

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992586** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2020.03.03

(51) Int. Cl. **G01N 33/569** (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.04.27

(54) **СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИПЕПТИДОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ДОМЕНА CD80**

(31) **62/491,479**

(72) Изобретатель:

(32) **2017.04.28**

**Бреннан Томас, Сеннино Барбара,
Барби Сюзанна Д., Джеффри Урсула
(US)**

(33) **US**

(86) **PCT/US2018/029897**

(87) **WO 2018/201014 2018.11.01**

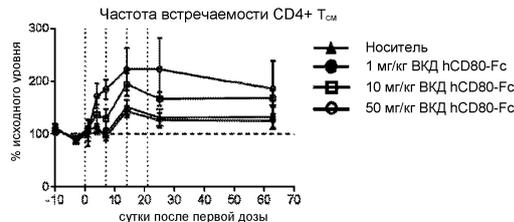
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

**ФАЙВ ПРАЙМ ТЕРАПЬЮТИКС,
ИНК. (US)**

**Строкова О.В., Глухарёва А.О., Лыгу
Т.Н., Угрюмов В.М., Христофоров
А.А., Гизатуллина Е.М., Гизатуллин
Ш.Ф., Костюшенкова М.Ю., Лебедев
В.В., Парамонова К.В. (RU)**

(57) Заявка относится к применению полипептидов внеклеточного домена (ВКД) CD80 (B7-1) и слитых молекул CD80-ВКД, а также их применению в способах повышения количества центральных Т-клеток памяти или для лечения рака, или для применения в композициях с противораковой вакциной.



A1

201992586

201992586

A1

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИПЕПТИДОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ДОМЕНА CD80

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- [0001] Данная заявка содержит перечень последовательностей, поданный в электронном виде в формате ASCII и включенный в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Указанная копия перечня последовательности в формате ASCII, созданная 26 апреля 2018 г., называется 3986.007PC01_SequenceListing_ST25.txt и имеет размер 60 296 байт.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

- [0002] Эта заявка относится к полипептидам внеклеточного домена (ВКД) CD80 (B7-1) и слитым молекулам CD80-ВКД и их применению для увеличения количества центральных Т-клеток памяти и в способах лечения, таких как способы лечения рака.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

- [0003] CD80, также известный как B7-1, является одним из семейства B7 мембраносвязанных белков, участвующих в иммунной регуляции путем доставки костимулирующих или коингибирующих ответов посредством их лиганд-связывающей активности. Другие члены семейства B7 белков включают CD86 (B7-2), лиганд индуцируемого костимулятора (ICOS-L), лиганд 1 запрограммированной смерти клетки (PD-L1; B7-H1), лиганд 2 запрограммированной смерти клетки (PD-L2; B7-H2), B7-H3 и B7-H4. CD80 представляет собой трансмембранный белок, экспрессируемый на поверхности Т-клеток, В-клеток, дендритных клеток и моноцитов и связывается с рецепторами CD28, CTLA4 (CD152) и PD-L1. (Смотрите, например, M. Collins et al., *Genome Biol.* 6:223 doi:10.1186/bg-2005-6-6-223 (2005).) CD80 и CD86 и их рецепторы CTLA4 и CD28 действуют в качестве костимулирующей-коингибирующей системы, например, с целью контроля активации, экспансии, дифференцировки и выживаемости Т-клеток. Взаимодействие CD80 и CD86 с CD28 приводит к костимулирующим сигналам, которые приводят, например, к активации ответов Т-клеток. CD80, в свою очередь, стимулирует повышение экспрессии CTLA4, который после связывания с CD80 действует, подавляя ответ Т-клеток, запущенный до этого взаимодействиями CD80/CD28. Этот цикл обратной связи позволяет с высокой точностью контролировать иммунные ответы. (Смотрите, например, R. Peach et al., *J. Biol. Chem.* 270(36): 21181-87 (1995).)
- [0004] Также было показано, что CD80 взаимодействует с другим членом семейства B7, PD-L1, с аффинностью, сходной с CD28, тогда как CD86 не взаимодействует с PD-L1. (Смотрите, например, P. Greaves & J.G. Gribbon, *Blood* 121(5): 734-44 (2013).) PD-L1 является одним из двух лигандов для белка 1 запрограммированной смерти клетки (PD-1), который также вовлечен в регуляцию Т-клеток. В частности, экспрессия PD-1 на Т-клетках может индуцироваться после того, как Т-клетки были активированы, и связывание PD-1 с PD-L1 снижает активность Т-клеток за счет

стимуляции инактивации Т-клеток. (Смотрите, например, S. Ostrand-Rosenberg, *J. Immunol.* 193: 3835-41 (2014).) Многие опухолевые клетки экспрессируют PD-L1 на своей поверхности, что потенциально приводит к взаимодействиям PD-1/PD-L1 и ингибированию ответов Т-клеток против опухоли. Это наблюдение привело к разработке ингибиторов взаимодействия PD-1/PD-L1 как противоопухолевых терапевтических средств, предназначенных для стимулирования естественных иммунных ответов против опухолей у пациентов. (Смотрите идентификатор.) Связывание CD80 с PD-L1 может служить в качестве альтернативного механизма для блокирования взаимодействия PD-1/PD-L1 и предотвращения ингибирования ответов Т-клеток в месте опухоли. (Смотрите идентификатор 3839.) Тем не менее, в то же время, повышенные уровни CD80 также могут быть доступны для связывания с CD28 и для индукции CTLA4, таким образом, либо индуцируя, либо ингибируя ответы Т-клеток. Некоторые растворимые формы CD80 могут также функционировать для блокирования активации CTLA4 путем блокирования эндогенной активности CD80. (Смотрите идентификатор)

- [0005] Авторы настоящего изобретения показали, что введение слитого полипептида внеклеточного домена (ВКД) CD80 яванским макакам индуцировало экспансию и пролиферацию CD4+ и CD8+ центральных Т-клеток памяти дозозависимым образом. Т-клетки памяти представляют собой подгруппу Т-клеток, которые направлены на конкретные антигены благодаря предыдущим контактам с этими антигенами. Присутствие Т-клеток памяти может способствовать более сильному и быстрому иммунному ответу на антиген, если в будущем произойдет повторный контакт. Центральные Т-клетки памяти (Тсm) представляют собой подгруппу Т-клеток памяти, которые могут сохранять некоторые свойства, которые подобны свойствам стволовых клеток. (Смотрите Y.D. Mahnke, *Eur. J. Immunol.* 43: 2797-2809 (2013).) Было показано, что определенные подгруппы Тсm активны в отношении определенных видов рака в исследованиях на мышах, например, повышая вторичный ответ на активный опухолевый антиген, когда мышам повторно вводят опухолевые антигены, с которыми ранее уже был контакт. (Смотрите Klebanoff et al., *PNAS* 102(27): 9571-76 (2005). Клинические исследования ипилимумаба, анти-CTLA4 антитела, также показали изменения в популяциях Т-клеток у пациентов которые реагируют на лечение антителом. (J. Felix et al., *Oncimmunology* 5(7): e1136045 (2016); J.S. Weber, *J. Immunother.* 35(1): 89-97 (2012)).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

- [0006] В данном документе предлагаются способы определения активности слитой молекулы внеклеточного домена (ВКД) CD80 у субъекта, включающие определение частоты встречаемости центральных Т-клеток памяти и/или выявление пролиферации центральных Т-клеток памяти в образце, полученном от субъекта после введения субъекту слитой молекулы ВКД CD80, причем слитая молекула ВКД CD80 содержит полипептид ВКД CD80 человека и Fc-домен IgG1 человека.
- [0007] В данном документе также предлагаются способы определения частоты встречаемости или пролиферации центральных Т-клеток памяти у субъекта, включающие определение частоты встречаемости центральных Т-клеток памяти и/или выявление пролиферации центральных Т-клеток памяти в образце, полученном от субъекта после введения субъекту слитой молекулы ВКД CD80,

причем слитая молекула ВКД CD80 содержит полипептид ВКД CD80 человека и Fc-домен IgG1 человека.

- [0008] В данном документе также предлагаются способы определения активности слитой молекулы внеклеточного домена (ВКД) CD80 у субъекта, которые включают (а) получение образца от субъекта после того, как субъекту была введена слитая молекула ВКД CD80, и (b) определение частоты встречаемости центральных Т-клеток памяти и/или выявление пролиферации центральных Т-клеток памяти в образце, причем слитая молекула ВКД CD80 содержит полипептид ВКД CD80 человека и Fc-домен IgG1 человека.
- [0009] В данном документе также предлагаются способы определения частоты встречаемости или пролиферации центральных Т-клеток памяти у субъекта, которые включают (а) получение образца от субъекта после того, как субъекту была введена слитая молекула ВКД CD80, и (b) определение частоты встречаемости центральных Т-клеток памяти и/или выявление пролиферации центральных Т-клеток памяти в образце, причем слитая молекула ВКД CD80 содержит полипептид ВКД CD80 человека и Fc-домен IgG1 человека.
- [0010] В определенных случаях способы дополнительно включают введение слитой молекулы ВКД CD80 субъекту после определения частоты встречаемости центральных Т-клеток памяти и/или определения пролиферации центральных Т-клеток памяти в образце. В определенных случаях субъект имеет рак.
- [0011] В данном документе также предлагаются способы лечения рака у субъекта, которые включают (а) введение субъекту слитой молекулы ВКД CD80, содержащей полипептид ВКД CD80 человека и Fc-домен IgG1 человека; и (b) определение частоты встречаемости центральных Т-клеток памяти и/или выявление пролиферации центральных Т-клеток памяти в образце, полученном от субъекта после введения.
- [0012] В определенных случаях способы дополнительно включают определение частоты встречаемости центральных Т-клеток памяти или выявление пролиферации центральных Т-клеток памяти в образце, полученном от субъекта перед введением слитой молекулы ВКД CD80.
- [0013] В определенных случаях способы включают определение частоты встречаемости центральных Т-клеток памяти, но не выявление пролиферации центральных Т-клеток памяти. В определенных случаях способы включают выявление пролиферации центральных Т-клеток памяти, но не определение частоты встречаемости центральных Т-клеток памяти. В определенных случаях способы включают определение частоты встречаемости центральных Т-клеток памяти и выявление пролиферации центральных Т-клеток памяти.
- [0014] В определенных случаях частоту встречаемости определяют с использованием проточной цитометрии.
- [0015] В определенных случаях пролиферацию выявляют с использованием проточной цитометрии. В определенных случаях пролиферацию выявляют путем измерения экспрессии Ki67. В определенных случаях пролиферацию выявляют в образце, полученном по меньшей мере через 7 суток после введения слитой молекулы ВКД CD80.
- [0016] В данном документе также предлагаются способы лечения рака у субъекта, которые включают введение субъекту слитой молекулы ВКД CD80, содержащей полипептид ВКД CD80 человека и Fc-домен IgG1 человека, причем (а) частота встречаемости Т-клеток памяти была определена в

образце, полученном от субъекта перед введением и/или (b) пролиферация Т-клеток памяти была выявлена в образце, полученном от субъекта перед введением.

- [0017] В определенных случаях частота встречаемости Т-клеток памяти была определена, но пролиферация Т-клеток памяти не была выявлена. В определенных случаях была выявлена пролиферация Т-клеток памяти, но частота встречаемости Т-клеток памяти не была определена. В определенных случаях была определена частота встречаемости Т-клеток памяти и была выявлена пролиферация Т-клеток памяти.
- [0018] В определенных случаях частота встречаемости была определена с использованием проточной цитометрии.
- [0019] В определенных случаях пролиферация была выявлена с использованием проточной цитометрии. В определенных случаях пролиферация была выявлена путем измерения экспрессии Ki67. В определенных случаях пролиферация была выявлена в образце, полученном по меньшей мере через 7 суток после введения слитой молекулы ВКД CD80.
- [0020] В определенных случаях образец представляет собой образец крови. В определенных случаях образец представляет собой образец плазмы крови.
- [0021] В определенных случаях центральные Т-клетки памяти представляют собой CD95+ и CD28+ клетки. В определенных случаях центральные Т-клетки памяти представляют собой CD4+ центральные Т-клетки памяти. В определенных случаях центральные Т-клетки памяти представляют собой CD8+ центральные Т-клетки памяти. В определенных случаях центральные Т-клетки памяти представляют собой CD4+ и CD8+ центральные Т-клетки памяти.
- [0022] В определенных случаях образец, полученный после введения слитой молекулы ВКД CD80, получен по меньшей мере через одну неделю после введения. В определенных случаях образец, полученный после введения слитой молекулы ВКД CD80, получен по меньшей мере через две недели после введения. В определенных случаях образец, полученный после введения слитой молекулы ВКД CD80, получен по меньшей мере через один месяц после введения.
- [0023] В определенных случаях полипептид ВКД CD80 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5. В определенных случаях полипептид ВКД CD80 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3. В определенных случаях полипептид ВКД CD80 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4.
- [0024] В определенных случаях Fc-домен IgG1 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.
- [0025] В определенных случаях слитая молекула ВКД CD80 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20. В определенных случаях слитая молекула ВКД CD80 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21.
- [0026] В определенных случаях слитая молекула ВКД CD80 содержит 10-60 молекул сиаловой кислоты (СК). В определенных случаях слитая молекула ВКД CD80 содержит 15-40 молекул СК. В определенных случаях слитая молекула ВКД CD80 содержит 15-25 молекул СК. В определенных случаях слитая молекула ВКД CD80 содержит 15-30 молекул СК.
- [0027] В определенных случаях рак представляет собой солидную опухоль. В определенных случаях рак выбран из группы, состоящей из рака толстой и прямой кишки, рака молочной железы, рака желудка, немелкоклеточного рака легкого, меланомы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи,

рака яичников, рака поджелудочной железы, почечно-клеточной карциномы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака мочевого пузыря и рака эндометрия. В определенных случаях рак является рецидивирующим или прогрессирующим после терапии, выбранной из группы, состоящей из хирургии, химиотерапии, лучевой терапии и их комбинации.

- [0028]** В определенных случаях слитую молекулу ВКД CD80 вводят в комбинации с ингибитором запрограммированной смерти клетки 1 (PD-1) / ингибитором лиганда 1 запрограммированной смерти клетки (PD-L1). В определенных случаях ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой антитело. В определенных случаях ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой анти-PD-1 антитело. В определенных случаях анти-PD-1 антитело содержит CDR тяжелой цепи и легкой цепи ниволумаба, пидилизумаба или пембролизумаба. В определенных случаях анти-PD-1 антитело включает переменные области тяжелой цепи и легкой цепи ниволумаба, пидилизумаба или пембролизумаба. В определенных случаях анти-PD-1 антитело представляет собой ниволумаб, пидилизумаб или пембролизумаб. В определенных случаях ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой анти-PD-L1 антитело. В определенных случаях анти-PD-L1 антитело включает CDR тяжелой цепи и легкой цепи авелумаба, дурвалумаба, атезолизумаба или BMS-936559. В определенных случаях анти-PD-L1 антитело включает переменные области тяжелой цепи и легкой цепи авелумаба, дурвалумаба, атезолизумаба или BMS-936559. В определенных случаях анти-PD-L1 антитело представляет собой авелумаб, дурвалумаб, атезолизумаб или BMS-936559. В определенных случаях ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой слитую молекулу PD-1. В определенных случаях слитая молекула представляет собой AMP-224. В определенных случаях ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой AUR-012.
- [0029]** В определенных случаях слитая молекула ВКД CD80 вводят в комбинации с противораковой вакциной. В определенных случаях противораковая вакцина представляет собой индивидуальную противораковую вакцину. В определенных случаях слитую молекулу ВКД CD80 и противораковую вакцину вводят одновременно или последовательно.
- [0030]** Настоящее описание охватывает способы лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, которые включают введение внеклеточного домена (ВКД) CD80 или слитой молекулы ВКД CD80, при этом ВКД CD80 или слитую молекулу ВКД CD80 вводят в количестве, эффективном для повышения у субъекта количества центральных Т-клеток памяти. В некоторых вариантах реализации количество центральных Т-клеток памяти повышено в течение по меньшей мере одной недели, в течение по меньшей мере двух недель или в течение по меньшей мере одного месяца. В некоторых вариантах реализации количество центральных Т-клеток памяти определяют в образце крови или плазмы субъекта. В некоторых вариантах реализации центральные Т-клетки памяти представляют собой CD95+ и CD28+ клетки. Настоящее описание также охватывает способы лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, которые включают: (а) введение субъекту внеклеточного домена (ВКД) CD80 или слитой молекулы ВКД CD80; и (б) определение концентрации центральных Т-клеток памяти в образце, полученном от субъекта после введения ВКД CD80 или слитой молекулы ВКД CD80. В некоторых вариантах реализации способы дополнительно включают определение концентрации центральных Т-клеток памяти в образце, полученном от субъекта перед введением ВКД CD80 или слитой молекулы ВКД CD80. В некоторых вариантах реализации способы дополнительно включают повышение дозы или частоты применения ВКД CD80 или слитой

молекулы ВКД CD80, вводимых субъекту, при условии, что концентрация центральных Т-клеток памяти в образце, полученном после введения, не больше концентрации центральных Т-клеток памяти в образце, полученном перед введением. В некоторых вариантах реализации образец для определения концентрации центральных Т-клеток памяти представляет собой образец крови или плазмы. В некоторых вариантах реализации центральные Т-клетки памяти представляют собой CD95+ и CD28+ клетки.

- [0031] Настоящее описание также охватывает способы повышения количества центральных Т-клеток памяти у нуждающегося в этом субъекта, которые включают введение внеклеточного домена (ВКД) CD80 или слитой молекулы ВКД CD80, причем CD80 ВКД или слитую молекулу ВКД CD80 вводят в количестве, эффективном для повышения количества центральных Т-клеток памяти у субъекта. В некоторых вариантах реализации количество центральных Т-клеток памяти повышено в течение по меньшей мере одной недели, в течение по меньшей мере двух недель или в течение по меньшей мере одного месяца. В некоторых вариантах реализации количество центральных Т-клеток памяти определяют в образце крови или плазмы субъекта. В некоторых вариантах реализации центральные Т-клетки памяти представляют собой CD95+ и CD28+ клетки.
- [0032] Настоящее описание также охватывает способ повышения количества центральных Т-клеток памяти у нуждающегося в этом субъекта, который включает: (а) введение субъекту внеклеточного домена (ВКД) CD80 или слитой молекулы ВКД CD80; и (b) определение концентрации центральных Т-клеток памяти в образце, полученном от субъекта после введения ВКД CD80 или слитой молекулы ВКД CD80. В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает определение концентрации центральных Т-клеток памяти в образце, полученном от субъекта перед введением ВКД CD80 или слитой молекулы ВКД CD80. В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает повышение дозы или частоты применения вводимых субъекту ВКД CD80 или слитой молекулы ВКД CD80, при условии, что концентрация центральных Т-клеток памяти в образце, полученном после введения, не больше концентрации центральных Т-клеток памяти в образце, полученном перед введением. В некоторых вариантах реализации образец для определения концентрации центральных Т-клеток памяти представляет собой образец крови или плазмы. В некоторых вариантах реализации центральные Т-клетки памяти представляют собой CD95+ и CD28+ клетки.
- [0033] Настоящее описание также охватывает способы выявления центральных Т-клеток памяти у субъекта, например, у больного раком субъекта, причем способы включают, например, определение концентрации центральных Т-клеток памяти в образце, полученном от субъекта после введения субъекту ВКД CD80 или слитой молекулы ВКД CD80.
- [0034] В некоторых из вышеперечисленных способах вводят ВКД CD80. В других способах вводят слитую молекулу ВКД CD80. В любом случае, в некоторых вариантах реализации ВКД CD80 или часть ВКД CD80 слитой молекулы содержит аминокислотную последовательность, выбранную из (а) аминокислот от 35 до конца SEQ ID NO:1, (b) SEQ ID NO:3, (c) SEQ ID NO:4 и (d) SEQ ID NO:5.
- [0035] В некоторых вариантах реализации, в которых вводят слитую молекулу ВКД CD80, слитая молекула ВКД CD80 содержит партнера по слиянию, содержащего Fc-домен. В некоторых вариантах реализации Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1 человека. В некоторых вариантах реализации Fc-домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14. В

некоторых вариантах реализации слитая молекула ВКД CD80 содержит последовательность SEQ ID NO:20 или SEQ ID NO: 21.

[0036] В некоторых вариантах реализации вышеперечисленных способов ВКД CD80 содержит 10-60 моль сиаловой кислоты (СК) на моль белка, 15-40 моль СК на моль белка, 15-25 моль СК на моль белка или 15-30 моль СК на моль белка. В некоторых вариантах реализации слитая молекула ВКД CD80 включает 10-60 моль сиаловой кислоты (СК) на моль белка, 15-40 моль СК на моль белка, 15-25 моль СК на моль белка или 15-30 моль СК на моль белка.

[0037] В способах, предложенных в настоящем документе, в некоторых вариантах реализации ВКД CD80 или слитую молекулу ВКД CD80 вводят в комбинации с ингибитором запрограммированной смерти клетки 1 (PD-1) / ингибитором лиганда 1 запрограммированной смерти клетки (PD-L1). В некоторых вариантах реализации ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой антитело. В некоторых вариантах реализации ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой анти-PD-1 антитело. В некоторых вариантах реализации анти-PD-1 антитело содержит CDR тяжелой цепи и легкой цепи ниволумаба, пидилизумаба или пембролизумаба. В некоторых вариантах реализации анти-PD-1 антитело содержит переменные области тяжелой цепи и легкой цепи ниволумаба, пидилизумаба или пембролизумаба. В некоторых вариантах реализации анти-PD-1 антитело представляет собой ниволумаб, пидилизумаб или пембролизумаб. В некоторых вариантах реализации ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой анти-PD-L1 антитело. В некоторых вариантах реализации анти-PD-L1 антитело содержит CDR тяжелой цепи и легкой цепи авелумаба, дурвалумаба, атезолизумаба или BMS-936559. В некоторых вариантах реализации анти-PD-L1 антитело содержит переменные области тяжелой цепи и легкой цепи авелумаба, дурвалумаба, атезолизумаба или BMS-936559. В некоторых вариантах реализации анти-PD-L1 антитело представляет собой авелумаб, дурвалумаб, атезолизумаб или BMS-936559. В некоторых вариантах реализации ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой слитую молекулу PD-1. В некоторых вариантах реализации слитая молекула представляет собой AMP-224. В некоторых вариантах реализации ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой AUR-012.

[0038] В некоторых вариантах реализации способов, предложенных в настоящем документе, субъект имеет рак, а рак у субъекта представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах реализации рак выбран из рака толстой и прямой кишки, рака молочной железы, рака желудка, немелкоклеточного рака легкого, меланомы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака яичников, рака поджелудочной железы, почечно-клеточной карциномы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака мочевого пузыря и рака эндометрия. В некоторых вариантах реализации рак является рецидивирующим или прогрессирующим после терапии, выбранной из хирургии, химиотерапии, лучевой терапии или их комбинации.

[0039] В некоторых вариантах реализации вышеперечисленных способов ВКД CD80 или слитую молекулу ВКД CD80 вводят в комбинации с противораковой вакциной. В некоторых вариантах реализации противораковая вакцина представляет собой индивидуальную противораковую вакцину. В некоторых вариантах реализации ВКД CD80 или слитую молекулу ВКД CD80 и противораковую вакцину вводят одновременно или последовательно.

[0040] Настоящее описание также охватывает композиции противораковой вакцины, которые содержат по меньшей мере опухолеспецифический антиген или опухолеассоциированный антиген, и

внеклеточный домен (ВКД) CD80 или слитую молекулу CD80-ВКД. В некоторых вариантах реализации композиции вакцины дополнительно содержат аутологичные иммунные клетки от субъекта, подлежащего лечению вакциной. В некоторых подобных вариантах реализации аутологичные иммунные клетки включают антигенпрезентирующие клетки.

- [0041] Следует понимать, что как приведенное выше общее описание, так и приведенное ниже подробное описание являются просто иллюстративными и пояснительными и не ограничивают пункты заявленной формулы. Заголовки разделов, используемые в настоящем документе, предназначены только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие заявленный предмет. Все ссылки, приведенные в данном документе, в том числе патентные заявки и публикаций, включены в данный документ путем ссылки во всей их полноте для любых целей.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

- [0042] На **Фиг. 1** показано, что наблюдается увеличение частоты встречаемости CD4+ центральных Т-клеток памяти (CD4+ T_{cm}) у яванских макаков после обработки ВКД-Fc CD80 человека (ВКД-Fc hCD80) при дозах 10 и 50 мг/кг, но не после обработки дозой 1 мг/кг или с контролем растворителя. Данные представлены в процентах (%) частоты встречаемости CD4+ центральных Т-клеток памяти перед введением дозы. Пунктирными вертикальными линиями обозначено время введения ВКД-Fc hCD80.
- [0043] На **Фиг. 2** показано изменение частоты встречаемости CD8+ центральных Т-клеток памяти (CD8+ T_{cm}) у яванских макаков после обработки 1, 10 или 50 мг/кг ВКД-Fc hCD80 или контролем растворителя. Данные представлены в процентах (%) частоты встречаемости CD8+ центральных Т-клеток памяти перед введением дозы. Пунктирными вертикальными линиями обозначено время введения ВКД-Fc hCD80.
- [0044] На **Фиг. 3** показано изменение в пролиферации (Ki67+) CD4+ центральных Т-клеток памяти после обработки 1, 10 или 50 мг/кг ВКД-Fc hCD80 или контролем растворителя. Данные представлены в процентах (%) средней частоты встречаемости CD4+ центральных Т-клеток памяти перед введением дозы. Пунктирными вертикальными линиями обозначено время введения ВКД-Fc hCD80. Максимальная частота встречаемости Ki67+ CD4+ T_{cm} наблюдалась через 7 суток после первой дозы.
- [0045] На **Фиг. 4** показано изменение в пролиферации (Ki67+) CD8+ центральных Т-клеток памяти после обработки 1, 10 или 50 мг/кг ВКД-Fc hCD80 или контролем растворителя. Данные представлены в процентах (%) средней частоты встречаемости CD8+ центральных Т-клеток памяти перед введением дозы и выражены в виде среднего значения +/- стандартное отклонение. Пунктирными вертикальными линиями обозначено время введения ВКД-Fc hCD80. Максимальная частота встречаемости Ki67+ CD8+ T_{cm} наблюдалась через 7 суток после второй дозы.

ОПИСАНИЕ КОНКРЕТНЫХ ВАРИАНТОВ РЕАЛИЗАЦИИ

Определения

- [0046] Если не указано иное, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, должны иметь значения, которые обычно понятны среднему специалисту в данной области техники. Кроме того, если иное не требуется по контексту, термины в единственном числе включают множественное число, а термины во множественном числе включают единственное число.
- [0047] В данной заявке применение «или» означает «и/или», если не указано иное. В контексте пункта патентной формулы, зависящего от другого зависимого пункта, использование "или" отсылает к более чем одному предыдущему независимому или зависимому пункту формулы изобретения только в качестве альтернативы. Кроме того, такие термины, как «элемент» или «компонент» охватывают как элементы, так и компоненты, содержащие одну единицу, и элементы и компоненты, которые содержат более одной субъединицы, если конкретно не указано иное.
- [0048] Используемые в соответствии с настоящим изобретением следующие термины, если не указано иное, следует понимать как имеющие следующие значения:
- [0049] Термины «**полипептид**» и «**белок**» используются взаимозаменяемо для обозначения полимера аминокислотных остатков и не ограничены минимальной длиной. Такие полимеры аминокислотных остатков могут содержать природные или не встречающиеся в природе аминокислотные остатки и включают, но без ограничения этим, пептиды, олигопептиды, димеры, тримеры и мультимеры аминокислотных остатков. В это определение включены как полноразмерные белки, так и их фрагменты. Эти термины также включают пост-экспрессионные модификации полипептида, например, гликозилирование, сиамирование, ацетилирование, фосфорилирование и тому подобное. Кроме того, для целей настоящего изобретения, «полипептид» относится к белку, который содержит модификации, такие как делеции, добавления и замены (обычно консервативные по природе), в нативной последовательности, при условии, что белок сохраняет желаемую активность. Эти модификации могут быть преднамеренными, например, путем сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, например, в результате мутаций организмов-хозяев, которые вырабатывают белки, или ошибок вследствие ПЦР-амплификации.
- [0050] «**Слитая молекула**» в контексте данного документа обозначает молекулу, состоящую из двух или более различных молекул, которые не встречаются вместе в природе, ковалентно или нековалентно связанных с образованием новой молекулы. Например, слитые молекулы могут состоять из полипептида и полимера, такого как ПЭГ, или из двух различных полипептидов. «**Слитый белок**» обозначает слитую молекулу, состоящую из двух или более полипептидов, которые в природе в одной молекуле не встречаются.
- [0051] «**Внеклеточный домен CD80**» или «**ВКД CD80**» обозначает полипептид внеклеточного домена CD80 человека, в том числе его природные и рекомбинантные варианты. «**Слитая молекула ВКД CD80**» обозначает молекулу, содержащую ВКД CD80 и партнера по слиянию, такого как Fc-домен, альбумин или ПЭГ. Партнер по слиянию может быть ковалентно присоединен, например, к N- или C-концу ВКД CD80 или во внутреннем положении

- [0052] В контексте данного документа термин «**центральные Т-клетки памяти**» или «**Tcm**» обозначает Т-клетки, в том числе CD4+ или CD8+ Т-клетки, которые определены как CD95+ и CD28+, CD95+ и CD27+ или как CD95+, CD28+ и CD27+.
- [0053] Термины «**белок запрограммированной смерти клетки 1**» и аббревиатуры «**PD-1**» и «**PD1**» обозначают полноразмерный, зрелый белок PD-1 человека, который представляет собой иммуноингибирующий рецептор, который относится к семейству CD28.
- [0054] Термины «**лиганд 1 запрограммированной смерти клетки 1**» и «**PD-L1**» (PD-L1; гомолог-1 B7; B7-H1; или CD274) и «**лиганд 2 запрограммированной смерти клетки**» (PD-L2; B7-DC; или CD273) соответствуют двум лигандам поверхностных гликопротеинов для PD-1, которые снижают активацию Т-клеток и секрецию цитокинов после связывания с PD-1. Термин «PD-L1» в контексте данного документа обозначает полноразмерный, зрелый PD-L1 человека, если не указано иное.
- [0055] Термин «**иммуностимулирующее средство**» в контексте данного документа обозначает молекулу, которая стимулирует иммунную систему путем либо действия в качестве агониста иммуностимулирующей молекулы, в том числе костимулирующей молекулы, либо действия в качестве антагониста иммуноингибирующей молекулы, в том числе коингибирующей молекулы. Иммуностимулирующее средство может быть биопрепаратом, таким как антитело или фрагмент антитела, иным белком или вакциной или может быть низкомолекулярным лекарственным средством. «**Иммуностимулирующая молекула**» включает рецептор или лиганд, которые действуют для повышения, стимулирования, индуцирования или «включения» иммунного ответа иным образом. Иммуностимулирующие молекулы в контексте данного документа включают костимулирующие молекулы. «**Иммуноингибирующая молекула**» включает рецептор или лиганд, которые действуют для снижения, ингибирования, супрессирования или «выключения» иммунного ответа иным образом. Иммуноингибирующие молекулы в контексте данного документа включают коингибирующие молекулы. Такие иммуностимулирующие и иммуноингибирующие молекулы могут представлять собой, например, рецепторы или лиганды, обнаруживаемые на иммунных клетках, таких как Т-клетки, или обнаруживаемые на клетках, вовлеченных в естественный иммунитет, таких как естественные клетки-киллеры.
- [0056] Термин «**ингибитор PD-1/PD-L1**» обозначает компонент, который нарушает сигнальный путь PD-1/PD-L1. В некоторых вариантах реализации ингибитор ингибирует сигнальный путь PD-1/PD-L1 путем связывания с PD-1 и/или PD-L1. В некоторых вариантах реализации ингибитор также связывается с PD-L2. В некоторых вариантах реализации ингибитор PD-1/PD-L1 блокирует связывание PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2. Неограничивающие примеры ингибиторов PD-1/PD-L1 включают антитела, которые связываются с PD-1; антитела, которые связываются с PD-L1; слитые белки, такие как AMP-224; и полипептиды, такие как AUR-012.
- [0057] Термин «**антитело, которое ингибирует PD-1**» обозначает антитело, которое связывается с PD-1 или связывается с PD-L1 и таким образом ингибирует передачу сигнала PD-1 и/или PD-L1. В некоторых вариантах реализации антитело, которое ингибирует PD-1, связывается с PD-1 и блокирует связывание PD-L1 и/или PD-L2 с PD-1. В некоторых вариантах реализации антитело, которое ингибирует PD-1, связывается с PD-L1 и блокирует связывание PD-1 с PD-L1. Антитело, которое ингибирует PD-1, которое связывается с PD-L1, может называться анти-PD-L1 антителом.

Антитело, которое ингибирует PD-1, которое связывается с PD-1, может называться анти-PD-1 антителом.

- [0058] Со ссылкой на ВКД CD80 и слитые молекулы ВКД CD80, термин «**блокирует связывание**» лиганда, а также его грамматические варианты, обозначают возможность ингибировать взаимодействие между CD80 и лигандом CD80, таким как CD28, CTLA4 или PD-L1. Подобное ингибирование может происходить через любой механизм, в том числе с помощью ВКД CD80 или слитых молекул ВКД CD80, конкурирующих за связывание с лигандами CD80.
- [0059] Со ссылкой на анти-PD-1 антитела и PD-1-слитые молекулы или пептиды, термин «**блокирует связывание**» лиганда, такого как PD-L1, а также его грамматические варианты, применяют для обозначения возможности ингибировать взаимодействие между PD-1 и лигандом PD-1, таким как PD-L1. Подобное ингибирование может происходить с помощью любого механизма, в том числе прямого препятствия связыванию лиганда, например, за счет перекрывающихся сайтов связывания на PD-1 и/или конформационных изменений в PD-1, индуцированных антителом, которые изменяют аффинность лиганда и т. д., или, в случае слитой молекулы или пептида PD-1 путем конкурентного связывания за связывание с лигандом PD-1.
- [0060] «**Аффинность**» или «**аффинность связывания**» относятся к силе суммарного количества нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (*например*, полипептидом) и ее партнером по связыванию (*например*, лигандом). В некоторых вариантах реализации «аффинность связывания» обозначает аффинность собственного связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (*например*, полипептид и лиганд). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y обычно может быть представлена константой диссоциации (K_d).
- [0061] Термин «**антитело**» в контексте данного документа относится к молекуле, содержащей по меньшей мере определяющую комплементарность область (CDR) 1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и по меньшей мере CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, причем эта молекула способна связываться с антигеном. Термин антитело включает, но без ограничения ими, фрагменты, которые способны связывать антиген, такие как Fv, одноцепочечные Fv (scFv), Fab, Fab' и (Fab')₂. Термин антитело также включает, но без ограничения ими, химерные антитела, гуманизированные антитела и антитела различных видов, таких как мышь, человек, яванский макак и т. д.
- [0062] В некоторых вариантах реализации антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. В некоторых вариантах реализации антитело содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи и по меньшей мере часть константной области тяжелой цепи, и по меньшей мере одну легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи и по меньшей мере часть константной области легкой цепи. В некоторых вариантах реализации антитело содержит две тяжелые цепи, причем каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи и по меньшей мере часть константной области тяжелой цепи, и две легкие цепи, причем каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи и по меньшей мере часть константной области легкой цепи. В контексте данного документа считается, что одноцепочечный Fv (scFv) или любое другое антитело, которое содержит, например, одну полипептидную цепь, содержащую все шесть CDR (три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи), имеет тяжелую цепь и легкую цепь. В некоторых подобных вариантах

реализации тяжелая цепь представляет собой область антитела, которая содержит три CDR тяжелой цепи, а легкая цепь представляет собой область антитела, которая содержит три CDR легкой цепи.

- [0063] Термин «**вариабельная область тяжелой цепи**» относится к области, содержащей HVR1 тяжелой цепи, каркасную область (FR) 2, HVR2, FR3 и HVR3. В некоторых вариантах реализации вариабельная область тяжелой цепи также содержит по меньшей мере часть FR1 и/или по меньшей мере часть FR4.
- [0064] Термин «**константная область тяжелой цепи**» относится к области, содержащей по меньшей мере три константных домена тяжелой цепи, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Неограничивающие примеры константных областей тяжелой цепи включают γ , δ и α . Неограничивающие примеры константных областей тяжелой цепи также включают ϵ и μ . Каждая константная область тяжелой цепи соответствует изотипу антитела. Например, антитело, содержащее константную область γ , представляет собой антитело IgG, антитело, содержащее константную область δ , представляет собой антитело IgD и антитело, содержащее константную область α , представляет собой антитело IgA. Кроме того, антитело, содержащее константную область μ , представляет собой антитело IgM, и антитело, содержащее константную область ϵ , представляет собой антитело IgE. Определенные изотипы могут быть дополнительно подразделены на подклассы. Например, антитела IgG включают, но без ограничения этим, антитела IgG1 (содержащие константную область γ_1), IgG2 (содержащие константную область γ_2), IgG3 (содержащие константную область γ_3) и IgG4 (содержащие константную область γ_4); антитела IgA включают, но без ограничения этим, антитела IgA1 (содержащие константную область α_1) и антитела IgA2 (содержащие константную область α_2); и антитела IgM включают, но без ограничения этим, IgM1 и IgM2.
- [0065] Термин «**тяжелая цепь**» относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере вариабельную область тяжелой цепи с лидерной последовательностью или без нее. В некоторых вариантах реализации тяжелая цепь содержит по меньшей мере часть константной области тяжелой цепи. Термин «**полноразмерная тяжелая цепь**» относится к полипептиду, содержащему вариабельную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, с лидерной последовательностью или без нее.
- [0066] Термин «**вариабельная область легкой цепи**» относится к области, содержащей HVR1 легкой цепи, каркасную область (FR) 2, HVR2, FR3 и HVR3. В некоторых вариантах реализации вариабельная область легкой цепи также содержит FR1 и/или FR4.
- [0067] Термин «**константная область легкой цепи**» относится к области, содержащей константный домен легкой цепи C_L . Неограничивающие примеры константных областей легкой цепи также содержат λ и κ .
- [0068] Термин «**легкая цепь**» относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере вариабельную область легкой цепи с лидерной последовательностью или без нее. В некоторых вариантах реализации легкая цепь содержит по меньшей мере часть константной области легкой цепи. Термин «**полноразмерная легкая цепь**» относится к полипептиду, содержащему вариабельную область легкой цепи и константную область легкой цепи, с лидерной последовательностью или без нее.
- [0069] Термин «**гипервариабельная область**» или «**HVR**» обозначает каждую из областей вариабельного домена антитела, являющихся гипервариабельными по последовательности и/или образующих структурно определенные петли («гипервариабельные петли»). Как правило, нативные

четырёхцепочечные антитела содержат шесть HVR: три в V_H (H1, H2, H3) и три в (L1, L2, L3). HVR обычно содержат аминокислотные остатки из гипервариабельных петель и/или из «**определяющих комплементарность областей**» («**CDR**»), причем последние характеризуются высочайшей вариабельностью последовательности и/или участвуют в распознавании антигенов. Примеры гипервариабельных петель соответствуют аминокислотным остаткам 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3). (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987).) Примеры CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) соответствуют аминокислотным остаткам 24-34 L1, 50-56 L2, 89-97 L3, 31-35B H1, 50-65 H2 и 95-102 H3. (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Термины гипервариабельные области (HVR) и определяющие комплементарность области (CDR) обозначают части вариабельной области, которые образуют антигенсвязывающие области.

- [0070] «**Химерное антитело**» в контексте данного документа относится к антителу, содержащему по меньшей мере одну вариабельную область первого вида (например, мыши, крысы, яванского макака и т. д.) и по меньшей мере одну константную область второго вида (например, человека, яванского макака и т. д.). В некоторых вариантах реализации химерное антитело содержит по меньшей мере одну вариабельную область мыши и по меньшей мере одну константную область человека. В некоторых вариантах реализации химерное антитело содержит по меньшей мере одну вариабельную область яванского макака и по меньшей мере константную область человека. В некоторых вариантах реализации химерное антитело содержит по меньшей мере одну вариабельную область мыши и по меньшей мере одну константную область мыши. В некоторых вариантах реализации все вариабельные области химерного антитела относятся к первому виду, а все константные области химерного антитела относятся ко второму виду.
- [0071] Термин «**гуманизированное антитело**» в контексте данного документа относится к антителу, в котором по меньшей мере одна аминокислота в каркасной области нечеловеческой вариабельной области была заменена соответствующей аминокислотой из вариабельной области человека. В некоторых вариантах реализации гуманизированное антитело содержит по меньшей мере одну человеческую константную область или ее фрагмент. В некоторых вариантах реализации гуманизированное антитело представляет собой Fab, scFv, (Fab')₂, и т.д.
- [0072] «**Антитело человека**» в контексте данного документа относится к антителам, полученным от людей, антителам, вырабатываемым у отличных от человека животных, которые содержат гены иммуноглобулина человека, таких как XenoMouse®, и антителам, отобраным с помощью *in vitro* способов, например, фагового дисплея, причем в основе репертуара антител лежат последовательности иммуноглобулина человека.
- [0073] Термин «**лидерная последовательность**» относится к последовательности аминокислотных остатков, расположенных в N-конце полипептида, которая облегчает секрецию полипептида из клетки млекопитающего. Лидерная последовательность может быть расщеплена при экспорте полипептида из клетки млекопитающего с образованием зрелого белка. Лидерные последовательности могут быть природными или синтетическими, и они могут быть гетерологичным или гомологичными белку, к которому они присоединены. Неограничивающие примеры лидерных последовательностей также содержат лидерные последовательности из

гетерологичных белков. В некоторых вариантах реализации лидерная последовательность в антители отсутствует. В некоторых вариантах реализации антители содержит по меньшей мере одну лидерную последовательность, которая может быть выбрана из нативных лидерных последовательностей антителя и гетерологичных лидерных последовательностей.

- [0074] Термин «выделенный» в контексте данного документа относится к молекуле, которая была отделена по меньшей мере от некоторых компонентов, с которыми он обычно встречается в природе. Например, полипептид называется «выделенным», когда он отделен по меньшей мере от некоторых компонентов клетки, в которой он был получен. В случае, когда полипептид секретируется клеткой после экспрессии, физическое отделение супернатанта, содержащего полипептид, от клетки, которая его вырабатывает, считается «выделением» полипептида. Аналогичным образом, полинуклеотид называется «выделенным», если он не является частью большего полинуклеотида (такого как, например, геномная ДНК или митохондриальная ДНК, в случае полинуклеотида ДНК), в котором он обычно встречается в природе, или если он отделен от по меньшей мере некоторых из компонентов клетки, в которой он был получен, например, в случае полинуклеотида РНК. Таким образом, полинуклеотид ДНК, который содержится в векторе внутри клетки-хозяина, может называться «выделенным» при условии, что полинуклеотид не встречается в этом векторе в природе.
- [0075] Термин «снижаться» или «снижается» применительно к такому параметру, как объем опухоли, означает снижение уровня этого параметра наблюдаемым, измеримым образом. В некоторых вариантах реализации снижение может быть статистически значимым по сравнению с альтернативным лечением или контролем.
- [0076] Термин «увеличиваться» или «повышаться» применительно к такому параметру, как тип клетки, например, тип Т-клетки, означает увеличение концентрации (то есть повышение или пролиферацию в количестве в определенной области, например, в образце опухоли или в объеме крови или плазмы). В некоторых вариантах реализации повышение может быть статистически значимым по сравнению с альтернативным лечением или контролем.
- [0077] Термины «субъект» и «пациент» используют в данном документе взаимозаменяемо для обозначения человека. В некоторых вариантах реализации также предлагаются способы лечения других млекопитающих, в том числе, но без ограничения этим, грызунов, обезьян, кошачьих, собачьих, лошадиных, крупного рогатого скота, свиных, овечьих, козьих, млекопитающих лабораторных животных, млекопитающих сельскохозяйственных животных, млекопитающих спортивных животных, а также млекопитающих домашних животных.
- [0078] Термины «резистентный» или «нераагирующий», употребляемые в контексте лечения терапевтическим средством, означает, что субъект демонстрирует пониженную реакцию или отсутствие реакции на стандартную дозу терапевтического средства по сравнению с реакцией субъекта на стандартную дозу терапевтического средства в прошлом, или по сравнению с ожидаемой реакцией аналогичного субъекта с аналогичным расстройством на стандартную дозу терапевтического средства. Таким образом, в некоторых вариантах реализации субъект может быть резистентным к терапевтическому средству, хотя субъект ранее не принимал терапевтическое средство, или у субъекта может развиваться резистентность к терапевтическому средству после положительной реакции на это средство в одном или нескольких предыдущих случаях.

- [0079] Термин «образец» в контексте данного документа относится к композиции, полученной от субъекта, которая содержит клеточный и/или другой молекулярный компонент, который необходимо исследовать, измерить количественно и/или идентифицировать, например, на основе физических, биохимических, химических и/или физиологических характеристик. Пример образца представляет собой образец ткани.
- [0080] Термин «образец ткани» относится к сбору подобных клеток, полученных из ткани субъекта. Источник образца ткани может представлять собой твердую ткань, например, свежий, замороженный и/или законсервированный орган или образец ткани, или биопсию, или аспират; кровь или любую составляющую часть крови; жидкости тела, такие как спинно-мозговая жидкость, амниотическая жидкость, жидкость брюшной полости, синовиальная жидкость или тканевая жидкость; клетки в любой момент созревания или развития субъекта. В некоторых вариантах реализации образец ткани представляет собой образец ткани, полученный с помощью биопсии синовиальной оболочки, и/или образец синовиальной жидкости. В некоторых вариантах реализации образец ткани представляет собой образец синовиальной жидкости. Образец ткани также может представлять собой первичные или культивируемые клетки или клеточные линии. Необязательно, образец ткани получают из ткани/органа, пораженных заболеванием. Образец ткани может содержать соединения, которые естественным образом не смешаны с тканью в природе, такие как консерванты, антикоагулянты, буферы, фиксаторы, питательные вещества, антибиотики и тому подобное. «Контрольный образец» или «контрольная ткань» в контексте данного документа относится к образцу, клетке или ткани, полученным из источника, который, как известно или как предполагается, не поражен заболеванием, лечение которого проводят у субъекта.
- [0081] Для целей данного изобретения «срез» образца ткани означает часть или кусок образца ткани, например, тонкий срез ткани или клетки, вырезанные из образца солидной ткани.
- [0082] Термин «рак» применяют в данном документе для обозначения группы клеток, которые демонстрируют аномально высокие уровни пролиферации и роста. Рак может быть доброкачественным (также называемым доброкачественной опухолью), предраковым или злокачественным. Раковые клетки могут представлять собой клетки солидного рака (т. е. «солидной опухоли») или могут быть гематологическими (например, лимфомными или лейкозными) раковыми клетками. Термин «рост рака» применяют в данном документе для обозначения пролиферации или роста клетки или клеток, из которых состоит рак, что приводит к соответствующему увеличению размера или степени рака.
- [0083] Примеры рака включают, но без ограничения этим, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные неограничивающие примеры таких видов рака включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, рак гипофиза, рак пищевода, астроцитому, саркому мягких тканей, немелкоклеточный рак легкого (в том числе плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого), аденокарциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак толстой и прямой кишок, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки, почечно-клеточную карциному, рак печени, рак предстательной железы, рак влагалища, рак щитовидной железы, карциному печени, рак головного

мозга, рак эндометрия, рак яичка, холангиокарциному, рак желчного пузыря, рак желудка, меланому и различные типы рака головы и шеи (в том числе плоскоклеточную карциному головы и шеи).

[0084] «**Лечение**» в контексте данного документа обозначает терапевтическое лечение, например, при котором целью является снижение степени тяжести или замедление прогрессирования целевого патологического состояния или расстройства, а также, например, при котором целью является ингибирование рецидива состояния или расстройства. В определенных вариантах реализации термин «**лечение**» охватывает любое введение или применение терапевтического средства в случае заболевания у пациента и включает ингибирование или замедление заболевания или прогрессирования заболевания; частичное или полное купирование заболевания, например, с помощью инициации регрессии, восстановления или исправления утерянной, отсутствующей или нарушенной функции; стимулирования неэффективного процесса; или выведения заболевания на плато для того, чтобы добиться снижения степени тяжести. Термин «**лечение**» также включает снижение степени тяжести любой фенотипической характеристики и/или снижение распространенности, степени или вероятности этой характеристики. Те, кто нуждается в лечении, включают тех, кто уже имеет расстройства, а также тех, кто подвержен риску повторного появления расстройства, или тех, у кого необходимо предотвратить или замедлить повторное появление расстройства.

[0085] Термин «**эффективность**» в контексте данного документа может быть определен по одному или более параметрам, таким как выживаемость или безрецидивная выживаемость за такой период времени, как 1 год, 5 лет или 10 лет, а также по таким параметрам, как снижение роста одной или более опухолей у субъекта. На эффективность также могут влиять фармакокинетические параметры, такие как биологическая доступность, и базовые параметры, такие как скорость клиренса. Таким образом, «повышенная эффективность» (т. е. улучшение эффективности) может быть связана с улучшенными фармакокинетическими параметрами, а также с улучшенной активностью, и может быть измерена путем сравнения скорости клиренса и роста опухоли у исследуемых животных или у субъектов-людей, а также такими параметрами, как выживаемость, уровень рецидивов или безрецидивная выживаемость.

[0086] Термин «**эффективное количество**» или «**терапевтически эффективное количество**» относится к количеству лекарственного средства, эффективному для лечения у субъекта заболевания или расстройства. В определенных вариантах реализации эффективное количество относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата. Терапевтически эффективное количество ВКД CD80 или слитой молекулы ВКД CD80 может изменяться в зависимости от факторов, таких как течение заболевания, возраст, пол и масса индивида, и способности лекарственного средства вызывать у индивида желаемую реакцию. Терапевтически эффективное количество включает количество, при котором любые токсичные или вредные эффекты лекарственного средства перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами. В некоторых вариантах реализации выражение «**эффективное количество**» обозначает количество лекарственного средства, которое является эффективным для лечения рака.

- [0087] Введение «в комбинации с» одним или более дополнительными терапевтическими средствами, такими как иммуностимулирующее средство или противораковая вакцина, включает одновременное (совместное) и поочередное (последовательное) введение в любом порядке.
- [0088] «**Фармацевтически приемлемый носитель**» обозначает нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал, вспомогательный состав или носитель, общепринятый в данной области техники для применения с терапевтическим средством, что вместе составляет «**фармацевтическую композицию**» для введения субъекту. Фармацевтически приемлемый носитель нетоксичен для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и совместим с другими ингредиентами состава. Фармацевтически приемлемый носитель соответствует применяемому составу. Например, если терапевтическое средство должно быть введено перорально, носитель может представлять собой желатиновую капсулу. Если терапевтическое средство должно быть введено подкожно, носитель, в идеале, не раздражает кожу и не вызывает реакции в месте введения препарата.
- [0089] Термин «**антиген**» используют для обозначения химического соединения, такого как полипептид, который специфически распознается антителом. В контексте данного документа «**опухолеспецифический антиген**» обозначает антиген, экспрессируемый в значительных количествах только клетками опухоли, например, мутантный полипептидный антиген, соответствующий белку, мутированному в клетках опухоли. В контексте данного документа «**опухолеассоциированный антиген**» обозначает антиген, соответствующий полипептиду, который сверхэкспрессируется клетками опухоли и который может также экспрессироваться нормальными клетками той же или другой ткани.
- [0090] Термин «**противораковая вакцина**» в контексте данного документа обозначает композицию для лечения, которую вводят для стимуляции специфического иммунного ответа против опухолевых антигенов. В некоторых вариантах реализации противораковая вакцина может содержать опухолеспецифические и/или опухолеассоциированные антигены или клетки, презентующие опухолеспецифические и/или опухолеассоциированные антигены, с тем чтобы стимулировать иммунный ответ против таких антигенов. Подобная композиция вакцины также может содержать другие средства, которые стимулируют иммунный ответ, такие как иммуностимулирующие средства.
- [0091] Термин «**индивидуальная противораковая вакцина**» или «**индивидуальная вакцина**» обозначает противораковую вакцину, которая содержит клетки или антигены, взятые от пациента, который подлежит лечению, и, необязательно, размноженные или амплифицированные *ex vivo* перед повторным введением пациенту. Например, индивидуальная противораковая вакцина может содержать опухолеспецифические антигены, полученные от пациента, или может содержать иммунные клетки или другие гемопоэтические клетки, которые получили от пациента и обеспечили возможность их пролиферации *ex vivo*.

Примеры внеклеточного домена CD80 и слитых молекул внеклеточного домена

- [0092] В данном документе предлагаются способы лечения рака с помощью ВКД CD80 или слитых молекул ВКД CD80, а также противораковые вакцины, содержащие ВКД CD80 или слитые молекулы ВКД CD80. ВКД CD80, например, могут включать изоформу 1, изоформу 2 и изоформу 3

ВКД CD80 человека (смотрите SEQ ID NO: 1-3). В некоторых вариантах реализации ВКД CD80 могут содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5.

- [0093] Слитые молекулы ВКД CD80 могут содержать партнеров по слиянию, таких как полимеры, полипептиды, липофильные компоненты и сукцинильные группы. Примеры полипептидных партнеров по слиянию включают, но без ограничения этим, сывороточный альбумин и Fc-домен IgG. Дополнительные примеры полимерных партнеров по слиянию включают, но без ограничения этим, полиэтиленгликоль, в том числе полиэтиленгликоли, имеющие разветвленные и/или линейные цепи. Аминокислотные последовательности определенных типовых Fc-доменов показаны в SEQ ID NO: 9-16 в данном документе.
- [0094] В определенных вариантах реализации в ВКД CD80 или слитой молекуле ВКД CD80 отсутствует сигнальный пептид. В определенных вариантах реализации ВКД CD80 или слитая молекула ВКД CD80 содержат, по меньшей мере, сигнальный пептид, который может быть выбран из нативного сигнального пептида CD80 (SEQ ID NO: 7 или аминокислоты 1-34 SEQ ID NO:1) и/или гетерологичного сигнального пептида.
- [0095] В случае слитой молекулы ВКД CD80 партнер по слиянию может быть связан либо с аминоконцом, либо с карбокси-концом полипептида. В определенных вариантах реализации полипептид и партнер по слиянию ковалентно связаны. Если партнер по слиянию также представляет собой полипептид («полипептид-партнер по слиянию»), полипептид и полипептид-партнер по слиянию могут быть частью непрерывной аминокислотной последовательности. В подобных случаях, полипептид и полипептид-партнер по слиянию могут транслироваться в виде одного полипептида из кодирующей последовательности, которая кодирует и полипептид, и полипептид-партнер по слиянию. В некоторых подобных случаях два полипептида напрямую связаны в последовательности так, что N-конец одного полипептида следует непосредственно за C-концом другого без промежуточных аминокислот. В других случаях линкерная пептидная последовательность вставлена между двумя полипептидами, например, линкерная последовательность GS. В определенных вариантах реализации ВКД CD80 и партнер по слиянию ковалентно связаны иным образом, таким как, например, химическая связь, отличная от пептидной связи. В определенных вариантах реализации полипептид и партнер по слиянию связаны нековалентно. В определенных таких вариантах реализации они могут быть связаны, например, с помощью связывающихся пар. Примеры связывающихся пар включают, но без ограничения этим, биотин и авидин или стрептавидин, антитело и его антиген и т. д.
- [0096] В некоторых вариантах реализации слитая молекула ВКД CD80 содержит последовательность SEQ ID NO: 20 или 21.
- [0097] Слитые молекулы ВКД CD80 могут, в зависимости от того, как они получены, иметь различные уровни конкретных модификаций гликозилирования. Например, слитая молекула ВКД CD80 может иметь различные концентрации остатков сиаловой кислоты по отношению к концентрации белка ВКД CD80. В некоторых вариантах реализации более высокое содержание сиаловой кислоты может иметь более продолжительное время клиренса из организма и, таким образом, увеличивает общую биодоступность.
- [0098] Для получения слитых молекул ВКД CD80 с различными уровнями сиалирования слитые молекулы ВКД CD80, полученные из клеточной культуры, можно фракционировать с

использованием, например, анионообменной хроматографии. В некоторых случаях слитые молекулы ВКД CD80 перед фракционированием можно подвергать одному или более начальным процессам очистки. Объединенные фракции могут быть дополнительно проанализированы с использованием анализа сиаловой кислоты на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с 4,5-метилendioкси-1,2-фенилендиамином дигидрохлоридом (DMB) для определения содержания сиаловой кислоты.

- [0099] В некоторых вариантах реализации содержание сиаловой кислоты в слитой молекуле ВКД CD80 составляет от 10 до 60 моль сиаловой кислоты (СК) на моль белка. В некоторых вариантах реализации содержание сиаловой кислоты в слитой молекуле ВКД CD80 составляет от 15 до 60 моль СК на моль белка. Например, в некоторых вариантах реализации содержание СК составляет 10-40 моль СК/моль белка, например, 15-30 моль СК/моль белка, например, 15-25 моль СК/моль белка, например, 20-40 моль СК/моль белка, например, 20-30 моль СК/моль белка, например, 30-40 моль СК/моль белка, например, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 моль СК/моль белка. В некоторых вариантах реализации содержание СК составляет по меньшей мере 15 моль СК/моль белка, например, по меньшей мере 20 моль СК/моль белка, по меньшей мере 25 моль СК/моль белка, по меньшей мере 30 моль СК/моль белка, по меньшей мере 35 моль СК/моль белка или по меньшей мере 40 моль СК/моль белка. В некоторых подобных вариантах реализации партнер по слиянию представляет собой Fc-домен, например, Fc-домен IgG1, IgG2 или IgG4 человека.
- [0100] В некоторых вариантах реализации содержание СК слитой молекулы ВКД CD80 увеличивается или поддерживается на относительно высоком уровне по сравнению с данными слитыми молекулами ВКД CD80. В некоторых вариантах реализации увеличение содержания СК, например, на 5, 10, 15, 20, 30, 40 или 50 моль СК на моль белка ВКД CD80, может привести к повышенной эффективности в по меньшей мере одной мышинной сингенной или ксенотрансплантатной модели опухоли. Например, в некоторых вариантах реализации рост опухоли в мышинной модели опухоли может быть дополнительно снижен на по меньшей мере 5%, 10%, 20%, 30%, 40% 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 98% при увеличении содержания СК, например, на 5, 10, 15, 20, 30, 40 или 50 моль СК на моль белка ВКД CD80.
- [0101] Например, в некоторых вариантах реализации Fc-слитая молекула ВКД CD80, например, слитая молекула, которая содержит Fc-домен IgG1 человека, содержащая от 10 до 60 моль СК/моль белка, способна по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 98% ингибировать рост опухолевых клеток по меньшей мере в мышинной сингенной или ксенотрансплантатной модели рака в течение периода времени, составляющего по меньшей мере десять суток, или по меньшей мере две недели, или по меньшей мере три недели, например, от десяти суток до двух недель или от двух до трех недель, после инокуляции опухолевыми клетками. В некоторых подобных вариантах реализации молекула содержит по меньшей мере 15 моль СК/моль белка, например, по меньшей мере 20 моль СК/моль белка или в диапазоне от 15 до 30, от 15 до 25 или от 20 до 30 моль СК/моль белка. В некоторых вариантах реализации мышинная модель представляет собой мышиную модель опухоли СТ26, МС38 или В16. В некоторых вариантах реализации мышам дают от одной до трех доз молекулы при от 0,3 до 3,0 мг/кг, например, при от 0,3 до 0,6 мг/кг, например, в течение периода времени, составляющего одну неделю, как только опухоли достигают минимального объема. В некоторых

вариантах реализации Fc-домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах реализации слитая молекула ВКД CD80 содержит последовательность SEQ ID NO: 20 или 21.

- [0102] В некоторых вариантах реализации Fc-слитая молекула ВКД CD80 снижает рост клеток опухоли CT26 у мышей в течение периода времени, составляющего по меньшей мере десять суток, или по меньшей мере две недели, или по меньшей мере три недели, например, от десяти суток до двух недель или от двух до трех недель после инокуляции, в большей степени, чем Fc-слитый белок ВКД CD80 с идентичной аминокислотной последовательностью, но более низким уровнем СК на моль белка. В некоторых вариантах реализации Fc-слитая молекула ВКД CD80 снижает рост опухолей CT26 у мышей в течение периода времени, составляющего по меньшей мере десять суток, или по меньшей мере две недели, например, в течение от десяти суток до двух недель или от двух до трех недель после инокуляции, в большей степени, чем анти-CTLA4 антитело, например, клон 9D9 анти-CTLA4 антитела. В некоторых подобных вариантах реализации Fc-молекулу ВКД CD80 дозируют от одного до трех раз при 0,3 мг/кг, 0,6 мг/кг или 3,0 мг/кг, тогда как анти-CTLA4 антитело дозируют то же самое количество раз при 1,5 или 10 мг/кг. В некоторых подобных вариантах реализации модель представляет собой мышиную модель опухоли CT26, MC38 или B16.

Примеры партнеров по слиянию на основе Fc-домена

- [0103] В некоторых вариантах реализации слитая молекула ВКД CD80 имеет в качестве партнера по слиянию Fc-домен. В некоторых вариантах реализации Fc-домен получают из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В некоторых вариантах реализации Fc-домен имеет последовательность дикого типа, например, последовательность IgG1 или IgG2 дикого типа человека (например, IgG2a). В других вариантах реализации Fc-домен представляет собой либо природный, либо сконструированный вариант. В некоторых вариантах реализации выбран Fc-домен, который изменяет взаимодействия Fc с одним или более Fc-гамма-рецепторами. В некоторых вариантах реализации выбран Fc-домен, который изменяет взаимодействия Fc с одним или более факторами комплемента. В некоторых вариантах реализации выбран Fc-домен, который изменяет взаимодействия Fc с одним или более Fc-гамма-рецепторами и который изменяет взаимодействия с одним или более факторами комплемента.
- [0104] В некоторых вариантах реализации Fc-домен содержит по меньшей мере одну точечную мутацию, как описано в WO 2014/144960. В некоторых вариантах реализации Fc-домен представляет собой Fc-домен человека с заменой в одной или более позициях E233, L234, L235, P238, D265, N297, A327, P329 или P331 (причем нумерация этих позиций соответствует EU-индексу, в соответствии с номенклатурой Кабата). В некоторых вариантах реализации Fc-домен представляет собой Fc-домен человека с мутацией L234, L235 и/или P331. В некоторых вариантах реализации Fc-домен представляет собой Fc-домен человека с заменами L234F, L235E и P331S. (Смотрите, например, SEQ ID NO:12.) В некоторых вариантах реализации Fc-домен имеет аминокислотную замену в позиции N297. (Смотрите, например, SEQ ID NO: 13.) В некоторых вариантах реализации Fc-домен содержит мутацию C237S. (Смотрите, например, SEQ ID NO: 9.)
- [0105] В некоторых вариантах реализации мутированный Fc-партнер по слиянию вызывает изменение взаимодействий Fc-слитой молекулы ВКД CD80 с одним или более Fc-гамма-рецепторами по

сравнению с таковыми слитой молекулы ВКД CD80 с той же аминокислотной последовательностью, за исключением мутаций Fc-домена. В отдельном варианте реализации Fc имеет пониженную аффинность к Fc-гамма-рецепторам, например, одному или более из FcRN, RI, RIIA, RIIB и RIII, по сравнению с Fc-доменом дикого типа. В некоторых вариантах реализации Fc имеет пониженную аффинность ко всем из FcRN, RI, RIIA, RIIB и RIII по сравнению с Fc-доменом дикого типа.

- [0106] В некоторых вариантах реализации мутированный Fc-партнер по слиянию вызывает изменение взаимодействий Fc-слитой молекулы ВКД CD80 с одним или более факторами комплемента, например, C1, C2, C3, C4, и их продуктами расщепления, например, C4a, C4b, C2a, C2b, C3a и C3b. В некоторых вариантах реализации мутированный Fc-партнер по слиянию вызывает изменение взаимодействий Fc-слитой молекулы ВКД CD80 с одним или более факторами комплемента по сравнению с таковыми слитой молекулы ВКД CD80 с той же аминокислотной последовательностью, за исключением мутаций Fc-домена.
- [0107] В некоторых вариантах реализации ВКД CD80 и партнер по слиянию, например, Fc-партнер по слиянию, напрямую связаны таким образом, что N- или C-концевая аминокислота Fc непосредственно предшествует или следует за N- или C-концевой аминокислотой последовательности ВКД CD80. (Смотрите, например, SEQ ID NO: 20 и 21) В других вариантах реализации ВКД CD80 и партнер по слиянию соединены с помощью линкерной молекулы, например, с помощью линкерной пептидной последовательности, например, с помощью линкерной последовательности GS.
- [0108] ВКД CD80 и слитые молекулы ВКД CD80 также могут включать CD80 и слитые молекулы ВКД CD80, описанные, например, в заявке на патент США № 15/340,238, поданной 1 ноября 2016 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Подгруппы центральных Т-клеток памяти и Т-клеток

- [0109] В организме может встречаться несколько различных типов или подгрупп Т-клеток. В тимусе вырабатываются наивные Т-клетки (T_n), имеющие специфическую эпитопную специфичность. После того, как наивные Т-клетки контактируют с соответствующим антигеном, они пролиферируют и дифференцируются в эффекторных клетки, которые могут перемещаться к местам воспаления. Например, после инфекции или вакцинации подавляющее большинство эффекторных Т-клеток умирает в результате апоптоза, в то время как небольшая фракция развивается в различные типы Т-клеток памяти, которые могут оставаться в тканях организма и которые могут помочь защититься от повторного инфицирования антигеном. В организме может сохраняться множество типов или подгрупп Т-клеток памяти. Они были определены частично на основании разных комбинаций маркеров поверхностных белков. Как отмечалось ранее, «центральные Т-клетки памяти» или «T_{cm}» представляют собой Т-клетки, в том числе CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетки, которые определяют как CD95⁺ и CD28⁺, CD95⁺ и CD27⁺ или как CD95⁺, CD28⁺ и CD27⁺. Подобные клетки охватывают по меньшей мере три дополнительные подгруппы Т-клеток памяти. Во-первых, T_{cm}, как определено в данном документе, охватывают тип Т-клеток памяти, которые могут появляться в начале дифференцировки из наивных Т-клеток (клеток T_n), называемых стволовыми центральными Т-клетками памяти (T_{scm}). T_{scm} сверхэкспрессируют CD95, а также

являются CD45RO⁻, CCR7⁺ и CD28⁺. Во-вторых, T_{scm} включают клетки, которые являются CD45RO⁺, CCR7⁺, CD95⁺ и CD28⁺, которые в другом месте данного документа могут называться T_{cm} или компонентом T_{cm}. В-третьих, T_{cm} могут включать подгруппу Т-клеток памяти, называемых «переходными» Т-клетками памяти (T_{im}), которые являются CD45⁺, CCR7⁻, CD95⁺ и CD28⁺. Все из этих T_{scm}, T_{cm} и T_{im} клеток являются CD95⁺/CD28⁺ и, таким образом, входят в объем T_{cm} в контексте данного документа. Более того, в некоторых вариантах реализации T_{cm} также могут экспрессировать CD62L.

- [0110] T_{scm}-клетки могут быть предшественницами некоторых или всех других типов Т-клеток памяти, в том числе других T_{cm}, T_{im}, а также эффекторных Т-клеток памяти (T_{em}) и терминальных эффекторных клеток памяти (T_{te}). T_{em} являются CD45RO⁺, CCR7⁻, CD28⁻ и CD95⁺, а T_{te} являются CD45RO⁻, CCR7⁻, CD28⁻ и CD95⁺. Кроме того, T_{em} не экспрессируют CD62L.
- [0111] T_{cm} могут быть обнаружены в тканях, например, лимфатических узлах, селезенке и крови, тогда как T_{em}, напротив, могут быть обнаружены, первоначально, в периферических нелимфоидных тканях, например, в легких, печени и кишечнике, но могут мигрировать в другие ткани, например, в лимфатические узлы.
- [0112] В некоторых вариантах реализации количество или концентрацию T_{cm} определяют, например, либо до, либо после введения пациенту ВКД CD80 или слитой молекулы ВКД CD80.

Терапевтические композиции и способы

Способы повышения количества центральных Т-клеток памяти и способы лечения рака

- [0113] В настоящем изобретении предлагаются, например, способы повышения количества центральных Т-клеток памяти (T_{cm}) у нуждающегося в этом пациента, которые включают введение внеклеточного домена (ВКД) CD80 человека или слитой молекулы ВКД CD80, причем ВКД CD80 или слитую молекулу ВКД CD80 вводят в количестве, эффективном для повышения количества T_{cm} у пациента. В некоторых вариантах реализации количество T_{cm} у пациента определяют путем анализа количества или концентрации T_{cm} в полученном от пациента образце крови или плазмы или в полученном от пациента образце пораженной ткани, например, образце опухоли. В подобных вариантах реализации увеличение или понижение количества T_{cm} у пациента основано на том, увеличивается или уменьшается количество или концентрация T_{cm} в исследуемом образце по сравнению с образцом, взятым в другой момент времени, например, перед введением. В некоторых вариантах реализации количество центральных Т-клеток памяти у пациента увеличено в течение по меньшей мере одной недели после введения, например, в течение по меньшей мере двух недель или в течение по меньшей мере одного месяца после введения.
- [0114] В настоящем изобретении также предлагаются способы повышения количества T_{cm} клеток у нуждающегося в этом пациента, которые включают: введение пациенту внеклеточного домена (ВКД) CD80 человека или слитой молекулы ВКД CD80 и определение концентрации центральных Т-клеток памяти в полученном от пациента образце после введения. В некоторых вариантах реализации концентрацию центральных Т-клеток памяти также определяют в образце, полученном перед введением. В некоторых вариантах реализации концентрации T_{cm} в образцах, полученных до или после введения, сравнивают, чтобы определить, увеличилась ли концентрация T_{cm} после

введения. В некоторых вариантах реализации при условии, что концентрация Тсм не увеличилась, вводят больше ВКД CD80 или слитой молекулы ВКД CD80. В некоторых вариантах реализации концентрацию Тсм измеряют в образце крови или плазмы, тогда как в других вариантах реализации ее измеряют в образце пораженной ткани, например, образце опухоли. В некоторых вариантах реализации концентрация центральных Т-клеток памяти в образцах, полученных от пациента, остается увеличенной по сравнению с уровнем до введения в течение по меньшей мере одной недели после введения, например, в течение по меньшей мере двух недель или в течение по меньшей мере одного месяца после введения.

[0115] В настоящем изобретении предлагаются, например, способы лечения рака у нуждающегося в этом пациента, которые включают введение внеклеточного домена (ВКД) CD80 человека или слитой молекулы ВКД CD80, в которых ВКД CD80 или слитую молекулу ВКД CD80 вводят в количестве, эффективном для повышения количества центральных Т-клеток памяти (Тсм) у пациента. В некоторых вариантах реализации количество Тсм у пациента определяют путем анализа количества или концентрации Тсм в полученном от пациента образце крови или плазмы или в полученном от пациента образце опухоли. В подобных вариантах реализации увеличение или понижение количества Тсм у пациента основано на том, увеличивается или уменьшается количество или концентрация Тсм в исследуемом образце по сравнению с образцом, взятым в другой момент времени, например, перед введением. В некоторых вариантах реализации количество центральных Т-клеток памяти у пациента увеличено в течение по меньшей мере одной недели после введения, например, в течение по меньшей мере двух недель или в течение по меньшей мере одного месяца после введения.

[0116] В настоящем изобретении также предлагаются способы лечения рака у нуждающегося в этом пациента, которые включают: введение субъекту внеклеточного домена (ВКД) CD80 человека или слитой молекулы ВКД CD80 и определение концентрации центральных Т-клеток памяти в образце после введения. В некоторых вариантах реализации концентрацию центральных Т-клеток памяти также определяют в образце, полученном перед введением. Настоящее изобретение также включает способы определения центральных Т-клеток памяти у субъекта, например, у больного раком субъекта, включающие, например, определение концентрации центральных Т-клеток памяти в образце, полученном от субъекта, до и/или после введения субъекту ВКД CD80 или слитой молекулы ВКД CD80. В некоторых вариантах реализации концентрации Тсм в образцах, полученных до или после введения, сравнивают, чтобы определить, увеличилась ли концентрация Тсм после введения. В некоторых вариантах реализации при условии, что концентрация Тсм не увеличилась, вводят больше ВКД CD80 или слитой молекулы ВКД CD80. В некоторых вариантах реализации концентрацию Тсм измеряют в образце крови или плазмы, тогда как в других вариантах реализации ее измеряют в образце опухоли. В некоторых вариантах реализации концентрация центральных Т-клеток памяти в образцах, полученных от пациента, остается увеличенной по сравнению с уровнем до введения в течение по меньшей мере одной недели после введения, например, в течение по меньшей мере двух недель или в течение по меньшей мере одного месяца после введения.

[0117] В некоторых вариантах реализации рак может быть доброкачественным (также называемым доброкачественной опухолью), предраковым или злокачественным. В некоторых вариантах

реализации рак может иметь не гематологическую форму рака или форму рака «солидной опухоли» или, в альтернативном варианте, рак может содержать гематологические раковые клетки (например, лимфомы или лейкоза). В некоторых вариантах реализации ВКД CD80 или слитая молекула ВКД CD80 являются эффективными для снижения роста рака у человека или животного или в мышинной сингенной или ксенотрансплантатной модели рака, который подлежит лечению. В некоторых вариантах реализации ВКД CD80 или слитая молекула ВКД CD80 являются эффективными для снижения объема опухоли, например, в мышинной сингенной или ксенотрансплантатной модели рака, который подлежит лечению. Изменения объема опухоли могут быть измерены, например, путем мониторинга размера (например, диаметра) и, необязательно, формы первичной опухоли у животного. Рост опухоли может быть измерен, например, как изменения в объеме опухоли с течением времени.

- [0118] Примеры конкретных типов рака, которые можно подвергать лечению, включают, но без ограничения этим, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные неограничивающие примеры таких видов рака включают, но без ограничения этим, плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, рак гипофиза, рак пищевода, астроцитому, саркому мягких тканей, немелкоклеточный рак легкого (в том числе плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого), аденокарциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак толстой и прямой кишок, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки, почечно-клеточную карциному, рак печени, рак предстательной железы, рак влагалища, рак щитовидной железы, карциному печени, рак головного мозга, рак эндометрия, рак яичка, холангиокарциному, карциному желчного пузыря, рак желудка, меланому и различные типы рака головы и шеи (в том числе плоскоклеточную карциному головы и шеи).
- [0119] В любом из приведенных выше вариантов реализации способа ВКД CD80 или слитая молекула ВКД CD80, вводимые субъекту, могут ингибировать рост опухоли в мышинной сингенной ксенотрансплантатной модели рака в течение периода времени, составляющего 1 неделю, 10 суток, 2 недели или 3 недели, например, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98%. В некоторых вариантах реализации слитая молекула ВКД CD80 может ингибировать рост опухоли в мышинной ксенотрансплантатной модели опухоли СТ26 по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% через две недели или через три недели после инокуляции. В некоторых подобных случаях слитая молекула может быть дозирована от одного до трех раз при от 0,3 до 3 мг/кг, например, при от 0,3 до 0,6 мг/кг. В любом из приведенных выше вариантов реализации способа введение ВКД CD80 или слитой молекулы ВКД CD80, вводимых субъекту, может снижать объем по меньшей мере одной опухоли у человека или животного по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по

меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98%, например, в течение периода времени, составляющего один месяц, два месяца, три месяца, шесть месяцев или один год. В некоторых случаях Fc-слитая молекула ВКД CD80 может приводить к полной регрессии опухоли в мышинной модели опухоли, например, модели СТ26, например, у значительной части исследуемых мышей, например, по меньшей мере у 40% или по меньшей мере у 50% мышей.

- [0120] В любых из этих способов ВКД CD80 или слитая молекула ВКД CD80 могут представлять собой Fc ВКД CD80, содержащий 10-60 моль СК на моль Fc-белка ВКД CD80, например, 15-60 моль СК/моль белка. В некоторых вариантах реализации содержание составляет 10-40 моль СК/моль белка, например, 15-40 моль СК/моль белка, например, 20-40 моль СК/моль белка, 20-30 моль СК/моль белка, 15-25 моль СК/моль белка, 15-30 моль СК на моль белка или 30-40 моль СК/моль белка. В некоторых вариантах реализации содержание СК составляет по меньшей мере 15, например, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35 или по меньшей мере 40 моль СК/моль белка. В некоторых вариантах реализации содержание СК составляет 15, 20, 25, 30, 35 или 40 моль СК/моль белка. В некоторых вариантах реализации Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1, IgG2 или IgG4 человека. В некоторых вариантах реализации Fc-домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах реализации слитая молекула содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20 или 21. Подобные ВКД CD80 и слитые молекулы ВКД CD80 описаны, например, в заявке на патент США № 15/340,238, поданной 1 ноября 2016 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Варианты комбинированного лечения иммуностимулирующими средствами, содержащими ингибиторы PD-1/PD-L1

- [0121] В некоторых вариантах реализации ВКД CD80 или слитую молекулу ВКД CD80 вводят в способах, описанных в данном документе, в комбинации с эффективным количеством по меньшей мере одного иммуностимулирующего средства. Иммуностимулирующие средства могут включать, например, низкомолекулярное лекарственное средство или биопрепарат. Примеры биологических иммуностимулирующих средств включают, но без ограничения этим, антитела, фрагменты антител, фрагменты полипептидов рецепторов или лигандов, например, которые блокируют связывание рецептор-лиганд, вакцины и цитокины.
- [0122] В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одно иммуностимулирующее средство включает агонист иммуностимулирующей молекулы, в том числе костимулирующей молекулы, тогда как в некоторых вариантах реализации по меньшей мере одно иммуностимулирующее средство включает антагонист иммуноингибирующей молекулы, в том числе коингибирующей молекулы. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одно иммуностимулирующее средство включает агонист иммуностимулирующей молекулы, в том числе костимулирующей молекулы, встречающейся на иммунных клетках, например, Т-клетках. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одно иммуностимулирующее средство включает антагонист иммуноингибирующей молекулы, в том числе коингибирующей молекулы, встречающейся на

иммунных клетках, например, Т-клетках. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одно иммуностимулирующее средство включает агонист иммуностимулирующей молекулы, в том числе костимулирующей молекулы, встречающейся на клетках, вовлеченных в естественный иммунитет, например, NK-клетках. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одно иммуностимулирующее средство включает антагонист иммуноингибирующей молекулы, в том числе коингибирующей молекулы, встречающейся на клетках, вовлеченных в естественный иммунитет, например, NK-клетках. В некоторых вариантах реализации комбинация повышает антиген-специфический ответ Т-клеток у получающего лечение субъекта и/или повышает ответ естественного иммунитета у субъекта. В некоторых вариантах реализации комбинация приводит к улучшенному противоопухолевому ответу в животной модели рака, например, сингенной или ксенотрансплантатной модели, по сравнению с введением отдельно либо ВКД CD80, либо слитой молекулы ВКД CD80, либо иммуностимулирующего средства. В некоторых вариантах реализации комбинация приводит к синергетическому ответу в животной модели рака, например, сингенной или ксенотрансплантатной модели, по сравнению с введением отдельно либо ВКД CD80, либо слитой молекулы ВКД CD80, либо иммуностимулирующего средства.

- [0123]** В любом из приведенных выше вариантов реализации способа комбинированной терапии комбинация ВКД CD80 или слитой молекулы ВКД CD80 с иммуностимулирующим средством, например, ингибитором PD-1/PD-L1, которую вводят субъекту, может ингибировать рост опухоли в мышинной сингенной или ксенотрансплантатной модели рака в течение периода времени, составляющего 1 неделю, 10 суток, 2 недели или 3 недели, например, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98%. В любом из приведенных выше вариантов реализации способа комбинированной терапии комбинация ВКД CD80 или слитой молекулы ВКД CD80 с иммуностимулирующим средством, например, ингибитором PD-1/PD-L1, которую вводят субъекту, может снижать объем по меньшей мере одной опухоли у субъекта или в животной модели по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%, например, в течение периода времени, составляющего один месяц, два месяца, три месяца, шесть месяцев или один год.
- [0124]** В любом из способов комбинированной терапии ВКД CD80 или слитая молекула ВКД CD80 могут представлять собой Fc ВКД CD80, содержащий 10-60 моль СК на моль Fc-белка ВКД CD80, например, 15-60 моль СК/моль белка. В некоторых вариантах реализации содержание составляет 10-40 моль СК/моль белка, например, 15-40 моль СК/моль белка, например, 20-40 моль СК/моль белка, 20-30 моль СК/моль белка, 15-25 моль СК/моль белка, 15-30 моль СК на моль белка или 30-40 моль СК/моль белка. В некоторых вариантах реализации содержание СК составляет по меньшей мере 15, например, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35 или по меньшей мере 40 моль СК/моль белка. В некоторых вариантах реализации содержание СК составляет 15, 20, 25, 30, 35 или 40 моль СК/моль белка. В некоторых вариантах реализации Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1, IgG2 или IgG4 человека. В некоторых вариантах

реализации Fc-домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах реализации слитая молекула содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20 или 21. В любом из приведенных в данном документе вариантов реализации комбинированной терапии ВКД CD80 или слитая молекула ВКД CD80 могут представлять собой, например, молекулу, описанную в заявке на патент США 15340238, поданной 1 ноября 2016 года.

- [0125] В определенных вариантах реализации иммуностимулирующее средство нацеливается на стимулирующую или ингибирующую молекулу, которая является членом суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF). Например, иммуностимулирующее средство может быть средством, которое нацеливается на другой член семейства B7 полипептидов (или специфически связывается с ним). Иммуностимулирующее средство может быть средством, которое специфически нацеливается на член семейства TNF мембраносвязанных лигандов или костимулирующее или коингибирующее рецепторное связывание члена семейства TNF. Примеры членов семейств TNF и TNFR, которые могут быть целями иммуностимулирующих средств, включают CD40 и CD40L, OX-40, OX-40L, GITR, GITRL, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137 (4-1BB), TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT β R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, лимфотоксин α /TNF β , TNFR2, TNF α , LT β R, лимфотоксин α 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY и NGFR.
- [0126] В некоторых вариантах реализации иммуностимулирующее средство может содержать (i) антагонист белка, который ингибирует активацию Т-клеток (например, ингибитор контрольных точек иммунного ответа), например, CTLA4 (например, анти-CTLA4 антитело, например, ервой (ипилидумаб) или тремелидумаб), LAG-3 (например, анти-LAG-3 антитело, например, BMS-986016 (WO10/19570, WO14/08218) или IMP-731 или IMP-321 (WO08/132601, WO09/44273), TIM3, галектин 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектин-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, B7-H3 (например, MGA271 (WO11/109400)), B7-H4, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1, TIM-4 и ILT4, и/или может содержать (ii) агонист белка, который стимулирует активацию Т-клеток, например, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137) (например, антитело-агонист против CD137, например, урелумаб или PF-05082566 (WO12/32433)), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40 (например, антитело-агонист против OX40, например, MEDI-6383, MEDI-6469 или MOXR0916 (RG7888; WO06/029879)), OX40L, GITRL, CD70, CD27 (например, агонистическое антитело против CD27, например, варлиумаб (CDX-1127)), CD40, CD40L, DR3 и CD28H. В некоторых вариантах реализации агонист белка, который стимулирует активацию Т-клеток, представляет собой антитело.
- [0127] В некоторых вариантах реализации иммуностимулирующее средство может включать средство, которое ингибирует или является антагонистом цитокина, который ингибирует активацию Т-клеток (например, IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF и другие иммуносупрессивные цитокины), и в некоторых вариантах реализации иммуностимулирующее средство может содержать средство, которое является агонистом цитокина, например, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 и IFN α (например, цитокин сам по себе), который стимулирует активацию Т-клеток. Ингибиторы TGF- β включают, например, GC1008, LY2157299, TEW7197 и IMC-TR1. В некоторых вариантах реализации иммуностимулирующие средства могут включать антагонист хемокина, например, CXCR2 (например, MK-7123), CXCR4 (например, AMD3100), CCR2 или CCR4 (могамулизумаб).

- [0128] В некоторых вариантах реализации иммуностимулирующее средство включает, по меньшей мере, агонист Toll-подобного рецептора, например, агонист TLR2/4 (например, бациллу Кальмета-Герена); агонист TLR7 (например, хилтонол или имиквимод); агонист TLR7/8 (например, резиквимод); или агонист TLR9 (например, CpG7909).
- [0129] В некоторых вариантах реализации иммуностимулирующие средства могут включать антагонисты ингибирующих рецепторов на NK-клетках или агонисты активирующих рецепторов на NK-клетках. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одно иммуностимулирующее средство представляет собой антагонист KIR, например, антитело лирилумаб.
- [0130] В некоторых вариантах реализации иммуностимулирующее средство может включать анти-GITR антитело-агонист, например, TRX-518 (WO06/105021, WO09/009116), МК-4166 (WO11/028683) или антитело против GITR, описанное в WO2015/031667.
- [0131] Иммуностимулирующие средства также могут включать средства, которые повышают презентирование опухолевого антигена, например, вакцину на основе дендритных клеток, клеточные вакцины с секрецией ГМКСФ (GM-CSF), олигонуклеотиды CpG и имиквимод, или варианты терапии, которые повышают иммуногенность клеток опухоли (например, антрациклины).
- [0132] Иммуностимулирующие средства также могут включать конкретные вакцины, например, мезотелин-направленные вакцины или аттенуированные противораковые вакцины на основе листерии, например, CRS-207.
- [0133] Иммуностимулирующие средства также могут включать средства, которые истощают или блокируют Treg-клетки, например, средства, которые специфически связываются с CD25.
- [0134] Иммуностимулирующие средства также могут включать средства, которые ингибируют метаболический фермент, например, индоламиндиоксигеназу (IDO), диоксигеназу, аргиназу или синтазу оксида азота. Антагонисты IDO включают, например, INCB-024360 (WO2006/122150, WO07/75598, WO08/36653, WO08/36642), индоксимод, NLG-919 (WO09/73620, WO09/1156652, WO11/56652, WO12/142237) и F001287.
- [0135] Иммуностимулирующие средства также могут включать средства, которые ингибируют образование аденозина или ингибируют рецептор аденозина A2A.
- [0136] Иммуностимулирующие средства также могут включать средства, которые обращают/предотвращают истощение T-клеток, и средства, которые запускают активацию естественного иммунитета и/или воспаление в месте опухоли.
- [0137] Комбинации вариантов лечения также могут быть дополнительно объединены в комбинаторном подходе, который нацелен на несколько элементов иммунного пути, например, одно или более из следующего: по меньшей мере одно средство, которое повышает презентирование опухолевого антигена (например, вакцина на основе дендритных клеток, клеточные вакцины с секрецией GM-CSF, олигонуклеотиды CpG, имиквимод); по меньшей мере одно средство, которое ингибирует отрицательную иммунную регуляцию, например, путем ингибирования пути CTLA4 и/или истощения или блокирования Treg или других иммуносупрессирующих клеток; терапия, которая стимулирует положительную иммунную регуляцию, например, агонистами, которые стимулируют путь CD-137 и/или OX-40 и/или стимулируют эффекторную функцию T-клеток; по меньшей мере одно средство, которое увеличивает частоту встречаемости противоопухолевых T-клеток в организме в целом; терапия, которая истощает или ингибирует Treg, например, Treg в опухоли,

например, с применением антагониста CD25 (например, даклизумаба) или с помощью ex vivo истощения с применением микрогранул, покрытых анти-CD25 антителом; по меньшей мере одно средство, которое влияет на функцию супрессорных миелоидных клеток в опухоли; терапия, которая повышает иммуногенность клеток опухоли (например, антрациклинами); перенос адоптивных Т-клеток или НК-клеток, в том числе генетически модифицированных клеток, например, клеток, модифицированных с помощью химерных антигенных рецепторов (терапия с CAR-T клетками); по меньшей мере одно средство, которое ингибирует метаболический фермент, например, индоламиндиоксигеназу (IDO), диоксигеназу, аргиназу или синтазу оксида азота; по меньшей мере одно средство, которое обращает/предотвращает анергию или истощение Т-клеток; терапия, которая запускает активацию естественного иммунитета и/или воспаление в месте опухоли; введение иммуностимулирующих цитокинов или блокирование иммуносупрессивных цитокинов.

- [0138] Например, по меньшей мере одно иммуностимулирующее средство может включать одно или более агонистических средств, которые лигируют положительные костимулирующие рецепторы; один или более антагонистов (блокирующих средств), которые ослабляют передачу сигнала через ингибирующие рецепторы, например, антагонистов, которые преодолевают различные пути иммуносупрессии в микроокружении опухоли; одно или более средств, которые увеличивают частоту встречаемости противоопухолевых иммунных клеток в организме в целом, например, Т-клеток, истощают или ингибируют Трег (например, путем ингибирования CD25); одно или более средств, которые ингибируют метаболические ферменты, например, IDO; одно или более средств, которые обращают/предотвращают анергию или истощение Т-клеток; и одно или более средств, которые запускают активацию естественного иммунитета и/или воспаление в местах опухоли.
- [0139] В некоторых вариантах реализации ВКД CD80 или слитую молекулу ВКД CD80 вводят в комбинации с эффективным количеством ингибитора PD-1/PD-L1.

Ингибиторы PD-1/PD-L1

- [0140] Ингибиторы PD-1/PD-L1 включают антитела, слитые белки и пептиды. Неограничивающий пример слитого белка, который является ингибитором PD-1/PD-L1, представляет собой AMP-224 (Amplimmune, GlaxoSmithKline). Неограничивающим примером полипептида, который является ингибитором PD-1/PD-L1, является AUR-012. Другие примеры ингибиторов PD-1/PD-L1 включают антитела, которые ингибируют PD-1, например, анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела. Подобные антитела могут быть гуманизированными антителами, химерными антителами, мышинными антителами и антителами человека.
- [0141] В некоторых вариантах реализации ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой анти-PD-L1 антитело, например, атезолизумаб (Tecentriq®), дурвалумаб, авелумаб или BMS-936559.
- [0142] В некоторых вариантах реализации ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой анти-PD-1 антитело. В одном варианте реализации анти-PD-1 антитело представляет собой ниволумаб. Ниволумаб (также известный как Opdivo®; ранее обозначаемый 5C4, BMS-936558, MDX-1106 или ONO-4538) представляет собой полностью человеческое IgG4 (S228P) антитело-ингибитор контрольных точек иммунного ответа к PD-1, которое селективно предотвращает взаимодействие с лигандами PD-1 (PD-L1 и PD-L2), таким образом блокируя снижение активности функций противоопухолевых Т-

клеток (патент США № 8008449; Wang *et al.*, 2014 *Cancer Immunol Res.* 2(9):846-56). В некоторых вариантах реализации ниволумаб вводят в дозе 3 мг/кг каждые 2 недели или при постоянной дозе 240 мг каждые 2 недели. В другом варианте реализации анти-PD-1 антитело представляет собой пембролизумаб. Пембролизумаб (также известный как Keytruda®, ранее ламбролизумаб и МК-3475) представляет собой гуманизированное моноклональное анти-PD-1 антитело IgG4.

Пембролизумаб описан, например, в патенте США № 8900587; *смотрите также* [www \(dot\) cancer \(dot\) gov \(slash\) drugdictionary?cdrid=695789](http://www(dot)cancer(dot)gov(slash)drugdictionary?cdrid=695789) (дата последнего обращения: 27 марта 2017 года).

Пембролизумаб был одобрен FDA для лечения рецидивирующей или рефрактерной меланомы.

Например, постоянная доза анти-PD-1 антитела пембролизумаба может составлять 200 мг. В некоторых вариантах реализации пембролизумаб можно вводить в дозе 200 мг каждые 3 недели. В других вариантах реализации анти-PD-1 антитело представляет собой MEDI0608 (ранее AMP-514).

MEDI0608 описан, например, в патенте США № 8,609,089, В2 или в [www \(dot\) cancer \(dot\) gov \(slash\) drugdictionary?cdrid=756047](http://www(dot)cancer(dot)gov(slash)drugdictionary?cdrid=756047) (дата последнего обращения 27 марта 2017 года). В некоторых вариантах реализации анти-PD-1 антитело представляет собой пидилизумаб (СТ-011), который является гуманизированным моноклональным антителом. Пидилизумаб описан в патенте США № 8,686,119 В2 или WO 2013/014668 А1.

Дополнительные варианты комбинированной терапии

- [0143] ВКД CD80 или слитые молекулы ВКД CD80 можно также применять до, по существу одновременно или после других режимов лечения, например, хирургии, химиотерапии, лучевой терапии или введения другого биопрепарата.
- [0144] Для лечения рака, например, ВКД CD80 или слитые молекулы ВКД CD80 можно вводить в сочетании с одним или более дополнительными противораковыми средствами, например, химиотерапевтическим средством, ингибирующим рост средством, антиангиогенным средством и/или противоопухолевой композицией. Неограничивающие примеры химиотерапевтического средства, ингибирующего рост средства, антиангиогенного средства, противоракового средства и противоопухолевой композиции, которые можно применять в комбинации с антителами по настоящему изобретению, приведены в следующих определениях.
- [0145] «Химиотерапевтическое средство» представляет собой химическое соединение, применимое при лечении рака. Примеры химиотерапевтических средств включают, но без ограничения этим, алкилирующие средства, например, тиотепу и циклофосфамид цитоксан®; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, в том числе алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилендиофосфорамид и триметилолмеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); камптотецин (в том числе синтетический аналог топотекана); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (в том числе его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (в том числе синтетические аналоги KW-2189 и СВ1-ТМ1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтаммина, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид,

урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как энединозные антибиотики (*например*, калихеамицин, особенно, калихеамицин гаммаII и калихеамицин омегаII (*смотрите, например*, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); динемидин, в том числе динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также хромофор неокарциноустин и родственные хромофоры хромопротеиновых эндеиновых антибиотиков), аклациномизины, актиномицин, автрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин адриаамицин® (в том числе морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидокорубицин), эпирубицин, эзрубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пурамицин, квеламицин, родорубицин, стрептоницин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циноустин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калуостерон, пропионат дромостанолона, эпитиостанол, мепитиостан, тестостерон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоклотеимид, митотан, трилостан; заместитель фолиевой кислоты, такой как фуролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидгликозид; аминоклевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бизантрин; эдатрексат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; эльфорнитин; эллиптиний ацетат; эпотионин; этоглоцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидайнин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; теназоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); циклофосфамид; тиотепу; таксоиды, например, таксол® (паклитаксел, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), абраксан® без кремофора, альбуминовые наноконструкции паклитаксела (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) и доксетаксел таксотер® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); хлоранбуцил; гемцитабин гемзар®; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин навелбин®; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин, кселоду; ибандронат; иринотекан (камптозар, СРТ-11); (включая схему лечения иринотеканом с 5-FU и лейковорином); ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; комбретаустин; лейковорин (LV); оксалиплатин, в том числе схему лечения оксалиплатином (FOLFOX); ингибиторы PKC-альфа, Raf, H-Ras, EGFR (*например*,

эрлотиниб (тарцева®)) и VEGF-A, которые уменьшают пролиферацию клеток, и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любого из вышеуказанных.

[0146] Дополнительные неограничивающие примеры химиотерапевтических средств включают антигормональные средства, которые действуют, чтобы регулировать или ингибировать воздействие гормонов на рак, например, анти-эстрогены и селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов (SERM), в том числе, например, тамоксифен (в том числе тамоксифен новалдекс®), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен фарестон®; ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, которая регулирует выработку эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклоротетимид, мегестрол ацетат мегаза®, экземестан аромазин®, форместан, фадрозол, ворозол ривизор®, летрозол фемара® и анастрозол аримидекс®; и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; а также троксацитабин (1,3-диоксолановый нуклеозидный аналог цитозина); антисмысловые олигонуклеотиды, особенно те, которые ингибируют экспрессию генов в сигнальных путях, участвующих в пролиферации аберрантных клеток, такие как, например, PKC-альфа, Ralf и H-Ras; рибозимы, такие как, например, ингибитор экспрессии VEGF (например, рибозим ангиозим®) и ингибитор экспрессии HER2; вакцины, например, вакцины для генной терапии, например, вакцина алловектин®, вакцина лейвектин® и вакцина ваксид®, rIL-2 пролейкин®, ингибитор топоизомеразы 1 лурботекан®, gmRN абареликс®; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленного.

[0147] «Антиангиогенное средство» или «ингибитор ангиогенеза» обозначает низкомолекулярное вещество, полинуклеотид (в том числе, например, ингибирующую РНК (РНКи или миРНК)), полипептид, выделенный белок, рекомбинантный белок, антитело или их конъюгаты или слитые белки, которые ингибируют ангиогенез, васкулогенез или нежелательную проницаемость сосудов, прямо или косвенно. Следует понимать, что антиангиогенное средство включает те средства, которые связывают и блокируют ангиогенную активность ангиогенного фактора или его рецептора. Например, антиангиогенное средство представляет собой антитело или другой антагонист к ангиогенному средству, например, антитела против VEGF-A (например, бевацизумаб (авастин®)) или против рецептора VEGF-A (например, рецептор KDR или рецептор Flt-1), анти-PDGFR ингибиторы например, гливек® (иматиниба мезилат), низкомолекулярные вещества, которые блокируют передачу сигнала рецептора VEGF (например, РТК787/ZK2284, SU6668, сутент®/SU11248 (малат сунитиниба), AMG706 или те, которые описаны, например, в международной заявке на патент WO 2004/113304). Антиангиогенные средства также включают нативные ингибиторы ангиогенеза, например, ангиостатин, эндостатин и т. д. Смотрите, например, Klagsbrun and D'Amore (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39; Streit and Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179 (например, таблицу 3 с перечнем вариантов антиангиогенной терапии при злокачественной меланоме); Ferrara & Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5(12):1359-1364; Tonini *et al.* (2003) *Oncogene* 22:6549-6556 (например, таблицу 2 с перечнем известных антиангиогенных факторов); и Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206 (например, таблицу 1 с перечнем антиангиогенных средств, применяемых в клинических испытаниях).

[0148] «Ингибирующее рост средство» в контексте данного документа обозначает соединение или композицию, которые ингибируют рост клетки (например, клетки, экспрессирующей VEGF) либо *in*

vitro, либо *in vivo*. Таким образом, ингибирующее рост средство может быть тем, которое значительно снижает процент клеток (например, клеток, экспрессирующих VEGF) в S фазе. Примеры ингибирующих рост средств включают, но без ограничения этим, средства, которые блокируют развитие клеточного цикла (на этапе, отличном от фазы S), например, средства, которые индуцируют прекращение G1 и прекращение M-фазы. Классические блокаторы M-фазы включают алкалоиды барвинка (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы топоизомеразы II, такие как доксорубин, эпирубицин, даунорубин, этопозид и блеомицин. Те средства, которые вызывают прекращение G1, также распространяются на прекращение фазы S, например, ДНК-алкилирующие средства, например, тамоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлорэтамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ара-С. Дополнительную информацию можно найти в Mendelsohn and Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, глава 1 под названием "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" авторства Murakami *et al.* (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), *например*, стр. 13. Таксаны (паклитаксел и доцетаксел) являются противораковыми лекарственными средствами, полученными из тисового дерева. Доцетаксел (Taxotere[®], Rhone-Poulenc Rorer), полученный из европейского тиса, является полусинтетическим аналогом паклитаксела (Taxol[®], Bristol-Myers Squibb). Паклитаксел и доцетаксел стимулируют сборку микротрубочек из димеров тубулина и стабилизируют микротрубочки путем предотвращения деполимеризации, что приводит к ингибированию митоза в клетках.

- [0149] Термин «ангиоэпителиальная композиция» обозначает композицию, применяемую при лечении рака, содержащую по меньшей мере одно активное терапевтическое средство. Примеры терапевтических средств включают, но без ограничения этим, *например*, химиотерапевтические средства, ингибирующие рост средства, цитотоксические средства, средства, применяемые в лучевой терапии, ангиогенные средства, другие противораковые иммунотерапевтические средства, отличные от ингибиторов PD-1/PD-L1, апоптотические средства, противотубулиновые средства и другие средства для лечения рака, например, анти-HER-2 антитела, анти-CD20 антитела, антагонист рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (*например*, ингибитор тирозинкиназы), ингибитор HER1/EGFR (*например*, эрлотиниб (тарцева[®]), ингибиторы тромбоцитарного фактора роста (*например*, гливек[®] (иматиниба мезилат)), ингибитор COX-2 (*например*, целекоксиб), интерфероны, ингибиторы CTLA-4 (*например*, анти-CTLA антитело ипилимумаб (ервой[®])), ингибиторы PD-L2 (*например*, анти-PD-L2 антитела), ингибиторы TIM3 (*например*, анти-TIM3 антитела), цитокины, антагонисты (*например*, нейтрализующие антитела), которые связываются с одной или более из следующих мишеней: ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-бета, BlyS, APRIL, BCMA, PD-L2, CTLA-4, TIM3 или рецептор(ы) VEGF, TRAIL/Apo2, и другие биоактивные и органические химические средства *и т.д.* Их комбинации также включены в изобретение.

Пути введения и носители

- [0150] В различных вариантах реализации полипептиды и слитые молекулы можно вводить *in vivo* различными путями, в том числе, но без ограничения этим, пероральным, внутриартериальным, парентеральным, интраназальным, внутривенным, внутримышечным, внутрисердечным, интравентрикулярным, интритрахиальным, буккальным, ректальным, внутрибрюшинным,

внутрикожным, местным, трансдермальным и интраэпителиальным, или иным путем с помощью имплантации или ингаляции. Рассматриваемые композиции могут быть приготовлены в виде препаратов в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной формах; в том числе, но без ограничения этим, таблеток, капсул, порошков, гранул, мазей, растворов, суппозиторий, клизм, инъекций, средств для ингаляции и аэрозолей. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, может быть нанесена на микрочастицы золота и доставлена внутрикожно с помощью устройства для бомбардировки частицами или «генной пушки», как описано в литературе (смотрите, например, Tang et al., *Nature* 356:152-154 (1992)). Соответствующий состав и путь введения могут быть выбраны в соответствии с предполагаемым применением.

- [0151] В различных вариантах реализации, содержащие полипептиды композиции обеспечивают в составах с широким рядом фармацевтически приемлемых носителей (смотрите, например, Gennaro, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus*, 20th ed. (2003); Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe et al., *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)). Доступны различные фармацевтически приемлемые носители, в том числе растворители, вспомогательные вещества и разбавители. Кроме того, также доступны различные фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, например, регулирующие pH и буферные средства, средства, регулирующие тоничность, стабилизаторы, смачивающие средства и тому подобные. Неограничивающие примеры носителей включают солевой раствор, забуференный солевой раствор, декстрозу, воду, глицерин, этанол и их комбинации.
- [0152] В различных вариантах реализации композиции, содержащие полипептиды и слитые молекулы, могут быть составлены для инъекции, в том числе для подкожного введения, с помощью растворения, суспендирования или эмульгирования их в водном или неводном растворителе, например, растительном или ином масле, синтетических глицеридах алифатических кислот, сложных эфирах высших алифатических кислот или пропиленгликоле; и, если является желательным, с обычными добавками, например, солюбилизаторами, изотоническими средствами, суспендирующими средствами, эмульгирующими средствами, стабилизаторами и консервантами. В различных вариантах реализации композиции могут быть приготовлены для ингаляции, например, с использованием приемлемых пропеллентов под давлением, например, дихлордифторметана, пропана, азота и подобного. Композиции могут быть также составлены, в различных вариантах реализации, в микрокапсулах с пролонгированным высвобождением, например, с биоразлагаемыми или не биоразлагаемыми полимерами. Неограничивающий пример биоразлагаемого состава включает сополимер молочной и гликолевой кислот. Неограничивающий пример не биоразлагаемого состава включает сложный эфир полиглицерина и жирной кислоты. Некоторые способы получения подобных составов описаны, например, в EP 1 125 584 A1.
- [0153] Помимо этого, также предлагаются фармацевтические упаковки и наборы, содержащие один или более контейнеров, каждый из которых содержит одну или более доз полипептида или комбинации полипептидов. В некоторых вариантах реализации предлагается единичная дозировка, причем единичная дозировка содержит заданное количество композиции, содержащей полипептид или комбинацию полипептидов, с одним или более дополнительными средствами или без них. В некоторых вариантах реализации подобная единичная дозировка предоставлена в одноразовом

предварительно заполненном шприце для инъекции. В различных вариантах реализации композиция, содержащаяся в единичной дозировке, может содержать физиологический раствор, сахарозу или тому подобное; буфер, например фосфат или тому подобное; и/или быть составленной в пределах стабильного и эффективного диапазона pH. В альтернативном варианте, в некоторых вариантах реализации композиция может быть предоставлена в виде лиофилизированного порошка, который может быть восстановлен при добавлении соответствующей жидкости, например, стерильной воды. В некоторых вариантах реализации композиция содержит одно или более веществ, которые ингибируют агрегацию белка, в том числе, но без ограничения этим, сахарозу и аргинин. В некоторых вариантах реализации композиция по изобретению содержит гепарин и/или протеогликан.

- [0154] Фармацевтические композиции вводят в количестве, эффективном для лечения или профилактики конкретных показаний. Терапевтически эффективное количество, как правило, зависит от массы субъекта, которого лечат, его или ее физического состояния или состояния здоровья, обширности состояния, подлежащего лечению, или возраста субъекта, которого лечат.

ВКД CD80 и слитые молекулы ВКД в комбинации с противораковыми вакцинами или в качестве их компонентов

- [0155] Настоящее описание также включает способы введения ВКД CD80 или слитой молекулы ВКД CD80 в комбинации с композицией противораковой вакцины, содержащей по меньшей мере один опухолеспецифический или опухолеассоциированный антиген. В описании также предлагаются композиции противораковой вакцины, которые содержат ВКД CD80 или слитую молекулу ВКД CD80 и по меньшей мере один опухолеспецифический или опухолеассоциированный антиген. В любой ситуации (независимо от того, вводится ли ВКД CD80 или слитая молекула ВКД CD80 отдельно или являются компонентом противораковой вакцины) противораковая вакцина может быть индивидуальной противораковой вакциной.
- [0156] В некоторых вариантах реализации опухолеспецифический или опухолеассоциированный антиген может быть антигеном, обычно встречающимся в связи с опухолью. В некоторых вариантах реализации опухолеспецифический или опухолеассоциированный антиген может быть антигеном, встречающимся в опухоли конкретного пациента, который был, например, получен или амплифицирован *ex vivo*, а затем повторно введен в виде вакцины. В некоторых вариантах реализации антиген может быть обеспечен на поверхности иммунных клеток, например, антигенпрезентирующих клеток, которые затем вводят пациенту.
- [0157] В настоящем описании также предлагаются ВКД CD80 или слитый белок ВКД CD80 в качестве компонента композиции противораковой вакцины. Например, композиция противораковой вакцины может содержать опухолеспецифический или опухолеассоциированный антиген в комбинации с ВКД CD80 или слитым белком ВКД CD80.
- [0158] В подобных композициях и способах на основе вакцин ВКД CD80 или слитый белок ВКД CD80 могут быть способны изменять подгруппы Т-клеток памяти у пациента, которому вводят вакцину.

[0159] Примеры, обсуждаемые ниже, предназначены только для иллюстрации изобретения и не должны рассматриваться в качестве ограничения изобретения каким-либо образом. Примеры не подразумевают того, что эксперименты, приведенные ниже, представляют собой все или единственные проведенные эксперименты. Были предприняты усилия, чтобы обеспечить точность в отношении используемых чисел (например, количества, температуры и т. д.), но должны учитываться некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части являются массовыми частями, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия, а давление равно или близко к атмосферному.

Пример 1: Влияние введения ВКД CD80-Fc на CD4+ и CD8+ центральные Т-клетки памяти у яванских макаков

- [0160] Исследование проводили на наивных яванских макаках (*Macaca fascicularis*) с применением ВКД CD80-Fc человека, состоящего из внеклеточного домена (ВКД) CD80 человека, связанного с Fc-доменом IgG1 человека дикого типа. ВКД CD80-Fc человека исследовали при 1 мг/кг, 10 мг/кг и 50 мг/кг, вводимых еженедельно в течение 4 недель.
- [0161] Шестнадцати обезьянам вводили носитель или ВКД CD80-Fc человека на 1, 8, 15 и 22 сутки. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных, 2 самок и 2 самцов. Одно животное каждого пола из каждой дозовой группы умерщвляли на 26 сутки. Оставшихся животных держали и наблюдали в течение периода восстановления после введения дозы, составлявшего шесть недель.
- [0162] Образцы цельной венозной крови отбирали в следующие моменты времени: два образца перед введением дозы с интервалом не менее одной недели, 24 часа после введения первой дозы на 2 сутки, 4 сутки, перед введением дозы на 8 сутки, перед введением дозы на 15 сутки и в дни запланированного вскрытия, 26 сутки и 64 сутки.
- [0163] Анализ на основе проточной цитометрии осуществляли на образцах цельной крови для оценки частоты встречаемости, активации и пролиферации Т-клеток (CD8+ Т-клеток и CD4+ Т-клеток), регуляторных Т-клеток (Treg), NK-клеток и репертуара подгруппы Т-клеток памяти (наивных, центральных клеток памяти и эффекторных клеток памяти).
- [0164] Лечение с помощью ВКД CD80-Fc человека не индуцировало явных изменений частоты встречаемости основных лимфоцитов (NK-клеток, В-клеток, общих CD4+ или CD8+ Т-клеток или Treg) в периферической крови яванских макаков. ВКД CD80-Fc человека индуцировал дозозависимую экспансию и пролиферацию подгрупп центральных Т-клеток памяти (Tcm). Экспансию CD4+ и CD8+ центральных Т-клеток памяти, экспрессирующих CD95 и CD28, наблюдали в группах, получавших дозу 10 и 50 мг/кг, но не в группе, получавшей дозу 1 мг/кг. Частота встречаемости в популяциях CD4+ и CD8+ центральных Т-клеток памяти продолжала увеличиваться после каждой дозы ВКД CD80-Fc человека и затем снижалась к концу исследования (Фиг. 1 и 2). Пролиферация CD4+ и CD8+ центральных Т-клеток памяти, которую измеряли с помощью экспрессии Ki67, также увеличивалась в группах, обработанных дозой 10 мг/кг и 50 мг/кг. Экспрессия Ki67 была максимальной в CD4+ Tcm через 7 суток после введения

первой дозы и в CD8+ Tcm через 7 суток после введения второй дозы; экспрессия Ki67 возвращалась к исходным уровням к концу исследования (Фиг. 3 и 4).

ТАБЛИЦА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

В приведенной ниже таблице приведен список определенных указанных в настоящем документе ссылок.

SEQ. ID. NO.	Описание	последовательности
1	Аминокислотная последовательность предшественника CD80 человека (с сигнальной последовательностью)	MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTK EVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMS GDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVL KYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFP TSPISDFEIP TSNIRRIIC STSGGFPEPHLSWLENGEELNAIN TTVSQDPETELYAVSSK LDFNM TTNH SFMCLIKYGH LRVNQTFNWN TTKQEHFPDN LLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRES VRPV
2	Аминокислотная последовательность предшественника CD80 мыши (с сигнальной последовательностью)	MACNCQLMQDTPLLKFPCPRLILLFVLLIRLSQVSSDVDEQL SKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKVVL SVIA GKLK VWP EYKNRTLYDN TTYSLIILGLVLSDRGTYSCVVQK KERGTYEVKHLALVKLSIKADFP TPNITESGNPSADTKRITC FASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISSQLD FNTTRNH TTIKCLIKYGD AHVSEDFTWEKPPEDPPDSKN T L VLF GAGFGAVITVVVIVV IIKCFCKHRSCFRRNEASRET NNS LTFGP EEALAEQTVFL
3	Изоформа 2 CD80 человека (без сигнальной последовательности)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRIYWQKEKKMVL TMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYE CVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFP TSPISDFEIP TSNIRRIIC RRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAIN TTVSQDPETELYA VSSK LDFNM TTNH SFMCLIKYGH LRVNQTFNWN T SFAPRC RERRRNERLRRESVRPV
4	Изоформа 3	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRIYWQKEKKMVL TMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYE

	CD80 человека (без сигнальной последовательности)	CVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVSKGFAPRCRERRRNERLR RESVRPV
5	Последовательность ВКД CD80 человека (без сигнальной последовательности)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRIWQKEKKMV LTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTY ECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVSKADFPTPSISDFEIPSTN IRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELY AVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTKQE HFPDN
6	Последовательность ВКД CD80 мыши (без сигнальной последовательности)	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKVV LSVIAGKLVWPEYKNRTLYDNTTYSLILGLVLSDRGTYS VVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADT KRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTI SSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEKPPEDPPDS KN
7	Сигнальная последовательность CD80 человека	MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSG
8	Сигнальная последовательность CD80 мыши	MACNCQLMQDTPLLKFPCLLILFVLLIRLSQVSSD
9	C237S Fc	EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWFYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10	Fc	ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKTKGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

11	Fc	<p>ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTP VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK</p>
12	Fc IgG1 человека с мутациями L234F, L235E, P331S	<p>EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
13	Fc IgG1 человека с мутацией N297	<p>EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
14	Fc IgG1 человека	<p>EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
15	Fc IgG3 человека	<p>ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPP CPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSGDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNIFSCFSVMHEALHNRFYTKSLSLSPGK</p>
16	Fc IgG4 человека	<p>ESKYGPPCPPCPAPEFLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCTVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</p>

<p>17</p>	<p>БКД CD80 мыши, Fc IgG2a мыши (Fc-часть подчеркнута)</p>	<p>VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKV VLSVIAGKLVWPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRGTY SCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSA DTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPESEL YTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEKPPEDP PDSKNEPRGPTIKCPPCKCPAPNLLGGPSVVFPPKIKDVL <u>MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQT</u> <u>HREDYNSTLRVVSALPIQHODWMSGKEFKCKVNNKDLP</u> <u>PIERTISKPKGSVRAPOVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVD</u> <u>FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKL</u> <u>RVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK</u></p>
<p>18</p>	<p>БКД CD80 мыши, Fc IgG1 ДТ человека (Fc-часть подчеркнута)</p>	<p>VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKV VLSVIAGKLVWPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRGTY SCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSA DTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPESEL YTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEKPPEDP PDSKNEPKSSDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL <u>MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK</u> <u>PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP</u> <u>APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT</u> <u>VDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u></p>
<p>19</p>	<p>БКД CD80 мыши, Fc МТ IgG1 (234, 235, 331) (Fc- часть подчеркнута; мутации выделены жирным шрифтом)</p>	<p>VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKV VLSVIAGKLVWPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRGTY SCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSA DTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPESEL YTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEKPPEDP PDSKNEPKSSDKTHTCPPCAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL <u>MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK</u> <u>PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP</u> <u>ASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT</u> <u>VDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u></p>
<p>20</p>	<p>БКД CD80 человека, Fc IgG1 ДТ человека (Fc-часть подчеркнута)</p>	<p>VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRIYWQKEKMMV LTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTY ECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVKADFPTPSISDFEIPSTN IRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELY AVSSKLDNFNMTTNHFSMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTKQE HFPDNEPKSSDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL <u>MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK</u></p>

		<p><u>PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP</u> <u>APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLT</u> <u>VDKSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</u></p>
21	<p>БКД CD80 человека, Fc IgG1 MT L234F, L235E, P331S человека (Fc-часть подчеркнута; мутации выделены жирным шрифтом)</p>	<p>VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRIYWQKEKMMV LTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTY ECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVSKADFPTPSISDFEIPSTN IRRICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELY AVSSKLDNFMTTNHSFMCLIKYGHLLRVNQTFNWNNTKQE HFPDNEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL <u>MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK</u> <u>PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP</u> <u>ASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLT</u> <u>VDKSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</u></p>
22	<p>Предшественник PD-1 человека (с сигнальной последовательностью), UniProtKB/Swiss-Prot: Q15116.3, 01-ОCT-2014</p>	<p>MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL</p>
23	<p>PD-1 человека (зрелый, без сигнальной последовательности)</p>	<p>PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL</p>

24	Предшественник PD-L1 человека (с сигнальной последовательностью), UniProtKB/Swiss-Prot: Q9NZQ7.1, 01-ОCT-2014	MRIFAVFIFM TYWHLLNAFT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAELVIPELP LAHPPNERTH LVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET
25	PD-L1 человека (зрелый, без сигнальной последовательности)	FT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAELVIPELP LAHPPNERTH LVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

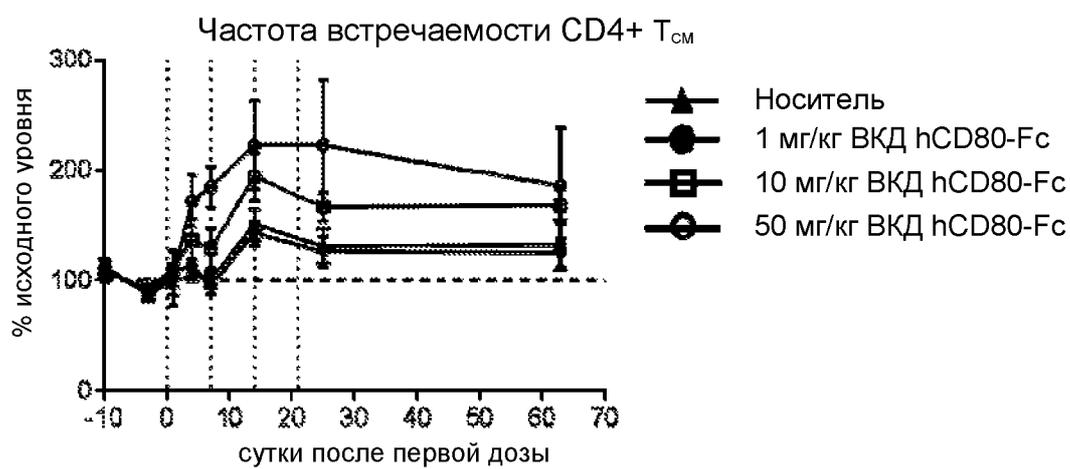
1. Способ определения активности слитой молекулы внеклеточного домена (ВКД) CD80 у субъекта, включающий определение частоты встречаемости центральных Т-клеток памяти и/или выявление пролиферации центральных Т-клеток памяти в образце, полученном от субъекта после введения субъекту слитой молекулы ВКД CD80, причем слитая молекула ВКД CD80 содержит полипептид ВКД CD80 человека и Fc-домен IgG1 человека.
2. Способ выявления частоты встречаемости и/или пролиферации центральных Т-клеток памяти у субъекта, включающий (а) получение образца от субъекта после того, как субъекту была введена слитая молекула ВКД CD80, и (b) определение частоты встречаемости центральных Т-клеток памяти и/или выявление пролиферации центральных Т-клеток памяти в образце, причем слитая молекула ВКД CD80 содержит полипептид ВКД CD80 человека и Fc-домен IgG1 человека.
3. Способ по п. 1 или 2, дополнительно включающий введение слитой молекулы ВКД CD80 субъекту после определения частоты встречаемости центральных Т-клеток памяти и/или выявления пролиферации центральных Т-клеток памяти в образце.
4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что субъект имеет рак.
5. Способ лечения рака у субъекта, включающий (а) введение субъекту слитой молекулы ВКД CD80, содержащей полипептид ВКД CD80 человека и Fc-домен IgG1 человека; и (b) определение частоты встречаемости центральных Т-клеток памяти и/или выявление пролиферации центральных Т-клеток памяти в образце, полученном от субъекта после введения.
6. Способ по п. 5, дополнительно включающий определение частоты встречаемости центральных Т-клеток памяти или выявление пролиферации центральных Т-клеток памяти в образце, полученном от субъекта перед введением слитой молекулы ВКД CD80.
7. Способ по любому из пп. 1-6, включающий определение частоты встречаемости центральных Т-клеток памяти, но не выявление пролиферации центральных Т-клеток памяти.
8. Способ по любому из пп. 1-6, включающий выявление пролиферации центральных Т-клеток памяти, но не определение частоты встречаемости центральных Т-клеток памяти.
9. Способ по любому из пп. 1-6, включающий определение частоты встречаемости центральных Т-клеток памяти и выявление пролиферации центральных Т-клеток памяти.

10. Способ по любому из пп. 1-7 и 9, отличающийся тем, что частоту встречаемости определяют с использованием проточной цитометрии.
11. Способ по любому из пп. 1-6, 8 и 9, отличающийся тем, что пролиферацию выявляют с использованием проточной цитометрии.
12. Способ по любому из пп. 1-6, 8, 9 и 11, отличающийся тем, что пролиферацию выявляют путем измерения экспрессии Ki67.
13. Способ по любому из пп. 1-6, 8, 9, 11 и 12, отличающийся тем, что пролиферацию выявляют в образце, полученном по меньшей мере через 7 суток после введения слитой молекулы ВКД CD80.
14. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту слитой молекулы ВКД CD80, содержащей полипептид ВКД CD80 человека и Fc-домен IgG1 человека, отличающийся тем, что (а) частота встречаемости Т-клеток памяти была определена в образце, полученном от субъекта перед введением, и/или (b) пролиферация Т-клеток памяти была выявлена в образце, полученном от субъекта перед введением.
15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что была определена частота встречаемости Т-клеток памяти, но пролиферация Т-клеток памяти выявлена не была.
16. Способ по п. 14, отличающийся тем, что была выявлена пролиферация Т-клеток памяти, но частота встречаемости Т-клеток памяти определена не была.
17. Способ по п. 14, отличающийся тем, что была определена частота встречаемости Т-клеток памяти и была выявлена пролиферация Т-клеток памяти.
18. Способ по любому из пп. 14, 15 и 17, отличающийся тем, что частота встречаемости была определена с использованием проточной цитометрии.
19. Способ по любому из пп. 14, 16 и 17, отличающийся тем, что пролиферация была выявлена с использованием проточной цитометрии.
20. Способ по любому из пп. 14, 16, 17 и 19, отличающийся тем, что пролиферация была выявлена путем измерения экспрессии Ki67.
21. Способ по любому из пп. 14, 16, 17, 19 и 20, отличающийся тем, что пролиферация была выявлена в образце, полученном по меньшей мере через 7 суток после введения слитой молекулы ВКД CD80.
22. Способ по любому из пп. 1-21, отличающийся тем, что образец является образцом крови.

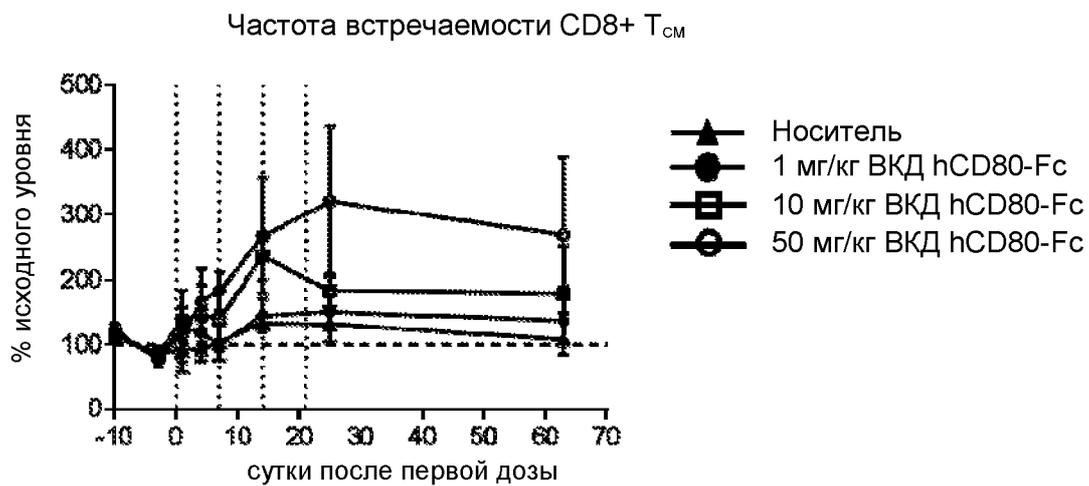
23. Способ по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что образец является образцом плазмы.
24. Способ по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что центральные Т-клетки памяти представляют собой CD95+ и CD28+ клетки.
25. Способ по любому из пп. 1-24, отличающийся тем, что центральные Т-клетки памяти представляют собой CD4+ центральные Т-клетки памяти.
26. Способ по любому из пп. 1-24, отличающийся тем, что центральные Т-клетки памяти представляют собой CD8+ центральные Т-клетки памяти.
27. Способ по любому из пп. 1-24, отличающийся тем, что центральные Т-клетки памяти представляют собой CD4+ и CD8+ центральные Т-клетки памяти.
28. Способ по любому из пп. 1-27, отличающийся тем, что образец, полученный после введения слитой молекулы ВКД CD80, получен по меньшей мере через одну неделю после введения.
29. Способ по любому из пп. 1-27, отличающийся тем, что образец, полученный после введения слитой молекулы ВКД CD80, получен по меньшей мере через две недели после введения.
30. Способ по любому из пп. 1-27, отличающийся тем, что образец, полученный после введения слитой молекулы ВКД CD80, получен по меньшей мере через один месяц после введения.
31. Способ по любому из пп. 1-30, отличающийся тем, что полипептид ВКД CD80 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5.
32. Способ по любому из пп. 1-30, отличающийся тем, что полипептид ВКД CD80 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3.
33. Способ по любому из пп. 1-30, отличающийся тем, что полипептид ВКД CD80 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4.
34. Способ по любому из пп. 1-33, отличающийся тем, что Fc-домен IgG1 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.
35. Способ по любому из пп. 1-30, отличающийся тем, что слитая молекула ВКД CD80 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.
36. Способ по любому из пп. 1-30, отличающийся тем, что слитая молекула ВКД CD80 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21.

37. Способ по любому из пп. 1-36, отличающийся тем, что слитая молекула ВКД CD80 содержит 10-60 молекул сиаловой кислоты (СК).
38. Способ по любому из пп. 1-36, отличающийся тем, что слитая молекула ВКД CD80 содержит 15-40 молекул СК.
39. Способ по любому из пп. 1-36, отличающийся тем, что слитая молекула ВКД CD80 содержит 15-25 молекул СК.
40. Способ по любому из пп. 1-36, отличающийся тем, что слитая молекула ВКД CD80 содержит 15-30 молекул СК.
41. Способ по любому из пп. 4-40, отличающийся тем, что рак представляет собой солидную опухоль.
42. Способ по любому из пп. 4-41, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из рака толстой и прямой кишки, рака молочной железы, рака желудка, немелкоклеточного рака легкого, меланомы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака яичника, рака поджелудочной железы, почечно-клеточной карциномы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака мочевого пузыря и рака эндометрия.
43. Способ по любому из пп. 4-42, отличающийся тем, что рак является рецидивирующим или прогрессирующим после терапии, выбранной из группы, состоящей из хирургии, химиотерапии, лучевой терапии и их комбинации.
44. Способ по любому из пп. 1-43, отличающийся тем, что слитую молекулу ВКД CD80 вводят в комбинации с ингибитором запрограммированной смерти клетки 1 (PD-1) / ингибитором лиганда 1 запрограммированной смерти клетки (PD-L1).
45. Способ по п. 44, отличающийся тем, что ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой антитело.
46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой анти-PD-1 антитело.
47. Способ по п. 46, отличающийся тем, что анти-PD-1 антитело содержит CDR тяжелой цепи и легкой цепи ниволумаба, пидилизумаба или пембролизумаба.
48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что анти-PD-1 антитело содержит переменные области тяжелой цепи и легкой цепи ниволумаба, пидилизумаба или пембролизумаба.

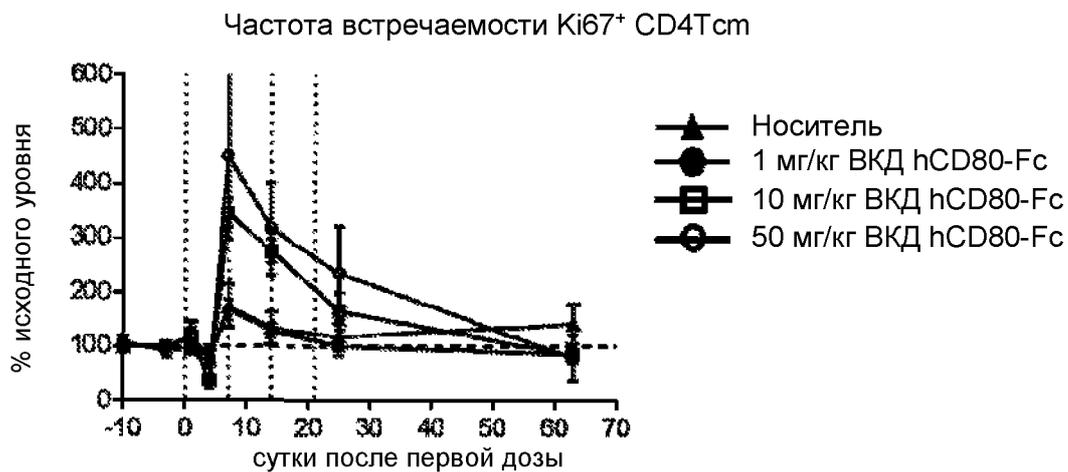
49. Способ по п. 48, отличающийся тем, что анти-PD-1 антитело представляет собой ниволумаб, пидилизумаб или пембролизумаб.
50. Способ по п. 45, отличающийся тем, что ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой анти-PD-L1 антитело.
51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что анти-PD-L1 антитело содержит CDR тяжелой цепи и легкой цепи авелумаба, дурвалумаба, атезолизумаба или BMS-936559.
52. Способ по п. 51, отличающийся тем, что анти-PD-L1 антитело содержит переменные области тяжелой цепи и легкой цепи авелумаба, дурвалумаба, атезолизумаба или BMS-936559.
53. Способ по п. 52, отличающийся тем, что анти-PD-L1 антитело представляет собой авелумаб, дурвалумаб, атезолизумаб или BMS-936559.
54. Способ по п. 44, отличающийся тем, что ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой слитую молекулу PD-1.
55. Способ по п. 54, отличающийся тем, что слитая молекула представляет собой AMP-224.
56. Способ по п. 44, отличающийся тем, что ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой AUR-012.
57. Способ по любому из пп. 1-56, отличающийся тем, что слитую молекулу ВКД CD80 вводят в комбинации с противораковой вакциной.
58. Способ по п. 57, отличающийся тем, что противораковая вакцина представляет собой индивидуальную противораковую вакцину.
59. Способ по п. 57 или 58, отличающийся тем, что слитую молекулу ВКД CD80 и противораковую вакцину вводят одновременно или последовательно.



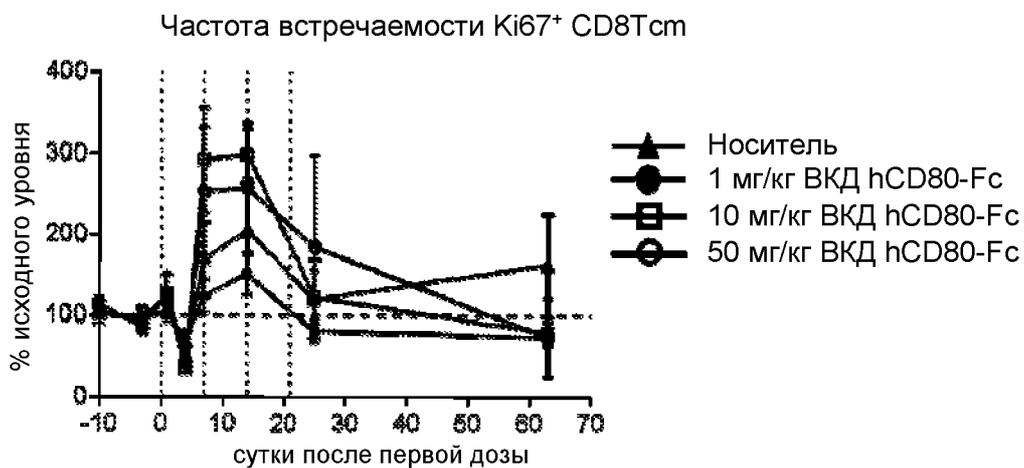
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4