILT2, ILT5 и ILT3).

Моноклональные антитела дополнительно тестировали на их способность связываться с трансфектантами CHO с ILT4 яванского макака (предсказанная последовательность из NCBI) посредством FACS. mAb-кандидатов также подвергали скринингу на их способность блокировать связывание рекомбинантного лиганда HLA-G-Fc с рекомбинантным белком ILT4 в анализах на основе Luminex или с ILT4-экспрессирующими клетками CHO в анализах на основе FACS. Функциональную активность антител-кандидатов анализировали тремя способами: 1) восстановление спонтанной супрессии ИЛ-2 в ILT4-трансфицированных Т-клетках мыши 3A9; 2) восстановление HLA-G-зависимой супрессии стимулируемой CD200RLa дегрануляции тучных клеток у трансфектантов WTMC ILT4 мыши; и 3) Модуляция цитокинов в реакциях смешанной культуры лимфоцитов с цельными PBMC.

Учитывая указанные выше критерии скрининга, выбирали восемь антител против ILT4 (1E1, 1G2, 2A6, 2D5, 3E6, 3G7, 2C1 и 5A6) на основе их функциональных и биофизических свойств. Антитела дополнительно анализировали и повторно оценивали в ряде биофункциональных, биофизических и физико-химических анализов. В функциональных анализах оценивали антитело-опосредованное дозозависимое восстановление супрессии ИЛ-2 клетками 3A9 и дегрануляцию тучных клеток, описанных выше. Осуществляли анализ Luminex, клеточный анализ блокирования лиганда и анализ конкуренции за лиганд и определяли свойства связывания и аффинности к целевому антигену ILT4, нецелевым антигенам и субпопуляциям PBMC с использованием анализов Biacore и проточной цитометрии, соответственно. В

биофизических анализах оценивали стабильность (температура, pH), деградацию и агрегацию антител. Изучали недостатки последовательностей и потенциальные мотивы посттрансляционных модификаций для исключения потенциальных рисков, связанных с получением антител. И наконец, кандидатов тестировали в исследовании регрессирования опухоли *in vivo* с использованием стимулированных клетками меланомы SKMEL5 гуманизированных мышей.

Биофизические свойства

Исследования осуществляли с помощью последовательности 1E1 человека (остов IgG4 человека с мутацией S228P), транзиторно экспрессирующей в клетках CHO. 1E1 имело следующие физико-химические характеристики: вычисленная и экспериментально определенная изоэлектрические точки (PI) составляли, соответственно, ~7,29 и ~7,2, уровень агрегации (молекулы HMW) составлял <5%, начальная T_m >60°C, T_{m1} ~65,2°C, T_{m2} ~78,8°C, и оно являлось стабильным в течение по меньшей мере 5 циклов замораживания/размораживания. Последовательность 1E1 исходно содержала N-участок гликозилирования в V_H -CDR2, который успешно корректировали с помощью мутации S54A без отрицательного влияния на связывание по результатам BIACORE и функционального анализа. При исследованиях в стрессовых условиях выявляли дезамидирование остатка N53 в V_L -CDR3 (> 13% в условиях высокого pH). N53 успешно корректировали (N53D) без отрицательного влияния на связывание и в функциональном анализе (восстановление высвобождения ИЛ-2 трансфектантами Т-клеток 3A9 с ИЛТ4 с использованием 1E1). Оба N-концевых остатка Q в V_H и V_L 1E1 подвергали мутагенезу в E (V_H -Q1E и V_L -Q1E) для снижения риска гетерогенности по причине дезамидирования. В исследованиях в стрессовых условиях, осуществленных на мутантной последовательности 1E1 (V_H Q1E1E1, S54A/Q1E V_L , N53D) IgG4 S228P/лямбда), выявляли ~17% окисления остатка W102 в V_H -CDR3 в условиях принудительного окисления с использованием AAPH (2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорида) через 6 часов с минимальным влиянием на связывание и функцию. AAPH используют для принудительного окисления остатков Trp и Met. В тех же условиях определяли ~8% окисления W7 в каркасе V_H без влияния на связывание и функцию. При пептидном картировании определяли приблизительно 8% афукозилированного антитела. Этот результат может быть связан с тем, что молекулу экспрессировали в транзиторно трансфицированных клетках CHO.

Эпитопное картирование

Эпитоп на ИЛТ4 для клона антитела p1E1(G1) идентифицировали посредством масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена. Антитело p1E1(G1) предварительно смешивали с рекомбинантным, меченым гистидином внеклеточным доменом ИЛТ4, затем комплекс инкубировали в дейтериевом буфере. Степень встраивания дейтерия измеряли посредством масс-спектрометрии. Остатки ИЛТ4 LYREKKSASW (39–48 из ИЛТ4 без сигнальной последовательности) (SEQ ID NO: 59) и TRIRPEL (50–56 из ИЛТ4 без сигнальной последовательности) (SEQ ID NO: 60) и, в меньшей степени, NGQF

(59–62 из ILT4 без сигнальной последовательности) (SEQ ID NO: 61) и HTGRYGCQ (71–78 из ILT4 без сигнальной последовательности) (SEQ ID NO: 62) идентифицировали как демонстрирующие наибольшие различия в мечении дейтерием по сравнению с образцом только с антигеном, что свидетельствует о том, что, вероятно, они являются остатками, взаимодействующими с p1E1(G1) (фигура 1). Эти пептиды находятся на домене 1 ILT4. Другие пептиды на домен 1 и 2, демонстрирующие меньшие различия в мечении дейтерием, вероятно, защищены благодаря конформационной стабильности после связывания антитела. Не наблюдали значимых различий в мечении в доменах 3 и 4.

При картировании по кристаллической структуре ILT4 человека остатки, защищенные p1E1(G4), образуют нелинейный конформационный эпитоп, содержащий три бета-тяжа и петлю (фигура 2A).

ILT4 использует две поверхности связывания для вовлечения своего лиганда HLA-G (Shiroishi et al, 2006): участок 1 для связывания бета-2-микроглобулина, находящийся в домене 2 ILT4, и участок 2 для связывания тяжелой цепи HLA-G, находящийся в домене 1 ILT4 (фигура 2B). Участок 1 включает остатки ILT4 Trp-67, Asp-177, Asn-179 и Val-183 (нумерация по Shiroishi et al, 2006). Участок 2 включает ILT4 остатки Arg-36, Tyr-38, Lys-42, Ile-47 и Thr-48 (нумерация по Shiroishi et al, 2006). Данные HDX-MS в этом описании свидетельствуют о том, что Tyr-38, Lys-42 и Thr-48 (нумерация по Shiroishi et al, 2006) являются частью эпитопа p1E1(G1) на домене 1 ILT4 как остатки Tyr-40, Lys-44 и Thr-50 ILT4 человека (фигура 2A). Это свидетельствует о том, что эпитоп ILT4 человека, связанный p1E1(G1), перекрывается с эпитопом участка 2, связанным лигандом HLA-G.

Пример 2: Аффинность, свойства связывания и блокирования mAb против ILT4 1E1

Аффинности связывания 1E1(G4) и HLA-G1 с ILT4 человека, определяемые посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

Связывание 1E1(G4) и HLA-G1-Fc (рекомбинантного внеклеточного домена HLA-G (изоформы 1), слитого с Fc-доменом IgG1 человека для получения растворимого белка HLA-G1) с ILT4-His (рекомбинантным внеклеточным доменом ILT4 человека, слитым с полигистидиновой меткой для получения растворимого белка ILT4) анализировали посредством Biacore. 1E1(G4) или HLA-G1 Fc фиксировали на чипе Biacore с помощью фиксации через Fc. Затем мономерный ILT4-His тестировали на связывание, и данные свидетельствовали о том, что ILT4-His связывался с 1E1(G4) с в 600 раз более высокой аффинностью, чем HLA-G1-Fc (таблица 3).

Таблица 3. ILT4-His связывается с 1E1(G4) с более чем в 600 раз большей аффинностью, чем HLA-G1-Fc. Кинетика связывания 1:1 и анализы равновесия свидетельствуют о 630- и 670-кратных различиях.

п	Лиганд	k_a ($1/M^{-1}s^{-1}$)	k_d (1/с)	K_D (M)	Соотношение K_D
2	1E1 (G4)	5,5E+05	9,0E-03	1,7E-08	1

2	HLA-G1 Fc (Kinetics)	1,1E+05	1,1E+00	1,1E-05	630
	HLA-G1 Fc (SSA)	–	–	1,1E-05	670

Анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с помощью устройства Biacore T200 (GE HEALTHCARE) использовали для определения моновалентных аффинностей mAb IgG4 против ILT4 человека (1E1(G4)) и слитого белка HLA-G1-Fc (HLA-G1-Fc) к меченому полигистидином ILT4 человека (ILT4-His). mAb или Fc-слитый белок фиксировали на сенсорном чипе CM5, подготовленном с использованием набора для фиксации Fc человека (GE HEALTHCARE), и на эту поверхность инъецировали серии титруемых концентраций ILT4-His. Для аппроксимации каждой серии титрования к модели связывания 1:1 использовали программное обеспечение Biacore T200. Определяли константы скорости ассоциации (k_a , $M^{-1} s^{-1}$) и диссоциации (k_d , s^{-1}) для каждого набора титруемых концентраций и использовали их для вычисления константы диссоциации, $K_D (M) = k_{off}/k_{on}$ для каждого титрования. Как показано в таблице 1, моновалентные аффинности (K_D) mAb 1E1(G4) и HLA-G1-Fc к ILT4 человека, меченому His, составляли 17 нМ и 11 мкМ, соответственно, при этом соотношение K_D свидетельствует о 630-кратном различии. Из-за высоких кинетических констант k_a и k_d , для подтверждения низкой аффинности HLA-G1-Fc к ILT4-His также использовали стационарную аппроксимацию (SSA).

Блокирование связывания HLA-G с трансфектантами Т-клеток 3A9 с ILT4 с использованием 1E1(G4)

Трансфектанты Т-клеток 3A9 с ILT4 предварительно обрабатывали 1E1(G4) или изотипическим контролем в различных дозах с последующей вторичной детекцией 1E1(G4) (фигура 3A) или посредством обработки фиксированной концентрацией биотинилированного химерного HLA-G1-Fc для оценки способности 1E1(G4) блокировать когнатный лиганд (фигура 3B). 1E1(G4) и HLA-G Fc определяли посредством проточной цитометрии. Данные свидетельствовали о том, что 1E1(G4) блокировало связывание HLA-G1 Fc дозозависимым образом.

Анализ Lumindex и клеточные анализы блокирования лиганда и конкуренции за лиганд

Антитела 1E1, 2A6, 2C1 и 3G7 тестировали в анализе Lumindex и клеточном анализе блокирования лиганда и конкуренции за лиганд на способность ингибировать взаимодействие рекомбинантного димерного HLA-G с антигеном ILT4, соединенным с частицами или экспрессируемым клетками CHO/ILT4+.

В анализах блокирования лиганда и конкуренции за лиганд на основе Lumindex использовали рекомбинантный антиген ILT4 человека, химически соединенный с частицами Lumindex. В анализе блокирования частицы предварительно инкубировали с диапазоном доз (0,5–9000 нг/мл в серийных разведениях 1:3) вариантов hIgG4 антитела

против ILT4 1E1, 2A6, 2C1 или 3G7. Затем связанный с частицами антиген ILT4 тестировали на связывание с растворимым биотинилированным слитым белком HLA-G/Fc в концентрации 50 нМ. В анализе конкуренции за лиганд Luminex соединенные с антигеном частицы Luminex предварительно инкубировали с растворимым биотинилированным слитым белком HLA-G/Fc в концентрации 50 нМ перед титрованием (0,5–9000 нг/мл в серийных разведениях 1:3) вариантов hIgG4 антитела против ILT4 1E1, 2A6, 2C1 или 3G7. В обоих вариантах анализа взаимодействие ILT4:HLA-G определяли с использованием PE-конъюгированного антитела против стрептавидина и определяли значения IC_{50} . Все тестируемые антитела демонстрировали дозозависимое блокирование связывания HLA-G с соединенным с частицами Luminex ILT4/Fc, и значения IC_{50} приведены в таблице 4. Все тестируемые антитела также демонстрировали дозозависимую конкуренцию с HLA-G за связывание с соединенным с частицами ILT4/Fc (данные не представлены).

Таблица 4. Анализ блокирования лиганда Luminex

Антитело	IC_{50} (нг/мл)
1E1	19,2
2A6	17,7
2C1	10,2
3G7	40,0

В клеточных анализах блокирования лиганда и конкуренции за лиганд следовали принципу, схожему с описываемым для анализов Luminex, и в них для поверхностной экспрессии антигена использовали линию клеток CHO/ILT4. В анализе блокирования клетки предварительно инкубировали с тестируемым антителом с использованием диапазона доз 1–20000 нг/мл в серийных разведениях 1:3. Затем антигены ILT4 тестировали на связывание с растворимым биотинилированным слитым белком HLA-G/Fc в концентрации 5 мкг/мл. В конкурентном анализе использовали обратный вариант. Клетки предварительно инкубировали с растворимым биотинилированным слитым белком HLA-G/Fc в концентрации 5 мкг/мл перед добавлением титруемых доз тестируемого антитела в диапазоне 1–20000 нг/мл в серийных разведениях 1:3. Взаимодействие ILT4:HLA-G определяли с использованием PE-конъюгированного антитела против стрептавидина. Все тестируемые антитела демонстрировали дозозависимое блокирование связывания HLA-G с экспрессируемым CHO ILT4, и значения IC_{50} приведены в таблице 5. Все тестируемые антитела также демонстрировали дозозависимую конкуренцию с HLA-G за связывание с экспрессируемым CHO ILT4 (данные не представлены).

Таблица 5. Клеточный анализ блокирования лиганда

Антитело	IC_{50} (нг/мл)
1E1	98,4

2A6	232,6
2C1	56,1
3G7	374,3

Блокада связывания лиганда не-HLA-G МНС класса I с трансфектантами Т-клеток 3A9 с ИЛТ4 с использованием p1E1(G1)

Трансфектанты Т-клеток 3A9 с ИЛТ4 предварительно обрабатывали p1E1(G1) или hIgG1 изотипического контроля в различных дозах с последующей обработкой фиксированной концентрацией меченых флуорохромом тетрамеров HLA-F или CD1d или дексамеров HLA-A02:01 или HLA*B7:02 для оценки способности p1E1(G1) блокировать лиганды не-HLA-G МНС класса I. Связывание HLA-A, HLA-B и HLA-F с ИЛТ4 ингибировали посредством p1E1(G1) дозозависимым образом (фигура 4), что свидетельствует о способности p1E1(G1) блокировать другие известные лиганды МНС класса I.

Блокада связывания ANGPTL с трансфектантами Т-клеток 3A9 с ИЛТ4 с использованием p1E1(G1)

Недавно обнаружено, что ангиопоэтин-подобные (ANGPTL) белки связываются с ИЛТ4, экспрессируемым гемопоэтическими стволовыми клетками человека (Zheng et al., Nature. 2012 May 30;485(7400):656–60 и Deng et al. Blood. 2014 Aug 7;124(6):924–35). Для тестирования того, может ли p1E1(G1) блокировать связывание членов семейства ANGPTL с ИЛТ4, приобретали коммерчески доступные белки ANGPTL или их фрагменты и тестировали их на связывание с трансфектантами Т-клеток 3A9 с ИЛТ4, предварительно обработанными p1E1(G1). Данные о связывании свидетельствуют о том, что ANGPTL1, 4 и, потенциально, 7 могут связываться с ИЛТ4, но не с клетками с контрольным вектором, при тестируемых концентрациях белка. p1E1(G1) могло полностью блокировать связывание белка ANGPTL в насыщающей дозе (фигура 5).

Специфичность 1E1(G4) в отношении семейства ИЛТ при связывании с трансфектантами Т-клеток 3A9 с ИЛТ человека

Специфичность 1E1(G4) в отношении семейства ИЛТ при связывании с членами семейства ИЛТ человека анализировали посредством проточной цитометрии клеток с использованием линии Т-клеток 3A9, трансфицированных для экспрессии ИЛТ4, ИЛТ2, ИЛТ3 (два варианта), ИЛТ5, LILRB5, LILRA1, LILRA2, ИЛТ7, ИЛТ8 или ИЛТ11 человека. 1E1(G4) специфически связывалось с ИЛТ4 человека и не демонстрировало перекрестную реактивности в отношении какого-либо другого тестируемого члена семейства ИЛТ (фигуры 6А и 6В).

Пример 3: Биологическая активность mAb против ИЛТ4 1E1 в сконструированных и первичных клетках

Способность 1E1(G4), 2A6, 2C1 и 3G7 реверсировать супрессию интерлейкина-2 в анализах сконструированных клеток 3A9 с ИЛТ4

Для стимуляции контрольных Т-клеток мыши 3A9 использовали антитело против

CD3, что приводило к повышению высвобождения ИЛ-2. В отличие от этого, трансфектанты Т-клеток 3A9 с ILT4 не могли экспрессировать ИЛ-2 при стимуляции CD3, вероятно, по причине перекрестной реактивности ILT4 с молекулами МНС класса I мыши или из-за неизвестных ксено-лигандов. По-видимому, это взаимодействие приводит к спонтанной мультимеризации/активации рецептора ILT4, что приводит к супрессии опосредованного антителом против CD3 высвобождения ИЛ-2. Таким образом, антитела, функционально связывающиеся с ILT4, блокирующее взаимодействие ILT4 с ксено-лигандами и/или ингибирующее мультимеризацию рецептора, должно восстанавливать высвобождение ИЛ-2.

1E1(G4), 2A6, 2C1 и 3G7 тестировали на опосредование высвобождения ИЛ-2 трансфектантами Т-клеток мыши 3A9 с ILT4. 1E1(G4), 2A6, 2C1 или 3G7 добавляли к ILT4+ трансфектантам Т-клеток мыши 3A9 и измеряли высвобождение ИЛ-2 фотометрически посредством ELISA после 24 часов опосредованной антителом против CD3 стимуляции клеток. Типичная кривая доза-эффект для 1E1(G4) представлена на фигуре 7. Значения EC_{50} тестируемых антител определяли с помощью кривых доза-эффект, и они представлены в таблице 6.

Таблица 6. Анализ репрессии ИЛ-2

Антитело	EC_{50} (мкг/мл)
1E1	0,43
2A6	1,2
2C1	0,24
3G7	0,26

Анализ дегрануляции клеток WTMC мыши (тучных клеток дикого типа) (только качественный)

p1E1(G4) и 1E1(G4) тестировали на восстановление ILT4:HLA-G-зависимой дегрануляции тучных клеток. Тучные клетки WTMC мыши трансфицировали с использованием ILT4 человека и стимулировали связанным с планшетом антителом против CD200RLa. Антитело-опосредованная перекрестная сшивка CD200RLa приводила к дегрануляции тучных клеток посредством активации мотивов ITAM, обнаруживаемых во внутриклеточном домене CD220RLa. Дегрануляцию можно измерять колориметрически посредством анализа высвобождения содержимого гранул в анализируемых супернатантах. В присутствии связанного с планшетом тетрамера HLA-G ингибировали CD200RLa-опосредованную дегрануляцию тучных клеток в трансфектантах ILT4. Предварительная обработка трансфектантов WTMC с ILT4 с использованием p1E1(G4) или 1E1(G4) перед стимуляцией связанным с планшетом антителом против CD200RLa и тетрамером HLA-G реверсировала ингибирование дегрануляции дозозависимым образом (фигура 8).

Эффект 1E1(G4) в отношении секреции цитокинов миелоидного происхождения первичными мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) человека

Оценка 1E1(G4) в анализе стимуляции LPS первичных PBMC человека

Как сообщают, ФНО α , классический провоспалительный цитокин миелоидного происхождения, экспрессируется моноцитами, экспрессирующими низкие уровни ИЛТ4 при стимуляции LPS. Моноциты с высокой экспрессией ИЛТ4 не экспрессировали столько же ФНО α , и обнаруживали, что отсутствие экспрессии ИЛТ4 является характерным признаком моноцитов, выделенных из пациентов с псориатическим артритом (Bergamini et al., PLoS One. 2014 Mar 27;9(3):e92018). Экспрессия ИЛТ4 на моноцитах может ингибировать эффекторную активность миелоидных клеток и антагонистически действовать на индукцию провоспалительных цитокинов (например, ФНО α) в присутствии провоспалительных стимулов (например, LPS). В связи с этим, цельные PBMC, выделенные из здоровых людей–доноров, обрабатывали LPS и с помощью 1E1(G4) оценивали способность антагонизма ИЛТ4 приводить к повышению экспрессии провоспалительных миелоидных цитокинов. На фигурах 9A и 9B представлены данные одного из трех экспериментов с использованием 3 доноров в каждом, свидетельствующие о том, что 1E1(G4) повышало LPS–зависимую экспрессию ГМ–КСФ и ФНО α (цитокинов миелоидного происхождения) дозозависимым образом.

Оценка 1E1(G4) в анализе стимуляции антителом против CD3 первичных PBMC человека

Для оценки того, может ли обработка 1E1(G4) повышать экспрессию Т–клеточных или миелоидных эффекторных цитокинов в присутствии субоптимального Т–клеточного стимула, цельные PBMC, выделенные из здоровых людей–доноров обрабатывали антителом против CD3 для индукции пролиферации Т–клеток, и с помощью 1E1(G4) оценивали способность антагонизма ИЛТ4 модифицировать экспрессию цитокинов. На фигурах 10A и 10B показаны данные одного из трех экспериментов с 3 донорами каждый, свидетельствующие о том, что 1E1(G4) повышало зависящую от антитела против CD3 экспрессию ГМ–КСФ и ФНО α дозозависимым образом.

Пример 4: Противоопухолевая эффективность антител против ИЛТ4 в модели опухоли SK–MEL–5 на гуманизированных мышах

Противоопухолевая эффективность 1E1, 2A6, 2C1 и 2D5 в модели опухоли на гуманизированных мышах

Антитела 1E1, 2A6, 2C1 и 2D5 тестировали в анализе in vivo регрессирования опухоли. Гуманизированным мышам (мышам NSG, реконструированным с использованием гемопоэтических стволовых клеток человека для имитации строения иммунных клеток человека) инокулировали 1×10^6 клеток меланомы SKMEL5 (HLA класса A*02:01) и осуществляли мониторинг роста опухоли до достижения среднего размера 150 мм³ через приблизительно 35 дней. Семи рандомизированным группам мышей, каждая из которых включает шесть животных, подкожно вводили антитело изотипического контроля (hIgG1+hIgG4, по 20 мг/кг каждого) или 20 мг/кг любого из следующих антител против ИЛТ4: 1E1–IgG1, 1E1–IgG1 (N297Q) (Fc–наивный мутант), 1E1–IgG4, 2A6–IgG4, 2C1–IgG4 и 2D5–IgG4. Мышам вводили дозы каждые семь дней (в

день 35, 42 и 49; всего три дозы) и измеряли размер опухоли до дня 63. Результаты свидетельствуют о сниженном росте опухоли у мышей, которым вводили 1E1 (IgG1, IgG1-(N297Q), IgG4), 2A6-IgG4 и 2D5-IgG4, по сравнению с животными, которым вводили изотипический контроль (фигура 17). В отличие от этого, у мышей, которым вводили изотипический контроль или антитело-кандидат против ILT4 2C1, не наблюдали снижения роста опухоли.

Противоопухолевая эффективность p1E1(G4) в модели опухоли на гуманизированных мышах

Разрабатывали модель опухоли на гуманизированных мышах для тестирования эффективности *in vivo* p1E1(G4) в отношении ингибирования роста опухоли. Мышей NSG с иммунодефицитом реконструировали с использованием гемопоэтических стволовых клеток человека. После подтверждения того, что мыши имеют периферические CD45+ иммунные клетки человека ($\geq 25\%$ PBMC), их инокулировали опухолевыми клетками SK-MEL-5, опухолевой линией, полученной из меланомы кожи человека. Эти клетки выбирали по экспрессии HLA-G. После инокуляции опухолью позволяли расти до размера приблизительно 150 мм^3 . Мышей случайным образом распределяли по группам и вводили hIgG4 изотипического контроля или p1E1(G4).

У мышей, которым вводили p1E1(G4), наблюдали ингибирование роста опухоли в течение исследования (фигура 11A). Наблюдали одно полное и одно частичное регрессирование при использовании p1E1(G4) (фигура 11C).

Противоопухолевая эффективность 1E1(G4) в модели опухоли на гуманизированных мышах

Противоопухолевую активность 1E1(G4) тестировали в модели опухоли SK-MEL-5 на гуманизированных мышах. В этой модели мышей NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) с иммунодефицитом облучали и инъецировали им гемопоэтические CD34+ стволовые клетки человека, выделенные из пуповинной крови. После нескольких месяцев приживания в крови мышей можно определить иммунные клетки человека. Затем мышам подкожно (SC) имплантировали линию клеток SK-MEL-5, полученную из меланомы человека.

В этом исследовании мышам NSG, которым в возрасте 3–4 недель трансплантировали полученные из пуповинной крови человека CD34+ клетки 3 отдельных доноров, в возрасте приблизительно 20 недель инъецировали SC 1×10^6 клеток SK-MEL-5. Гуманизированных мышей NSG, несущих опухоли SK-MEL-5, приписывали к 2 группам лечения по 6 мышей на группу (3 мыши из каждой когорты с донорскими CD34+ клетками человека на группу лечения), когда средний размер опухоли достигал приблизительно 100 мм^3 через 21 день после инокуляции опухоли (D0 рандомизации). Несущим опухоли мышам инъецировали SC 20 мг/кг 1E1(G4) или mAb hIgG4 изотипического контроля каждые 7 дней в количестве 4 доз. Объемы опухолей подвергали мониторингу каждые 7 дней после начала лечения.

Противоопухолевая эффективность в группе лечения 1E1(G4) была значимо выше,

чем в группе изотипического контроля ($p \leq 0,001$ со дня 28 по день 49) (фигура 12A). Конечная масса опухоли у мышей, которым вводили 1E1(G4), была ниже, чем у мышей, которым вводили изотипический контроль (фигура 12C). В целом, результаты свидетельствуют о значимой противоопухолевой эффективности 1E1(G4) в дозе 20 мг/кг в модели опухоли SK-MEL-5 на гуманизированных мышах. При введении 1E1(G4) не наблюдали эффекта в отношении массы тела (фигура 12B) и массы селезенки (фигура 12D).

Пример 5: Связывание 1E1(G4) с трансфектантами Т-клеток 3A9 человека с ILT, специфическое в отношении гаплотипов ILT4

Данные об однонуклеотидных полиморфизмах из общедоступных источников (проект "1000 геномов", фаза 3) использовали для определения частот аллелей ILT4 в африканских, европейских, азиатских и южно-азиатских популяциях. Определяли последовательности гаплотипов, экспрессирующихся с частотой 5% или более в любой популяции (гаплотипы 1, 2, 5, 7, 9 и 10 в таблице 7), и экспрессировали их в Т-клетках 3A9. 1E1(G4) связывало все тестируемые гаплотипы при использовании насыщающих доз антитела (фигура 13). Гаплотип 2 соответствовал консенсусной последовательности, приведенной в Uniprot. Гаплотип 5 использовали в функциональных анализах и анализах с использованием лиганда. Данные о связывании гаплотипов свидетельствуют о том, что 1E1(G4) связывается со всеми основными тестируемыми аллельными вариантами.

Таблица 7. Частоты гаплотипов ILT4 в популяциях человека.

Гаплотип		rs3730	rs3860	rs7247	rs7247	rs1128	Частоты гаплотипов по этнической принадлежности				
		32	56	538	451	645					
		p.Glu161Asp	p.Val235Met	p.His300Tyr	p.Cys306Trp	p.Arg322His					
		c.483A>T	c.703G>A	c.898C>T	c.918C>G	c.965C>G	Все	Африканцы	Европеиды	Азиаты	Южная Азия
1	ATGGC	D	M	H	C	R	0,23	0,09	0,15	0,60	0,15
2	TCGGC	E	V	H	C	R	0,14	0,04	0,22	0,08	0,28
3	ATAGC	D	M	Y	C	R		0,03			

4	TC GC C	E	M	H	W	R			0,02		
5	AC AC T	D	V	Y	W	H	0,3 0	0,17	0,58	0,0 8	0,37
6	AC AC C	D	V	Y	W	R	0,0 2	0,04			0,02
7	AC GC T	D	V	H	W	H	0,0 2	0,06			
8	AC GG T	D	V	H	C	H		0,02			
9	AC GC C	D	V	H	W	R	0,0 2			0,0 1	0,11
10	AC GG C	D	V	H	C	R	0,2 3	0,54		0,2 0	0,06
f(S N P)		0,80	0,24	0,45	0,46	0,46					

*Гаплотипы для каждой популяции приведены с учетом данных фазы 3 проекта "1000 геномов" и определены с использованием PLINK для анализа несинонимичных SNP, указанных в базе данных EXAC.

Пример 6: Экспрессия РНК ILT4 в типах опухолей и клеток с учетом данных из баз TCGA и Blueprint

Экспрессию ILT4 в типах опухолей и популяциях клеток определяли с использованием общедоступных наборов данных секвенирования РНК посредством Omicsoft (Qiagen, Cary, NC). Набор данных TCGA (TCGA_B38_20171002_v4, <https://gdc-portal.nci.nih.gov/>) состоит из 11292 образцов с данными секвенирования РНК. Набор данных Blueprint (Blueprint_B38_20170216_v2, <http://www.blueprint-epigenome.eu/>) состоит из 258 образцов нормальной крови для 55 типов клеток с данными секвенирования РНК.

Типы опухолей с наиболее высокой экспрессией ILT4 на уровне РНК включают LAML (т.е. AML), DLBC (т.е. DLBCL), TGCT, MESO, KIRC (фигура 14A). Типы клеток с наиболее высокой экспрессией ILT4 на уровне РНК включают нейтрофилы, моноциты, остеокласты, эозинофилы, макрофаги и дендритные клетки (фигура 14B). В этом наборе данных лимфоциты имели низкую экспрессию ILT4 или не имели ее вообще. FPKM 1 (или $\text{LOG}_2(\text{FPKM}+0,1)$ от 0) является наиболее широко распространенным эвристическим фиксированным пороговым значением, хотя более низкие значения FPKM могут свидетельствовать о наличии генов с "низкой экспрессией" в образце.

Пример 7: Связывание 1E1(G4) с миелоидными клетками из образцов гистокультур опухолей

Гистокультуры получали из свежих образцов опухолей человека (хирургическая резекция) и обрабатывали IgG4 против RSV (изотипическим контролем) или 1E1(G4) в дозе 20 мкг/мл в течение 18–24 часов при 37°C. После обработки срезы опухолей расщепляли на суспензии отдельных клеток и окрашивали для FACS. На точечных диаграммах и контурных диаграммах представлены данные FACS для суспензий отдельных клеток из гистокультур опухолей RCC (фигура 15A) или CRC (фигура 15B). Все миелоидные клетки можно разделять на четыре субпопуляции с учетом экспрессии CD66b и/или CD14. Эти четыре субпопуляции миелоидных клеток одновременно анализировали на экспрессию ILT4 с использованием неконкурентного коммерческого PE–конъюгированного антитела против ILT4 (BioLegend, кат. № 338706, San Diego, CA) и связанного с поверхностью клетки 1E1(G4) с использованием вторичного антитела против IgG4. Наблюдали хорошую корреляцию между ILT4+ клетками и 1E1(G4)+ клетками в гистокультурах, обработанных 1E1(G4). Наблюдали, что в этих образцах инфильтрирующие опухоль лимфоциты являлись ILT4– и 1E1(G4)– клетками.

Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, представленными в настоящем описании. Фактически, объем настоящего изобретения относится к вариантам осуществления, конкретно приведенным в настоящем описании, и другим вариантам осуществления, не приведенным конкретно в настоящем описании; варианты осуществления, конкретно приведенные в настоящем описании, не претендуют на исчерпывающий характер. Различные модификации изобретения в дополнение к модификациям, представленным в настоящем описании, будут очевидны специалистам в этой области из приведенного выше описания. Такие модификации предназначены для включения в объем формулы изобретения.

На всем протяжении настоящей заявки процитированы патенты, патентные заявки, публикации, описания продуктов и способов, описания которых включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме для всех целей.

Список последовательностей

Настоящая заявка подана с копией списка последовательностей в машиночитаемой форме (CRF). CRF названа 24443_PCT_SEQLIST.txt, создана 22 марта 2018 года, ее размер составляет 128042 байт, она включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном

объеме.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающиеся с одним или более аминокислотными остатками в эпитопе иммуноглобулин-подобного транскрипта человека 4 (ILT4), выбранном из группы, состоящей из LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59), TRIRPEL (SEQ ID NO: 60), NGQF (SEQ ID NO: 61) и HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62), и защищающие эпитоп от дейтерообмена в присутствии источника дейтерия.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где эпитоп ILT4 является LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59).

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где эпитоп ILT4 является TRIRPEL (SEQ ID NO: 60).

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где эпитоп ILT4 является NGQF (SEQ ID NO: 61).

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где эпитоп ILT4 является HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62).

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конкурирующие с референсным антителом за связывание с эпитопом ILT4 человека, выбранным из группы, состоящей из LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59), TRIRPEL (SEQ ID NO: 60), NGQF (SEQ ID NO: 61) и HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62), где референсное антитело содержит тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, где эпитоп ILT4 является LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59).

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, где эпитоп ILT4 является TRIRPEL (SEQ ID NO: 60).

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, где эпитоп ILT4 является NGQF (SEQ ID NO: 61).

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, где эпитоп ILT4 является HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62).

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающиеся с ILT4 человека, содержащие:

(1) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:

CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16),

CDR-H2: EINHxGSTNYPNPSLKS, где X является S или A (SEQ ID NO: 17), и

CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); и,

вариабельный домен легкой цепи, содержащий:

CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19),

CDR-L2: GX₁X₂NRPS, где X₁ является N, Q, E или D, и X₂ является S или A (SEQ ID NO: 20), и

CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21);

(2) переменный домен тяжелой цепи, содержащий:

CDR-H1: SYAIS (SEQ ID NO: 22),

CDR-H2: GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 23) и

CDR-H3: YFX₁X₂SGWYKGGAFDI, где X₁ является D или S, и X₂ является S или A (SEQ ID NO: 24); и,

переменный домен легкой цепи, содержащий:

CDR-L1: TLRSGINVDTYRIH (SEQ ID NO: 25),

CDR-L2: YKSDSDKHQGS (SEQ ID NO: 26) и

CDR-L3: AIWYSSTWV (SEQ ID NO: 27);

(3) переменный домен тяжелой цепи, содержащий:

CDR-H1: SYAMH (SEQ ID NO: 28),

CDR-H2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 29) и

CDR-H3: VGEWIQLWSPFDY (SEQ ID NO: 30); и

переменный домен легкой цепи, содержащий:

CDR-L1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO: 31),

CDR-L2: AASSLQS (SEQ ID NO: 32) и

CDR-L3: QQYNSYPPT (SEQ ID NO: 33); или

(4) переменный домен тяжелой цепи, содержащий:

CDR-H1: ELSMH (SEQ ID NO: 34),

CDR-H2: GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 35) и

CDR-H3: AGPLYTIFGVVIPPNDWFDP (SEQ ID NO: 36); и

переменный домен легкой цепи, содержащий:

CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 37),

CDR-L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 38) и

CDR-L3: QSYDSSLSGSGVV (SEQ ID NO: 39).

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.11, содержащие:

переменный домен тяжелой цепи, содержащий:

CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16),

CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) и

CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); и

переменный домен легкой цепи, содержащий:

CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19),

CDR-L2: GDSNRPS (SEQ ID NO: 52) и

CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.11, содержащие:

легкую цепь иммуноглобулина, имеющую по меньшей мере 90% идентичности аминокислотных последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 11, 13, 15 или 45, и/или

тяжелую цепь иммуноглобулина, имеющую по меньшей мере 90% идентичности аминокислотных последовательностей по отношению к аминокислотной

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, 2, 8, 9, 10, 12, 14, 44, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 или 86.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.11, содержащие:

легкую цепь иммуноглобулина, содержащую вариабельный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичности аминокислотных последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 70, 71, 72, 73, 58, 74, 75, 76 или 77, и/или

тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 90% идентичности аминокислотных последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 63, 57, 64, 65, 66, 67, 68 или 69.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.11, содержащие:

легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 11, 13, 15 или 45; и/или

тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, 2, 8, 9, 10, 12, 14, 44, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 или 86.

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.11, содержащие:

вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70, 71, 72, 73, 58, 74, 75, 76 или 77, и/или

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 63, 57, 64, 65, 66, 67, 68 или 69.

17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.11, содержащие:

(1)

тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 или 79; и

легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3;

(2)

тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 или 80; и

легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4;

(3)

тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 или 80; и

легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5;

(4)

тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 или 80; и

легкую	цепь	иммуноглобулина,	содержащую	аминокислотную
--------	------	------------------	------------	----------------

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6;

(5)

тяжелую	цепь	иммуноглобулина,	содержащую	аминокислотную
---------	------	------------------	------------	----------------

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 или 80; и

легкую	цепь	иммуноглобулина,	содержащую	аминокислотную
--------	------	------------------	------------	----------------

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7;

(6)

тяжелую	цепь	иммуноглобулина,	содержащую	аминокислотную
---------	------	------------------	------------	----------------

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 или 80; и

легкую	цепь	иммуноглобулина,	содержащую	аминокислотную
--------	------	------------------	------------	----------------

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3;

(7)

тяжелую	цепь	иммуноглобулина,	содержащую	аминокислотную
---------	------	------------------	------------	----------------

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8 или 82; и

легкую	цепь	иммуноглобулина,	содержащую	аминокислотную
--------	------	------------------	------------	----------------

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11;

(8)

тяжелую	цепь	иммуноглобулина,	содержащую	аминокислотную
---------	------	------------------	------------	----------------

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9 или 83; и

легкую	цепь	иммуноглобулина,	содержащую	аминокислотную
--------	------	------------------	------------	----------------

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11;

(9)

тяжелую	цепь	иммуноглобулина,	содержащую	аминокислотную
---------	------	------------------	------------	----------------

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10 или 84; и

легкую	цепь	иммуноглобулина,	содержащую	аминокислотную
--------	------	------------------	------------	----------------

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11;

(10)

тяжелую	цепь	иммуноглобулина,	содержащую	аминокислотную
---------	------	------------------	------------	----------------

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12 или 85; и

легкую	цепь	иммуноглобулина,	содержащую	аминокислотную
--------	------	------------------	------------	----------------

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13; или

(11)

тяжелую	цепь	иммуноглобулина,	содержащую	аминокислотную
---------	------	------------------	------------	----------------

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14 или 86; и

легкую	цепь	иммуноглобулина,	содержащую	аминокислотную
--------	------	------------------	------------	----------------

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15.

18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.11, содержащие:

(1)

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 66; и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74;

(10)

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 67; и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75; или

(11)

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 68; и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76.

19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.11, содержащие:

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57; и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58.

20. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.11, содержащие:

тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2; и

легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7.

21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.11, содержащие:

тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80; и

легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7.

22. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1–21, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является гликозилированным с использованием N–связанных гликанов сконструированных дрожжей или N–связанных гликанов CHO.

23. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому пп.1–22.

24. Фармацевтическая композиция по п.23, дополнительно содержащая терапевтическое средство.

25. Фармацевтическая композиция по п.23 или 24, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

26. Полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую

VH, VL, или и VH, и VL, тяжелую цепь иммуноглобулина, легкую цепь иммуноглобулина, или и тяжелую цепь, и легкую цепь иммуноглобулина из антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1–21.

27. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.26.

28. Клетка–хозяин, содержащая полинуклеотид по п.26 или вектор по п.27.

29. Способ блокирования связывания ILT4 с HLA–G, HLA–A, HLA–B и/или HLA–F у нуждающегося в этом человека, включающий введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1–22.

30. Способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом человека, включающий введение человеку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1–22.

31. Способ по п.29 или 30, дополнительно включающий осуществление терапевтического способа и/или введение терапевтического средства человеку.

32. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1–22, включающий культивирование клетки–хозяина по п.28 для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

33. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1–22, включающий экспрессию полинуклеотида по п.26.

34. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающиеся с ILT4 человека и являющиеся продуктом способа по п.32 или 33.

35. Способ детекции пептида ILT4 или его фрагмента в образце, включающий приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1–22 и детекцию наличия комплекса между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и пептидом ILT4 или его фрагментом; где детекция комплекса свидетельствует о наличии пептида ILT4 или его фрагмента.

36. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1–22 в лечении злокачественного новообразования.

37. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1–22 для применения в лечении злокачественного новообразования.

38. Антитело, состоящее из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где каждая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58, и каждая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57.

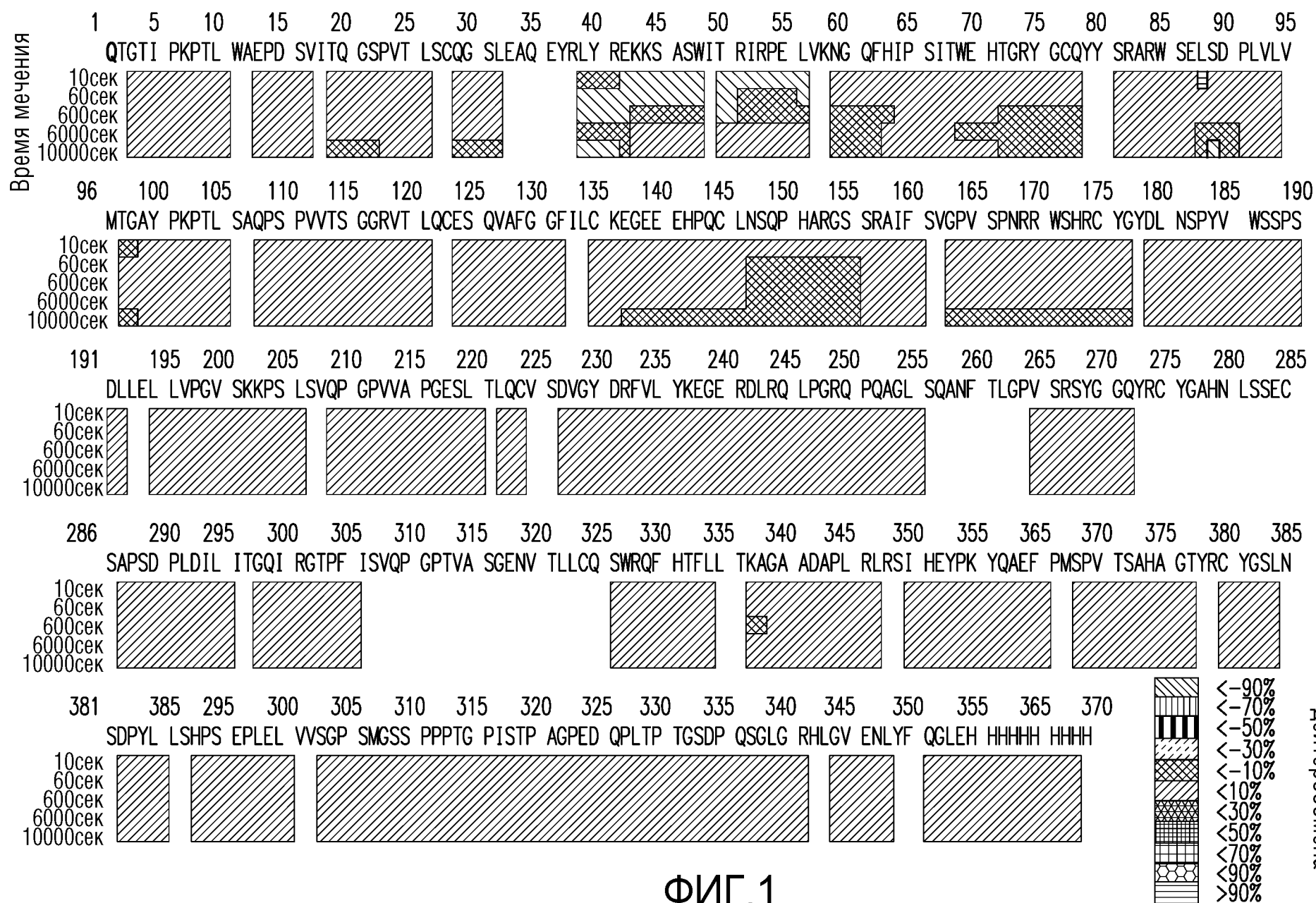
39. Антитело по п.38, где легкая цепь дополнительно содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90, и/или тяжелая цепь дополнительно содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89.

40. Антитело, состоящее из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где каждая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и каждая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

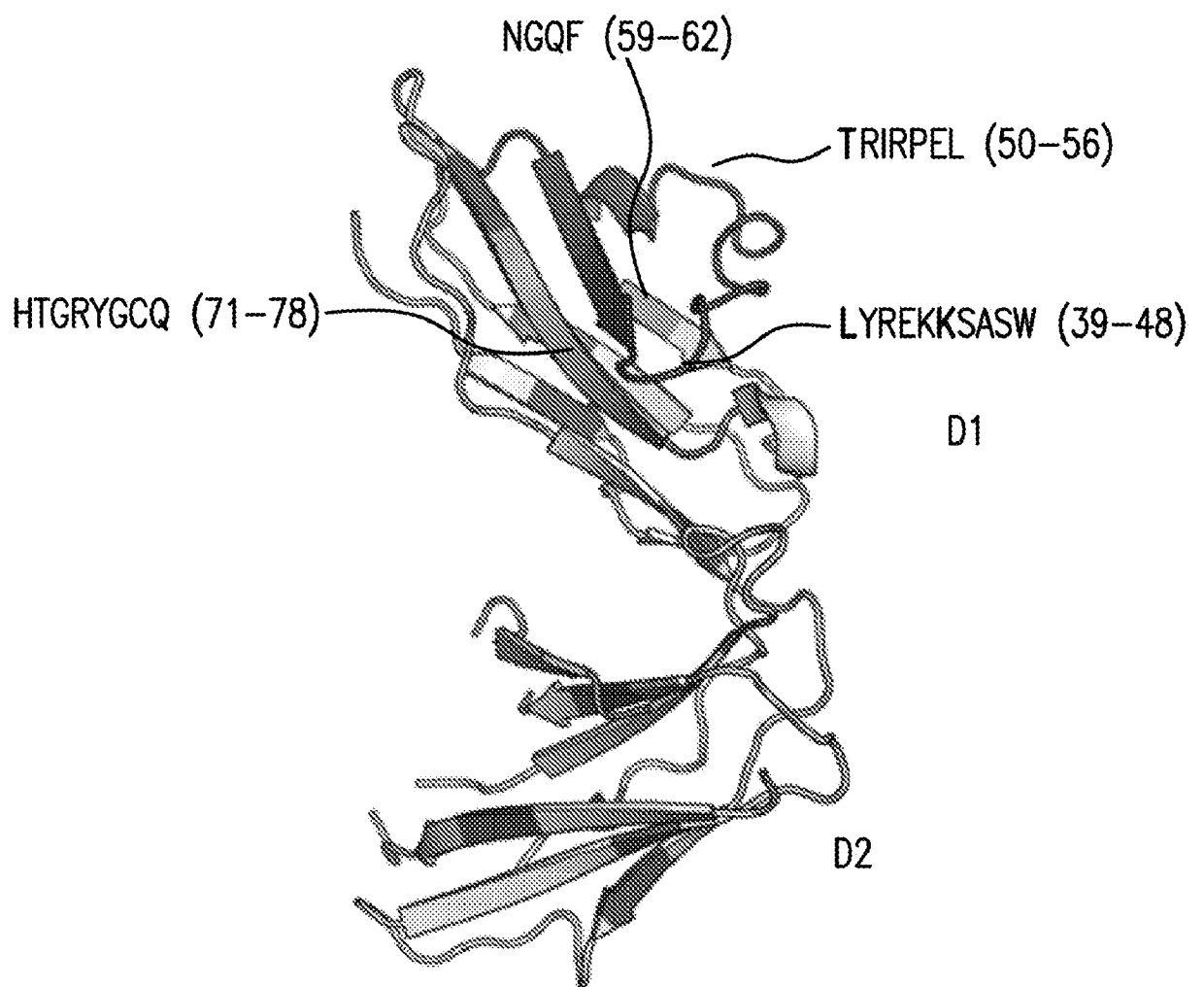
41. Антитело, состоящее из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где каждая легкая цепь состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7, и каждая тяжелая цепь состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2.

42. Фармацевтическая композиция, содержащая: (i) антитело, состоящее из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, где каждая легкая цепь состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7, и каждая тяжелая цепь состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2, и (ii) пембролизумаб.

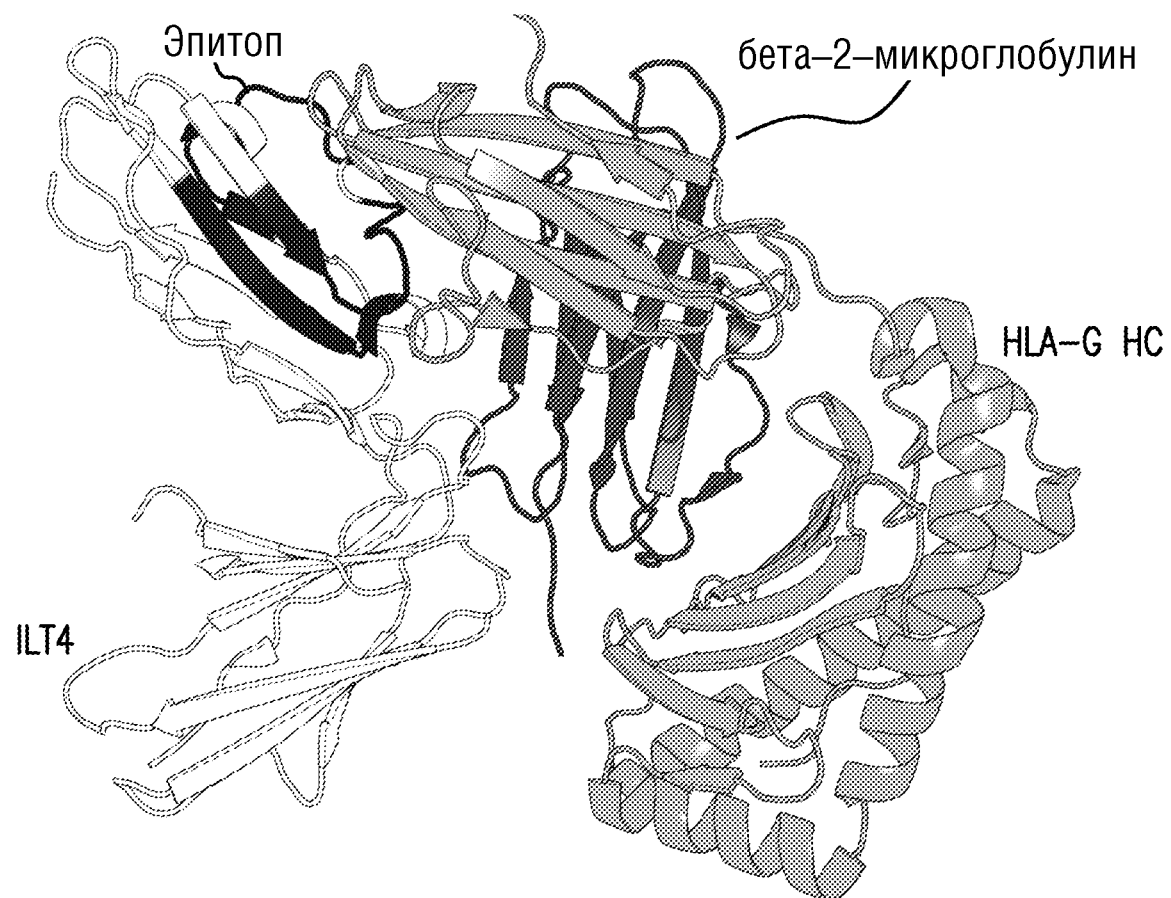
По доверенности



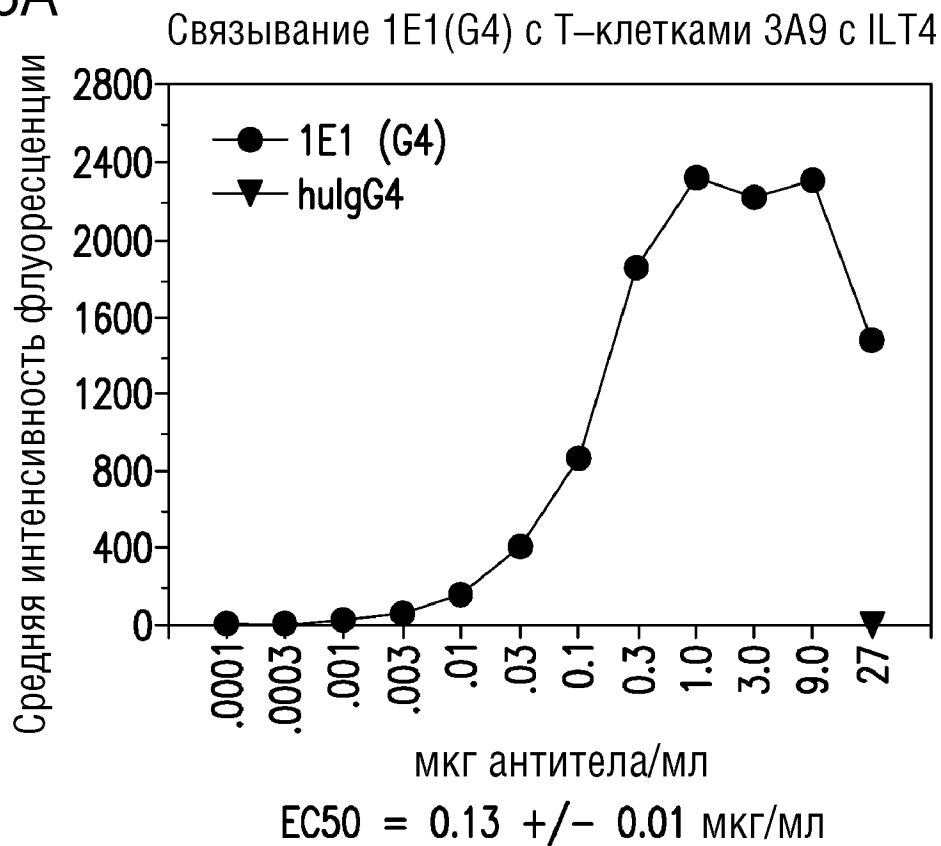
ФИГ.2А



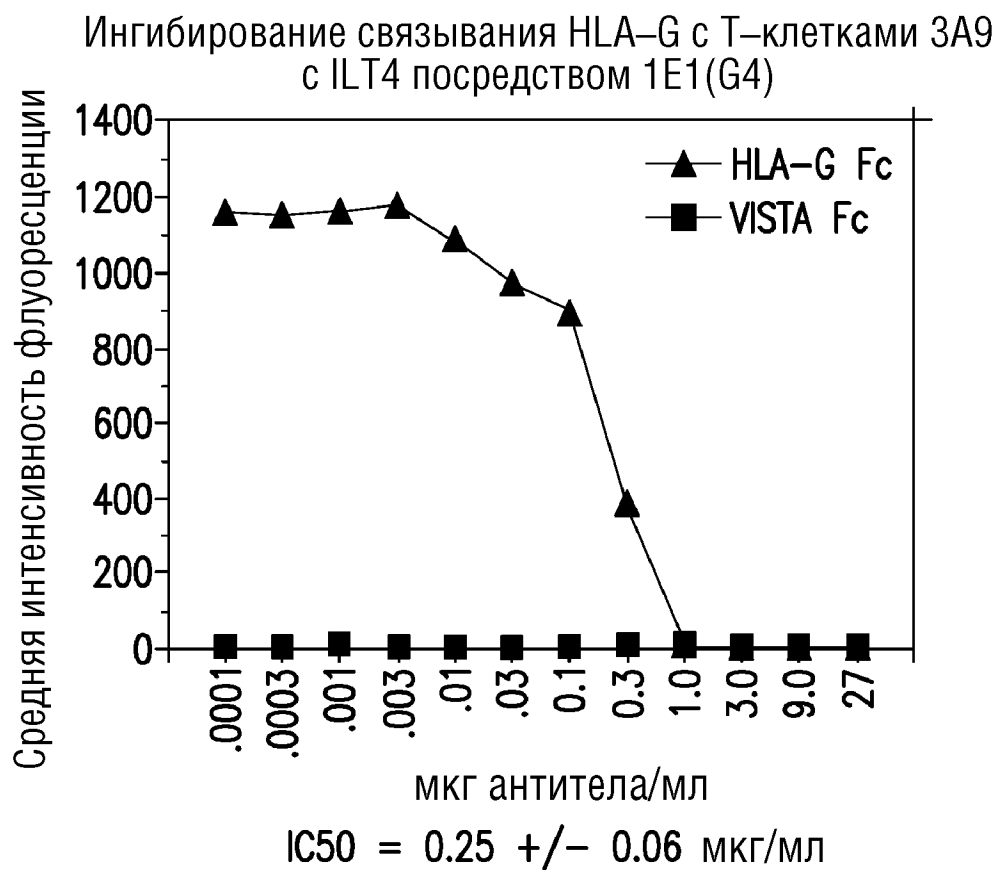
ФИГ.2В



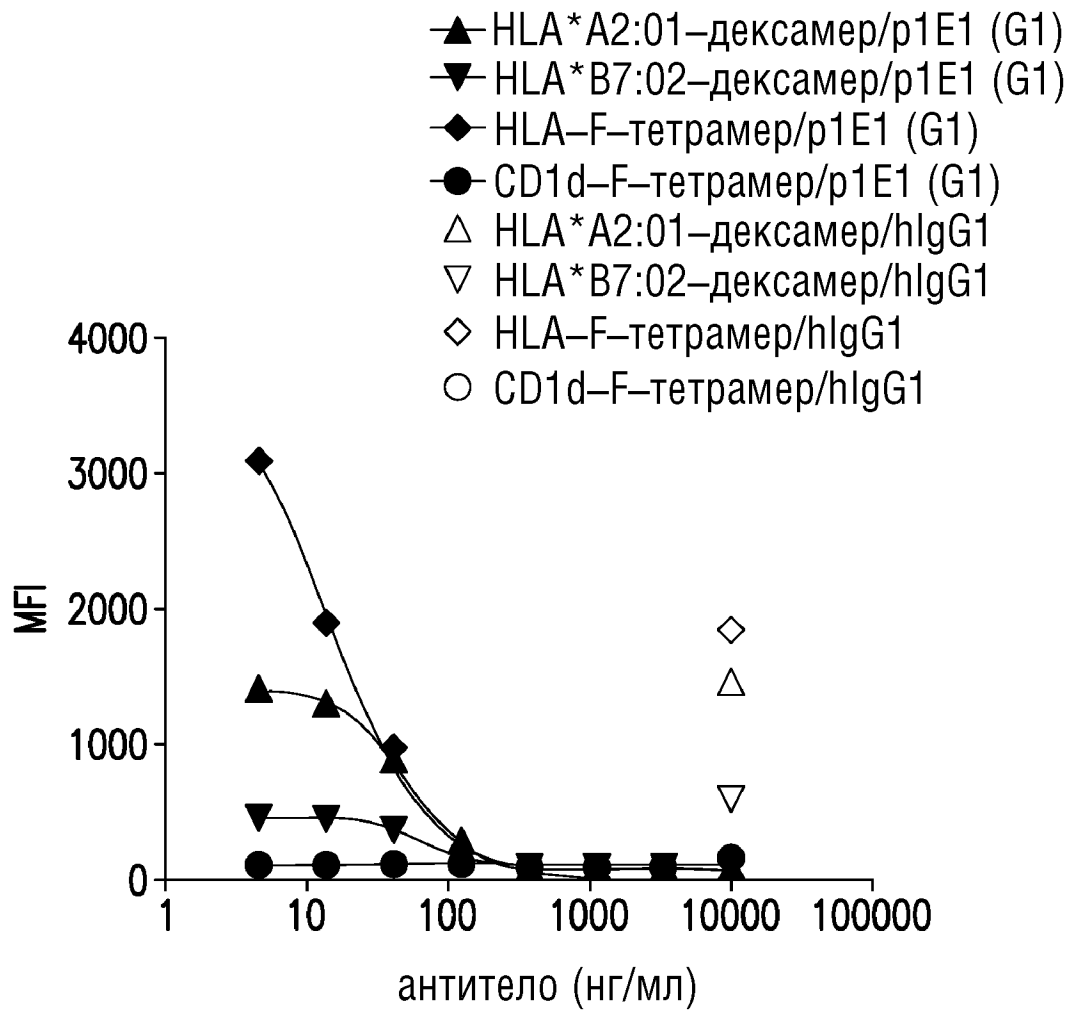
ФИГ.3А

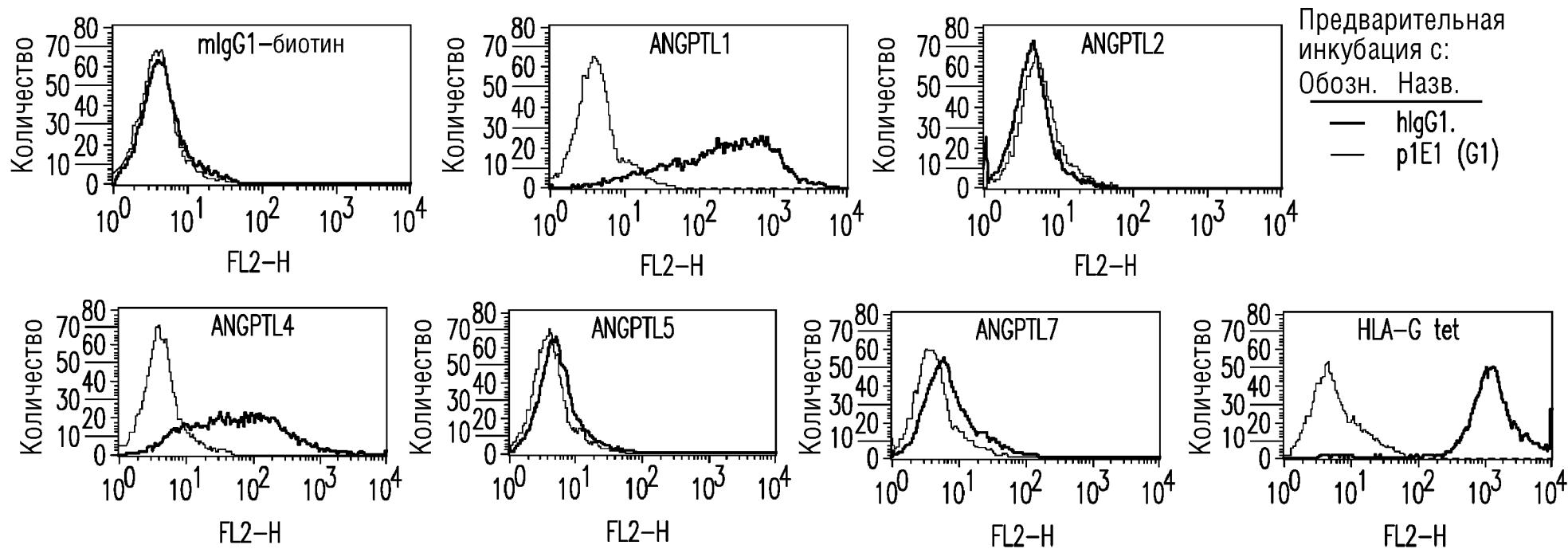


ФИГ.3В

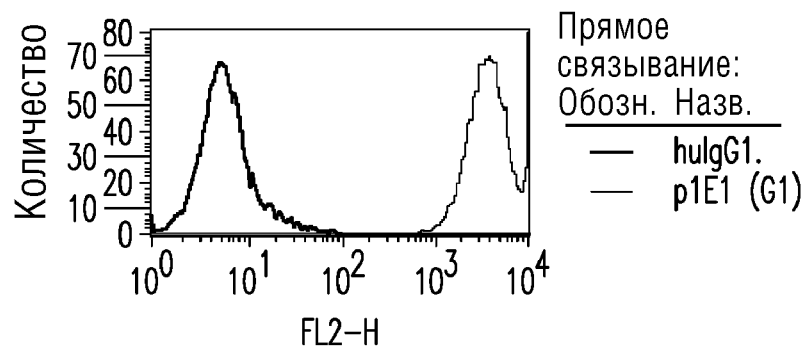


ФИГ.4

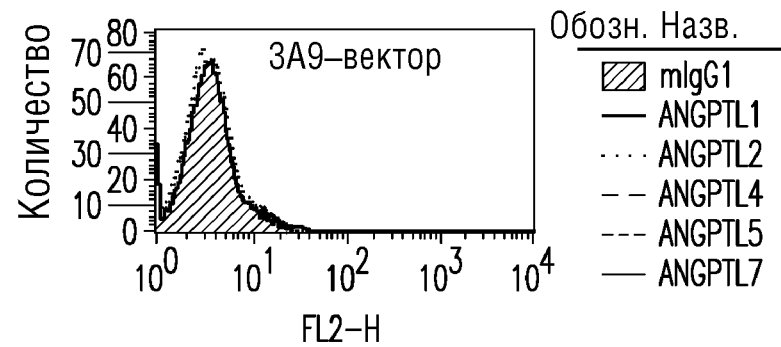




ФИГ.5А



ФИГ.5В

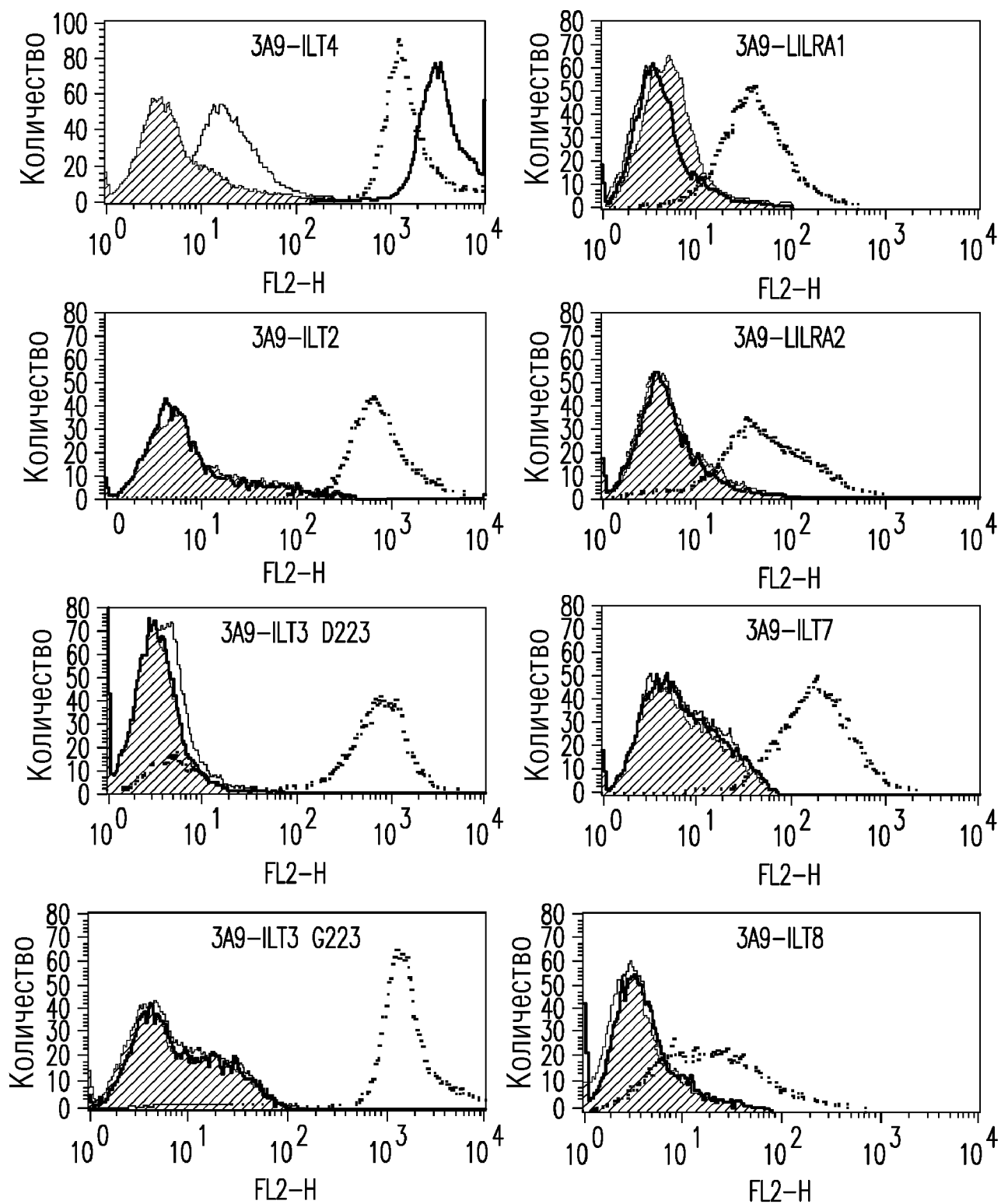


ФИГ.5С

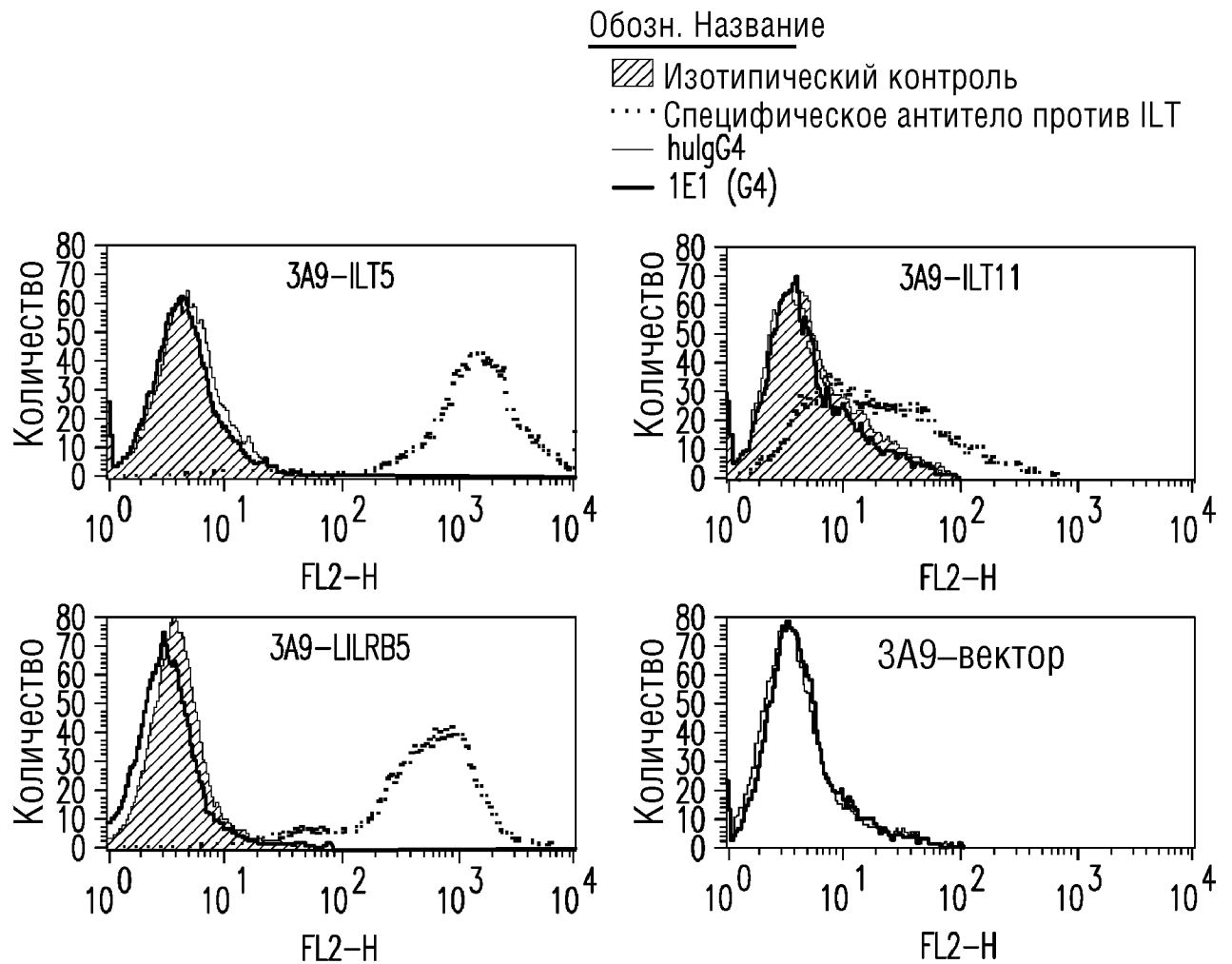
ФИГ.6А

Обозн. Название

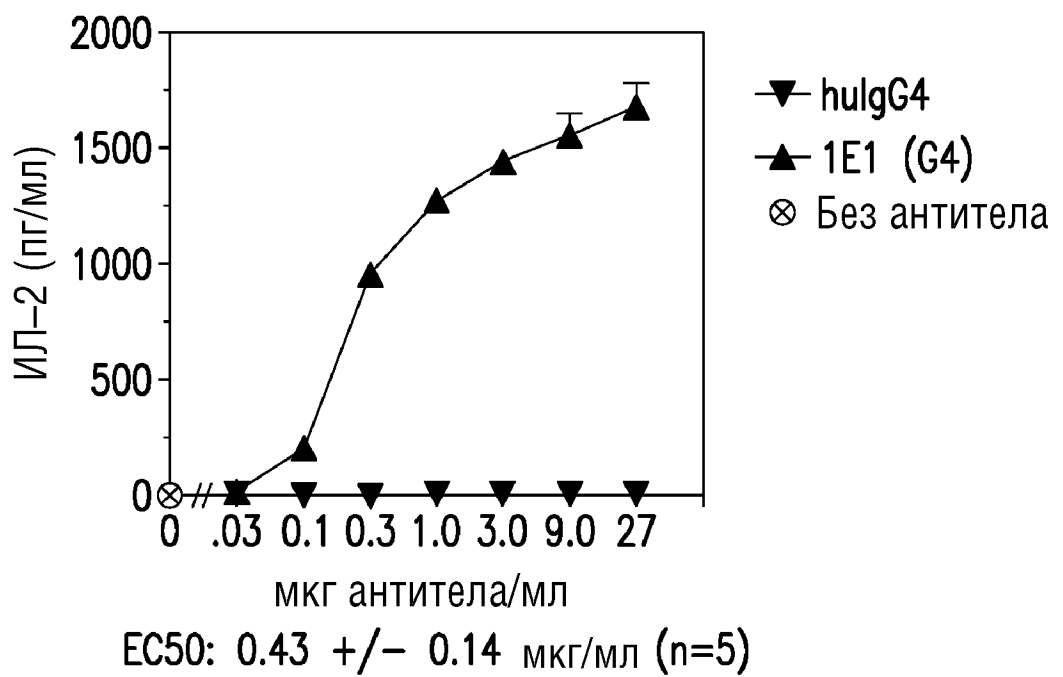
- ▨ Изотипический контроль
 Специфическое антитело против ILT
 — hulgG4
 — 1E1 (G4)



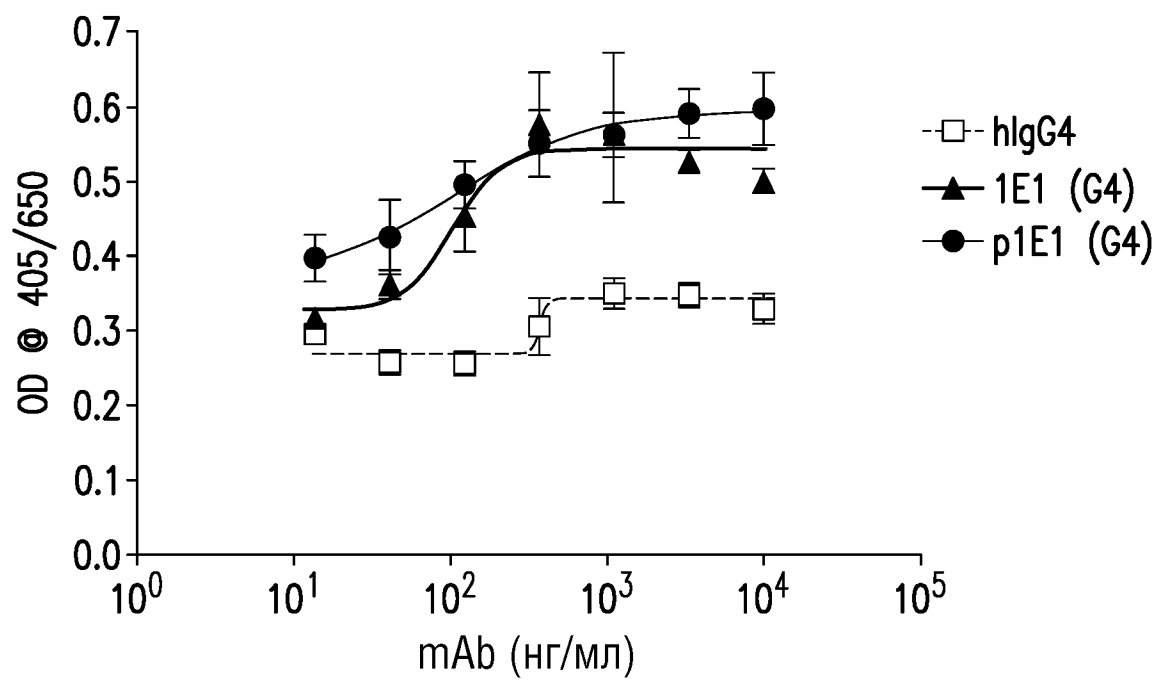
ФИГ.6В



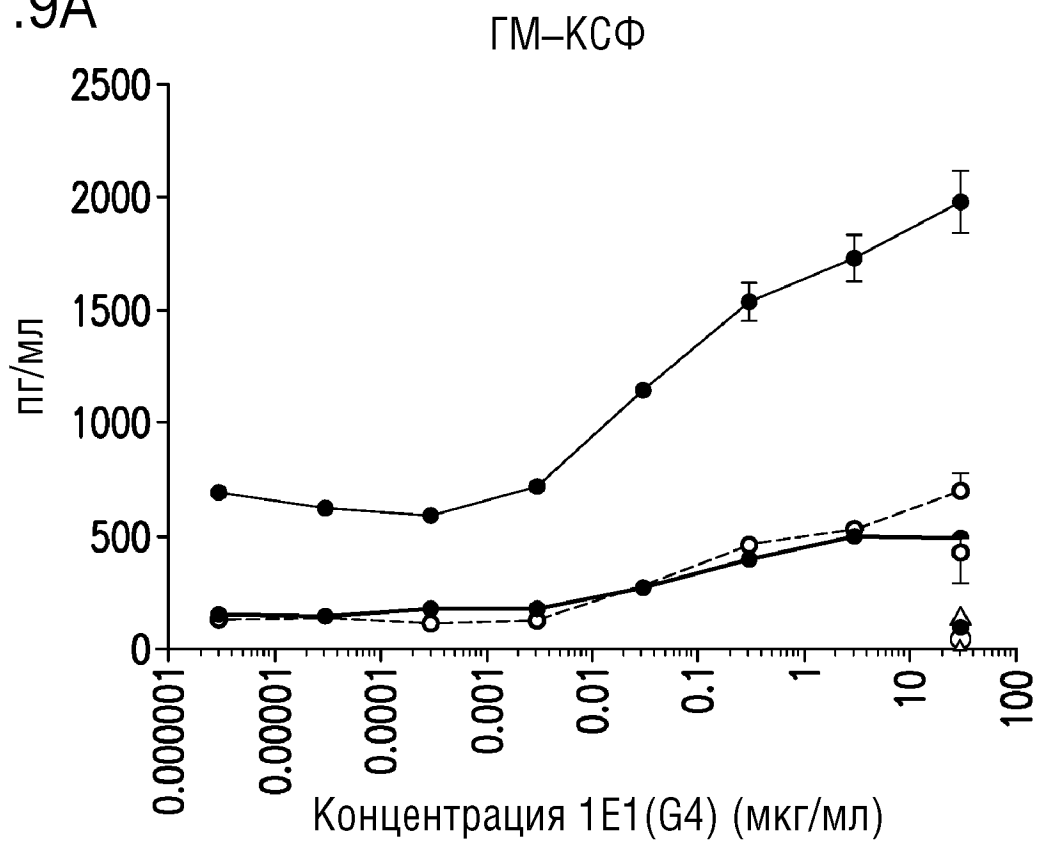
ФИГ.7



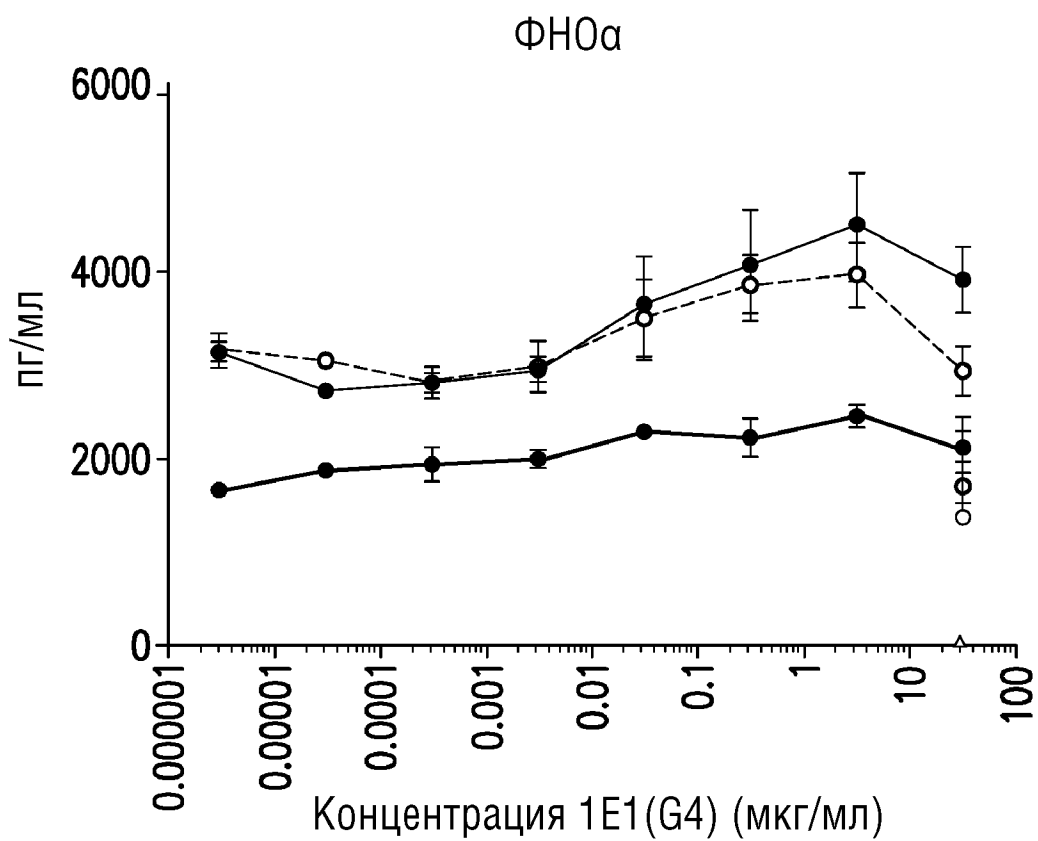
ФИГ.8



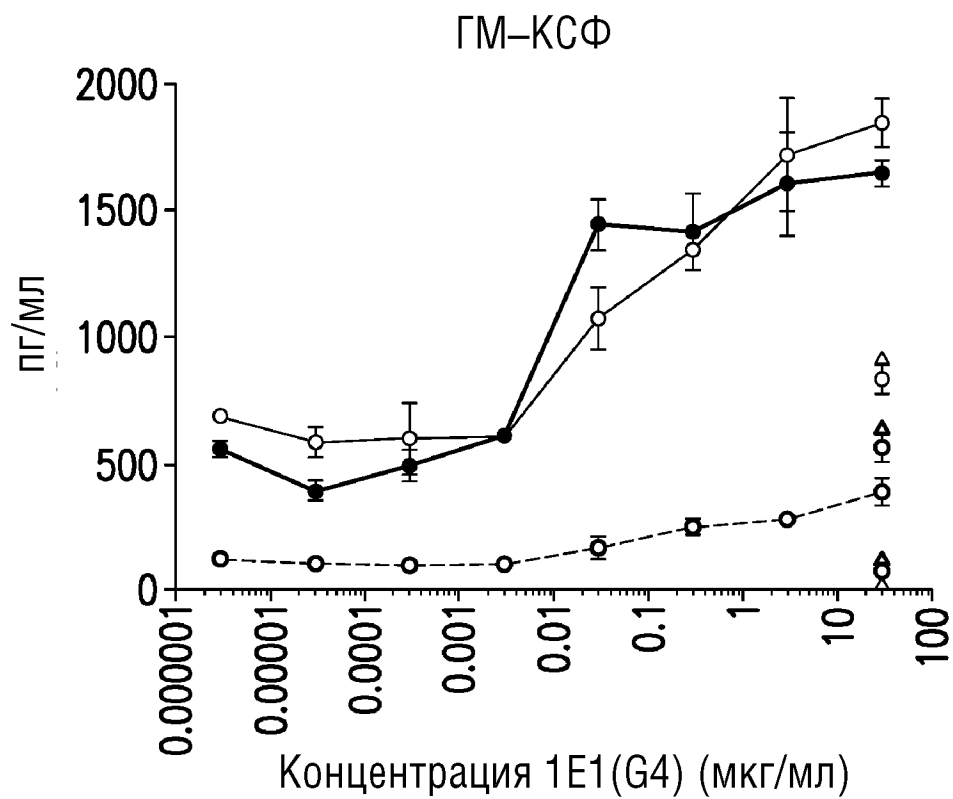
ФИГ.9А



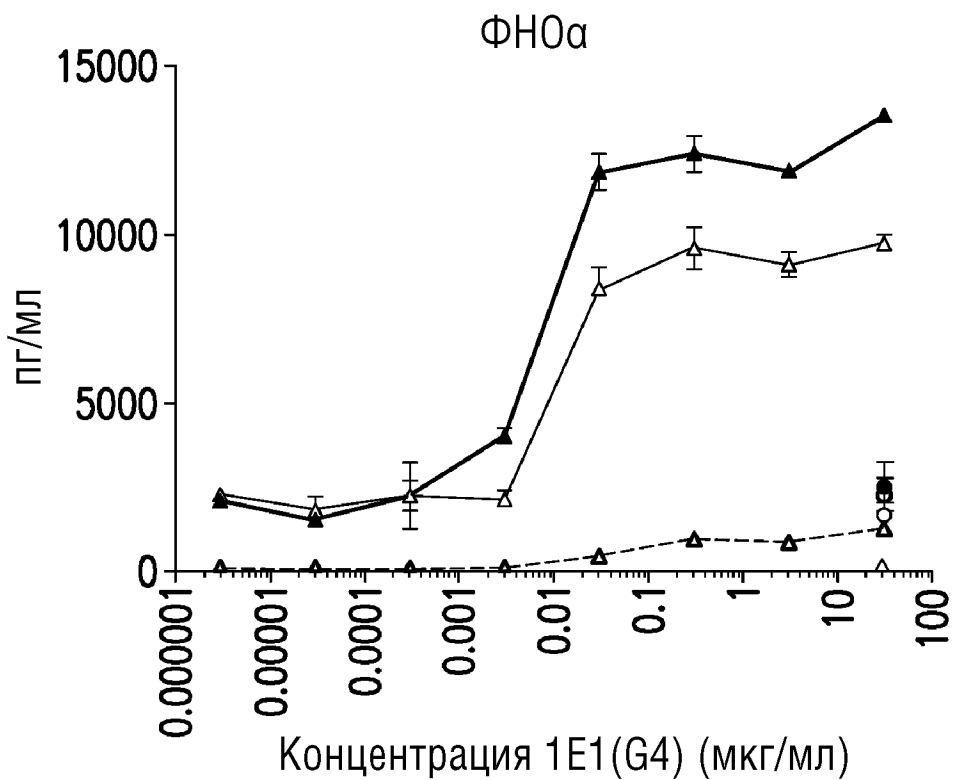
ФИГ.9В



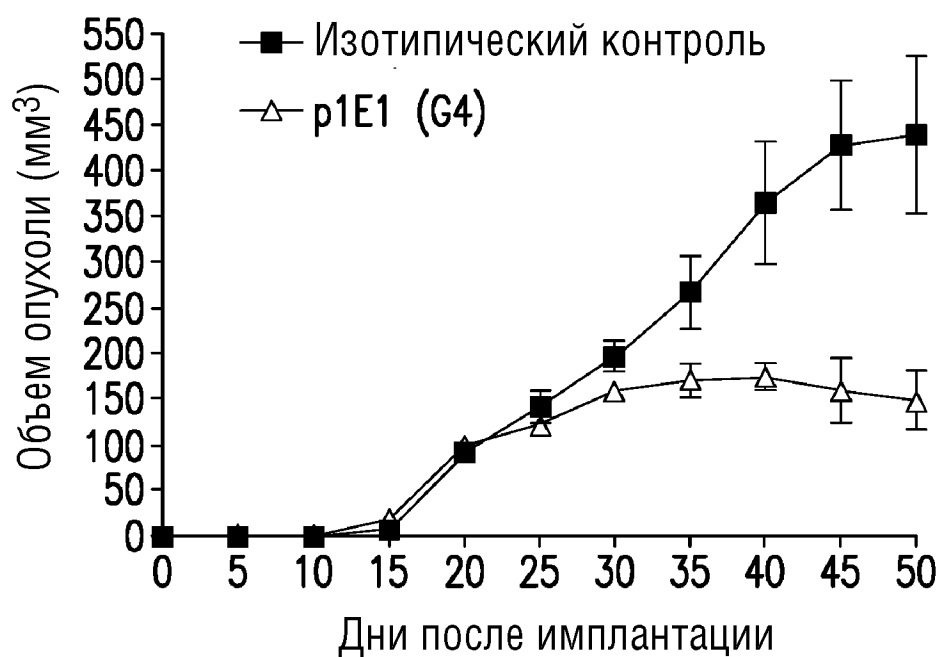
ФИГ.10А



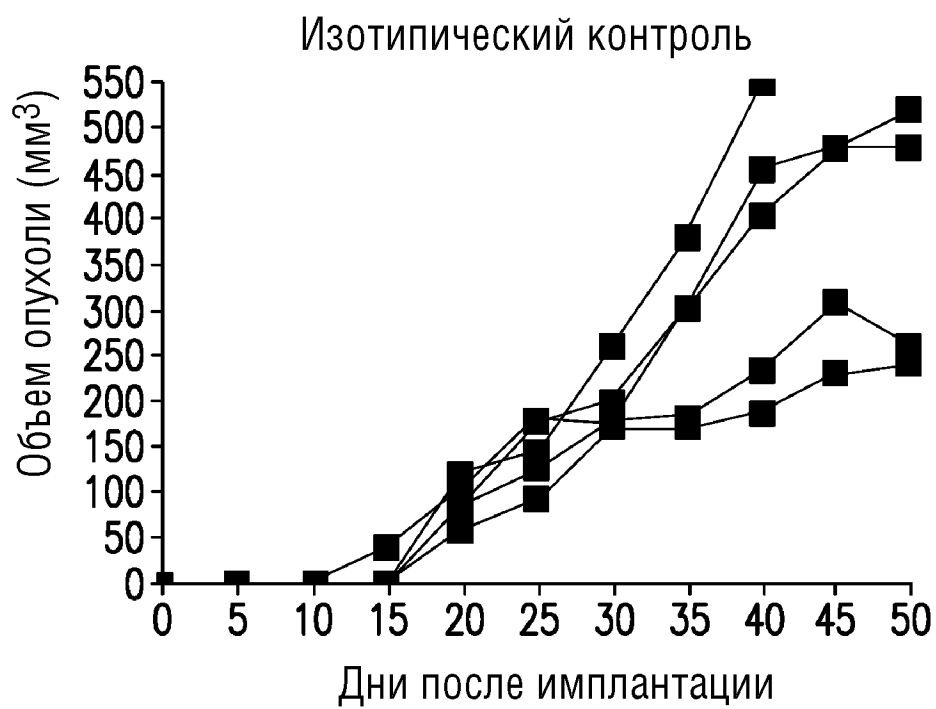
ФИГ.10В



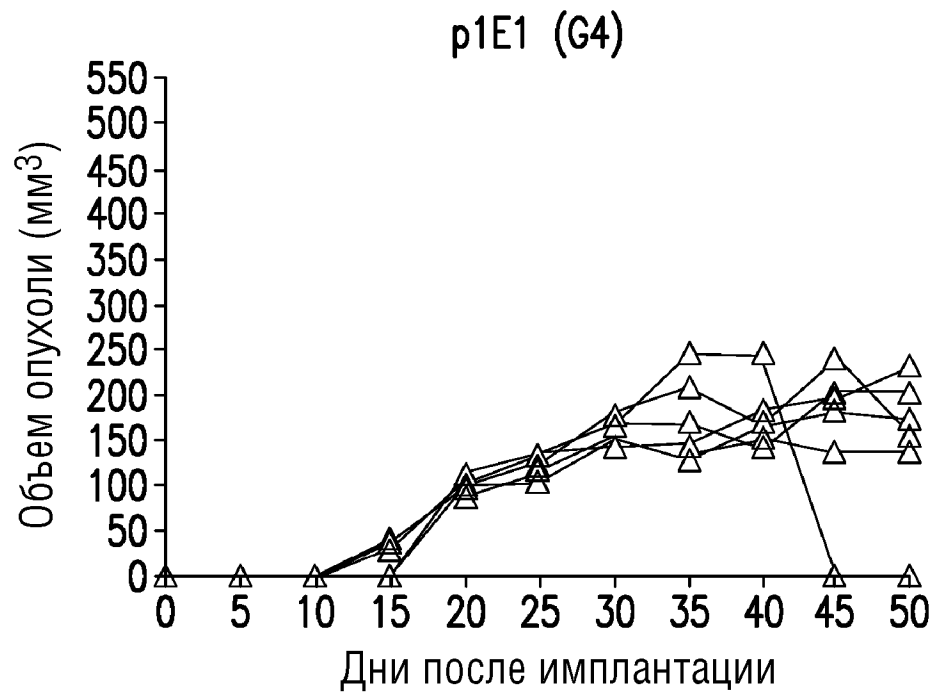
ФИГ.11А



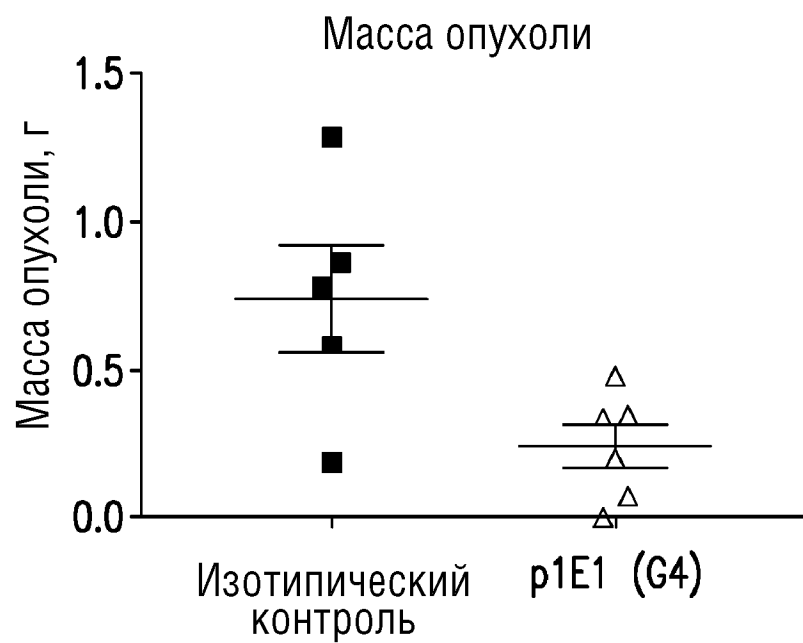
ФИГ.11В



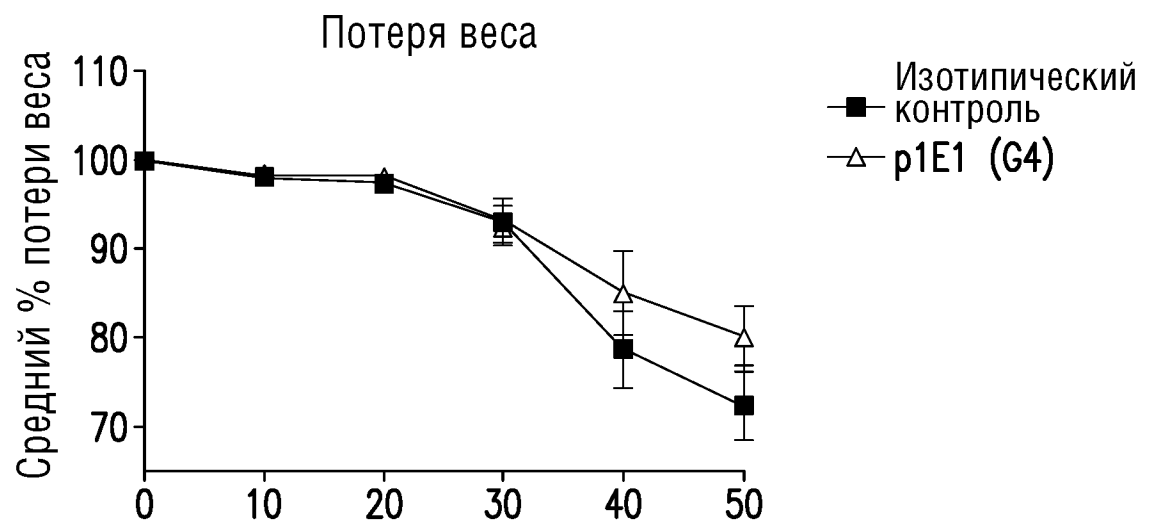
ФИГ.11С

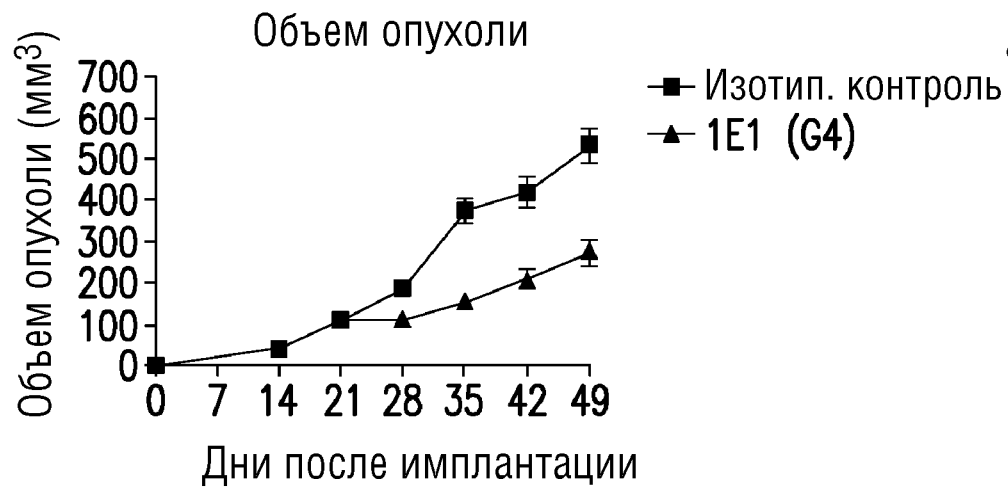


ФИГ.11D

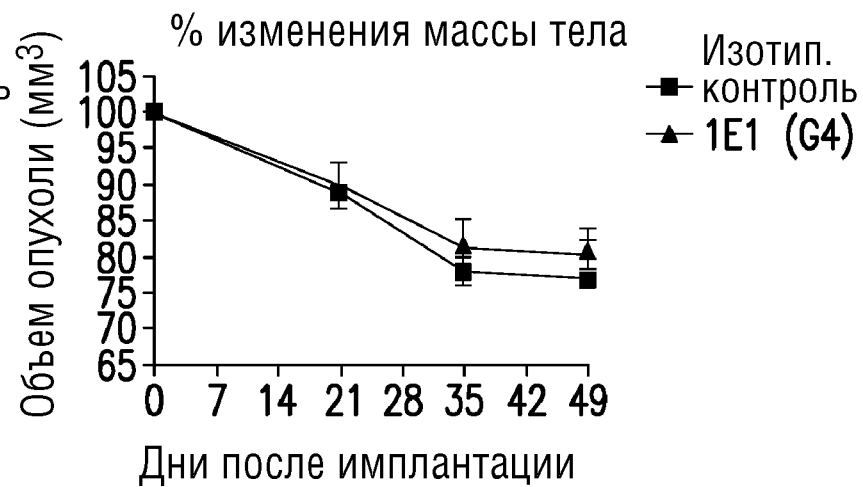


ФИГ.11Е

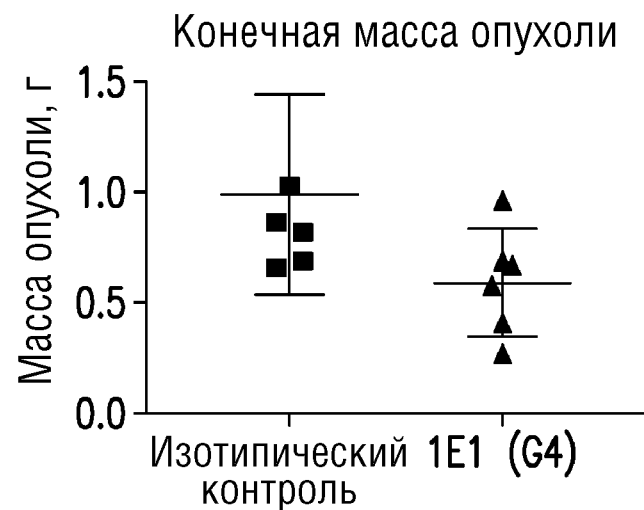




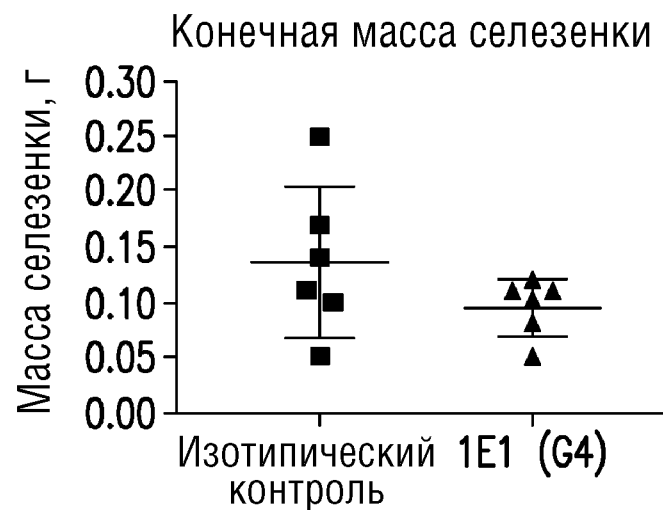
ФИГ.12А



ФИГ.12В

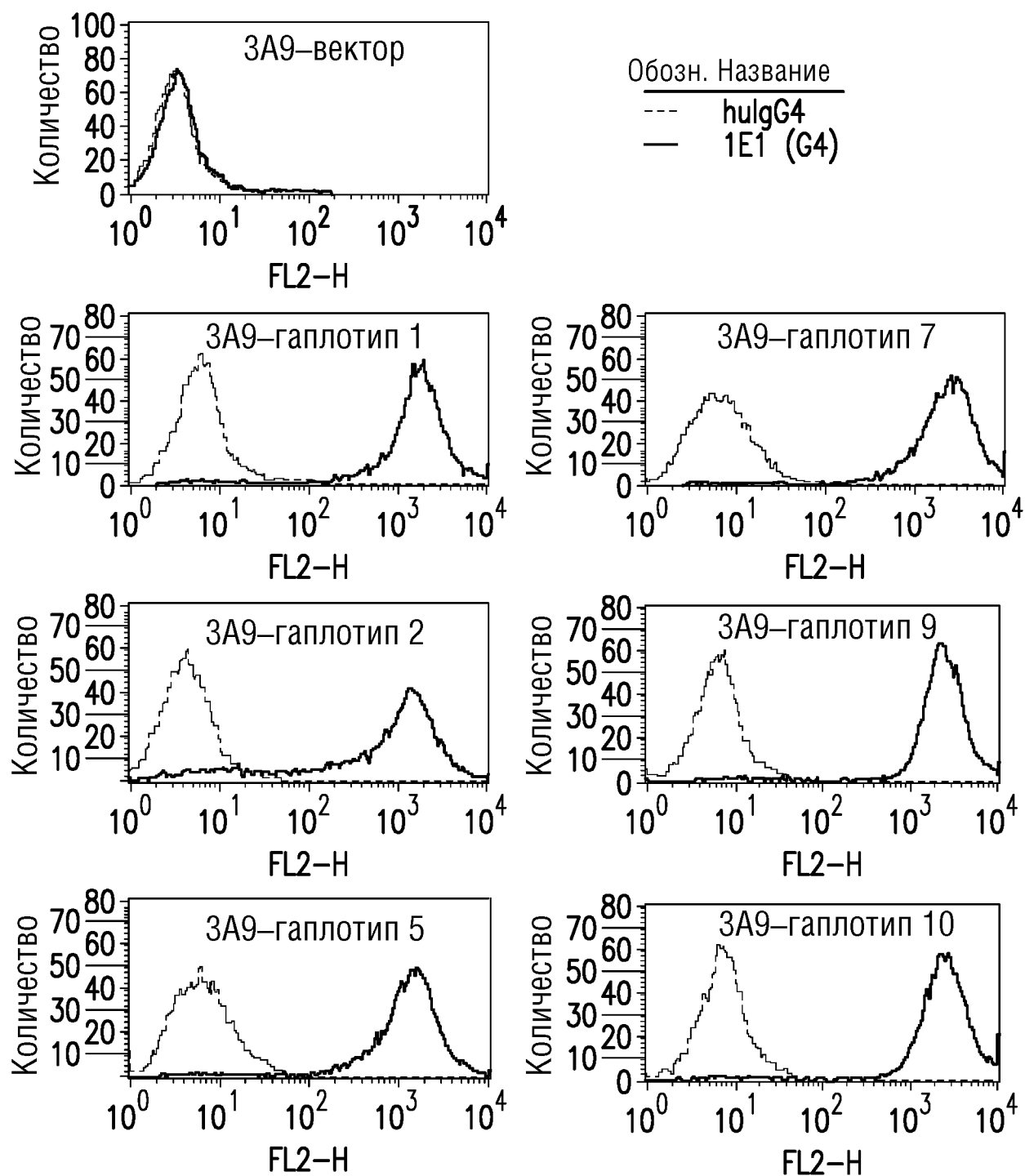


ФИГ.12С

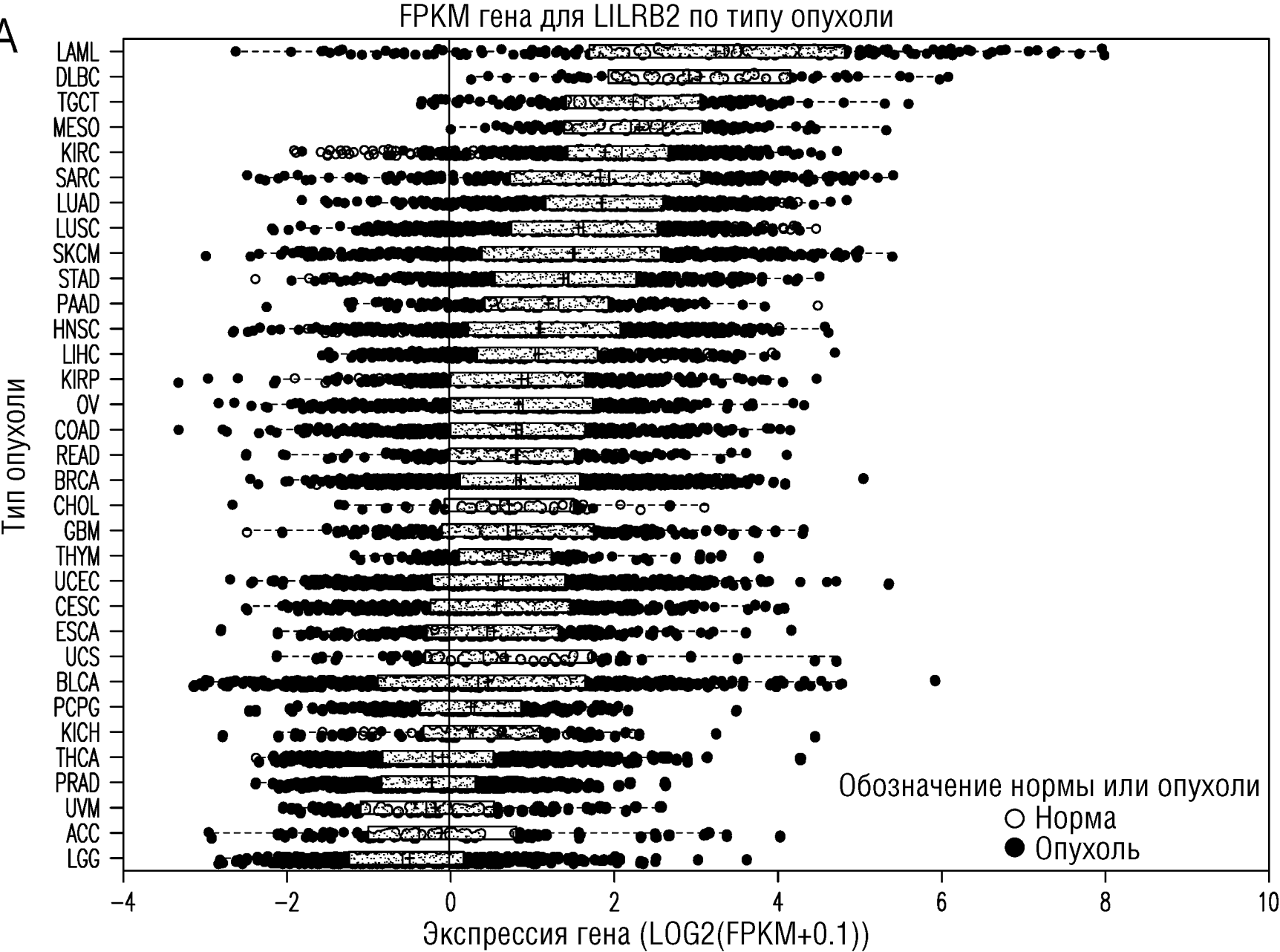


ФИГ.12D

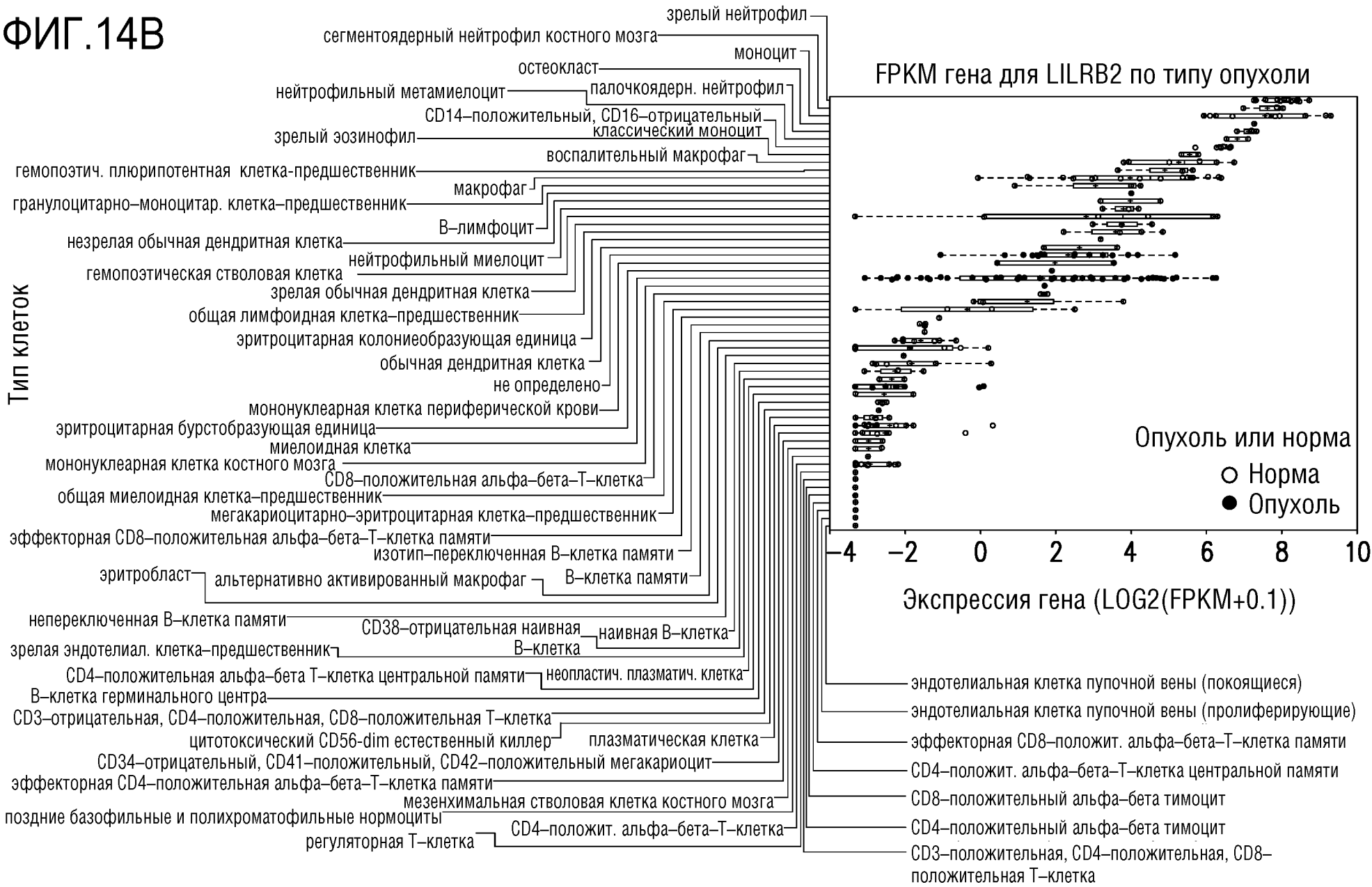
ФИГ.13



ФИГ.14А



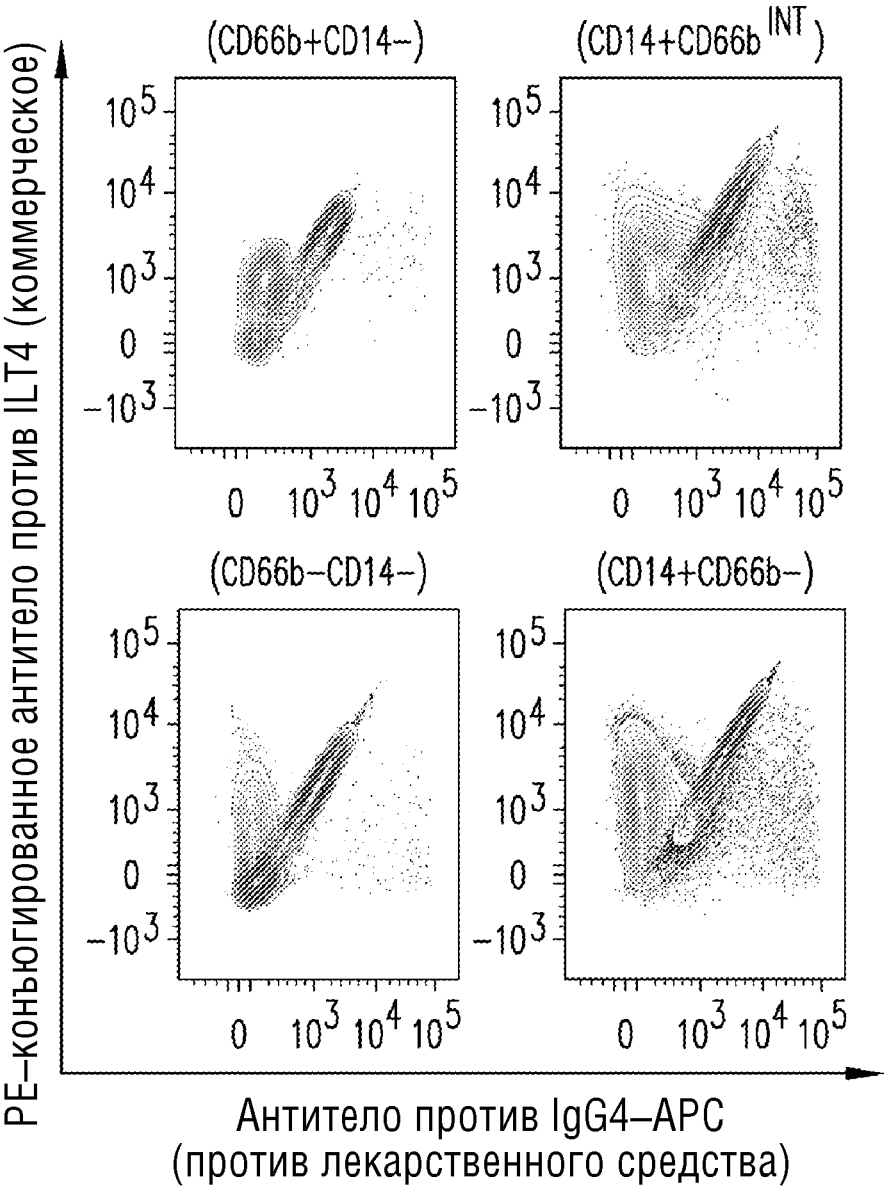
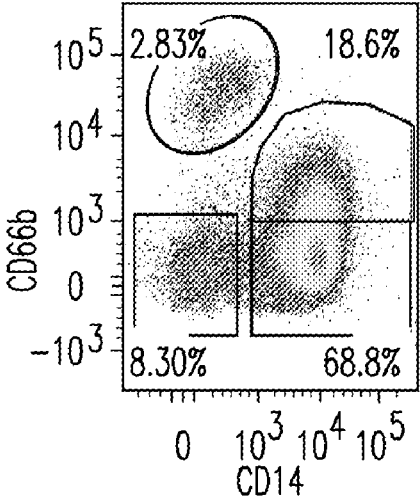
ФИГ.14В



ФИГ.15А

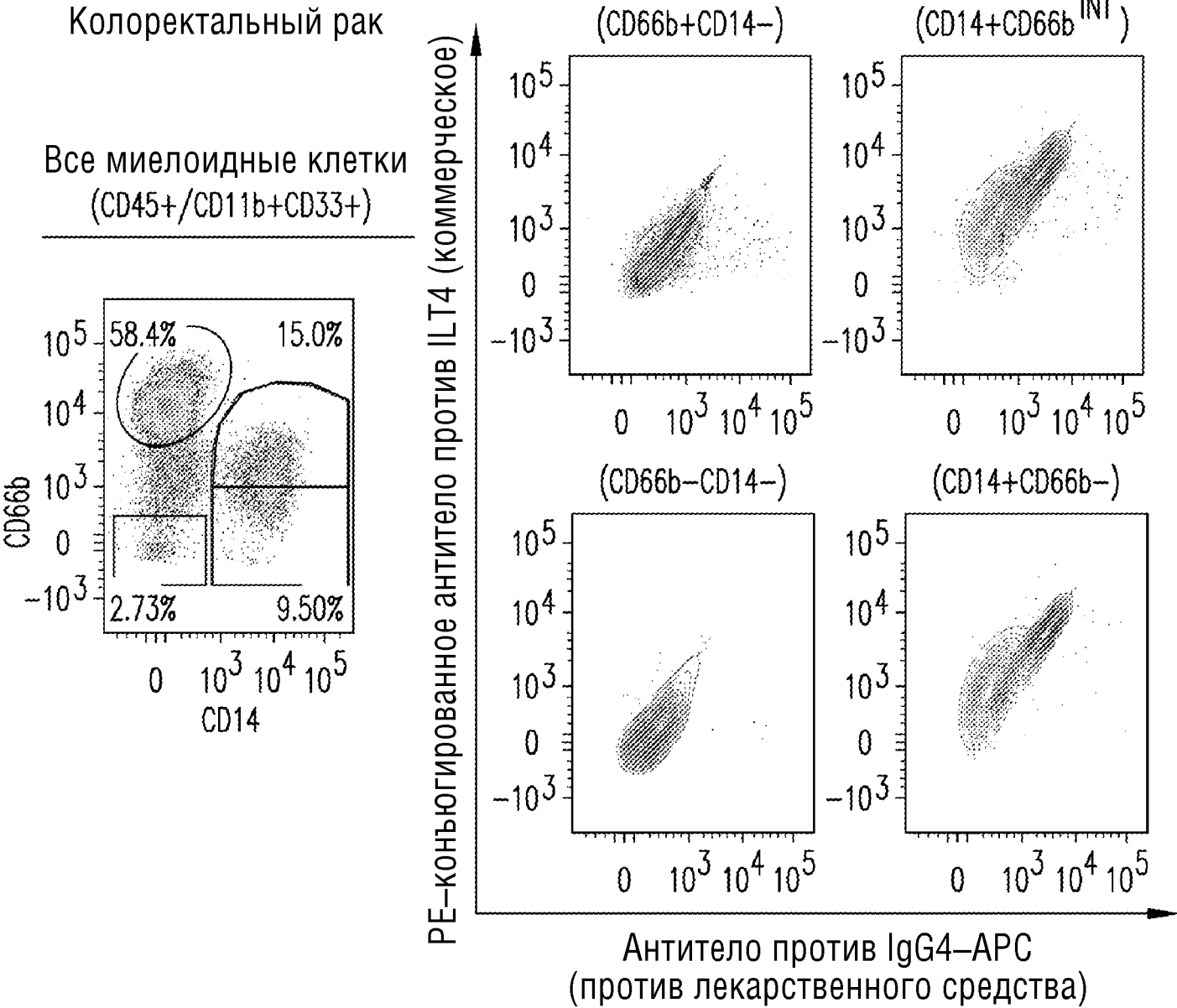
Почечноклеточная
карцинома

Все миелоидные клетки
(CD45+/CD11b+CD33+)



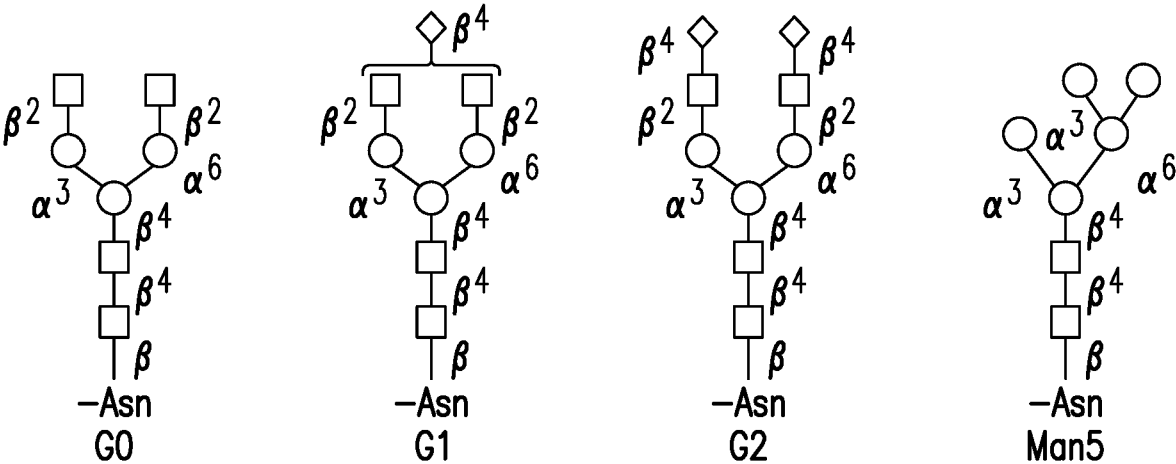
Изотип.
контроль Rx
1E1 Rx

ФИГ.15В



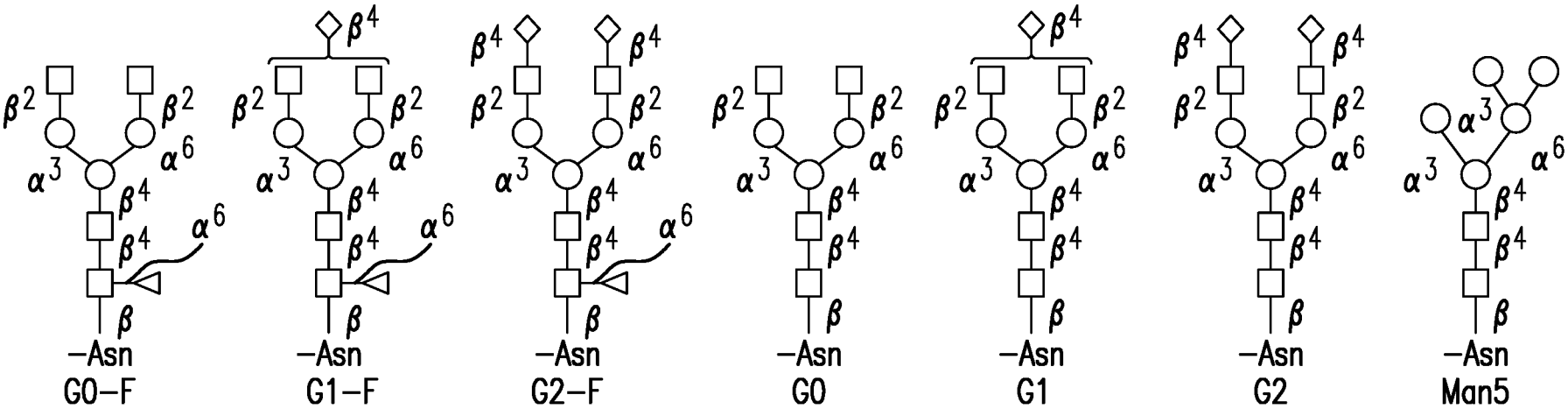
ФИГ.16

Сконструированные дрожжи



Основные формы

Клетки яичника
китайского хомяка



Основные формы

ФИГ.17

